



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Mise en évidence des récepteurs spécifiques de l'hormone de croissance dans les follicules ovariens, effets de la taille des follicules et d'un traitement à l'hormone de croissance

Güsken, Evelyne

Award date:
1997

[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
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

SECRETARIAT BIOLOGIE
F.U.N.D.P.
RUE DE BRUXELLES, 81
SARTROUVILLE - NAMUR

FACULTE DES SCIENCES

**MISE EN EVIDENCE DES RECEPTEURS SPECIFIQUES DE
L'HORMONE DE CROISSANCE DANS LES FOLLICULES
OVARIENS. EFFETS DE LA TAILLE DES FOLLICULES ET D'UN
TRAITEMENT À L'HORMONE DE CROISSANCE**

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

GÜSKEN Evelyne

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/23.03.91

MISE EN EVIDENCE DES RECEPTEURS SPECIFIQUES DE L'HORMONE DE CROISSANCE DANS LES FOLLICULES ET D'UN TRAITEMENT A L'HORMONE DE CROISSANCE

GÜSKEN Evelyne

Résumé

La rentabilité des élevages des animaux domestiques passe par une meilleure maîtrise des techniques, notamment en matière de reproduction. Sur ce plan, beaucoup de points restent obscures et notamment les effets de diverses hormones.

L'objectif de ce mémoire est d'apporter quelques éléments dans la compréhension des effets de l'hormone de croissance (GH) sur l'ovaire de brebis via son récepteur. Notre premier but a été de localiser le récepteur à la GH au niveau des différents sites de l'ovaire et plus particulièrement dans les follicules. Le deuxième but a été d'étudier les effets de la taille des follicules, de la saison et de traitement à la GH sur le récepteur à la GH, à la FSH et à la LH.

Nos résultats nous permettent de conclure que les récepteurs à la GH sont plus nombreux dans les follicules ovariens en anoestrus qu'en période de reproduction. Au cours des deux saisons, lorsque les follicules sont traités in vitro avec la GH, le nombre de récepteurs à la GH augmente; le même traitement diminue par contre ce nombre lorsqu'il est appliqué in vivo. De plus, le nombre de récepteurs GH est toujours plus élevé dans les grands que dans les petits follicules, quelque soit la saison.

Pour les récepteurs à la FSH et à la LH nous supposons que le traitement à la GH in vivo ou in vitro diminue le nombre des récepteurs FSH et LH, quelque soit la saison.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 1997

Promoteur: R. Paquay

Co-Promoteur: J.L.Bister

A l'issue de ce travail, je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à mon promoteur, le Professeur Paquay, pour l'accueil au sein de son Laboratoire et ses conseils lors de la rédaction de ce mémoire.

Je voudrais remercier tout particulièrement, le Professeur J.L.Bister pour les conseils qu'il m'a prodigués tout au long de cette année.

Que tous les membres du Laboratoire de Physiologie Animale et du Centre de Recherches Ovines de Faulx-les-Tombes soient également remerciés pour leur accueil et leur assistance.

Un grand merci au Dr. Mertens-Strijthagen, au Dr. Carine Michiels, à Pierre Lourtie, Xavier DeBolle, Dominique Delforge, Christian Didembourg, Marc Dieu, Patsy Renard, Edouard Delaive, Smaïl Amrani-Khaldi, Bernadette Perrad et Raphaël Deom du Laboratoire d'Histologie pour leur serviabilité et disponibilité.

J'exprime toute ma reconnaissance à mon frère, et à mes amis Isabelle, Kara et Luc, qui m'ont soutenue pendant ce travail.

Enfin, j'exprime ma plus sincère gratitude à mes parents qui, par leur attention, leur affection et leurs encouragements m'ont soutenue tout au long de mes études.

*Notre plus grande gloire
n'est pas de ne jamais
tomber
mais de nous relever à
chaque fois que nous
tombons*

CHAPITRE I: INTRODUCTION 3

CHAPITRE II: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 4

1. Les différents états physiologiques du système reproducteur chez la brebis	4
2. Evolution histofonctionnelle au sein de l'ovaire	5
2.A. Description de l'ovaire	5
2.B. L'ovogenèse et la folliculogenèse	5
2.C. La croissance folliculaire	5
3. Hormones impliquées dans le contrôle du cycle oestral chez la brebis	11
3.A. L'hormone hypothalamique GnRH (Gonadotropine Releasing Hormone)	11
3.B. Les hormones hypophysaires	11
4. L'hormone de croissance et son récepteur	14
4.A. Communication entre cellules: hormones et récepteurs	14
4.B. L'hormone de croissance	15
a. Structure de la GH	15
b. Mode et contrôle de la sécrétion de la GH	16
c. Les régions cérébrales impliquées dans le contrôle de la sécrétion de la GH	17
d. Les Somatomédines	18
e. Actions de la GH	20
f. Effets métaboliques de la GH	21
4.C. Le récepteur de l'hormone de croissance	22
a. Structure	22
b. Localisation	24
c. Régulation de l'expression	25
d. Formation et devenir du complexe hormone-récepteur	26
4.D. La protéine de liaison de l'hormone de croissance	29
a. Structure	29
b. Génération de la GHBP	30
c. Fonction de la GHBP	30

CHAPITRE III: MATERIEL ET METHODES 32

1. Rappel des objectifs poursuivis	32
2. Conditions expérimentales	33
3. Plans expérimentaux	33
3.A. Ponction des follicules ovariens pour l'application de la technique du Ligand Binding en suspension cellulaire	33
3.B. Mises en évidence des effets de l'état physiologique et d'un traitement à la GH <i>in vivo</i> et/ou <i>in vitro</i> sur la présence des récepteurs à la GH par la technique d'autoradiographie	34
4. Techniques	35
4.A. Transport et préparation des tissus pour la mise au point et l'application des techniques	35
a. Transport des ovaires et des prélèvements de foie	35
4.B. La technique du Ligand Binding en suspension cellulaire	36
a. Principe	36
b. Solutions utilisées	36
c. Marquage des hormones	36
d. Techniques	38
e. Etude de paramètres	40

4.C. La technique d'autoradiographie	40
a. Principe	40
b. Solutions utilisées	41
c. Préparation des lames APES (3 aminopropyléthoxysilane)	41
d. Colorations	42
e. Marquage des hormones	43
f. La technique	43
g. Détermination du nombre de récepteurs à l'aide du logiciel Bioimage (SUN)	45
4.D. Analyses statistiques	46

CHAPITRE IV: RESULTATS **47**

1. Ligand binding en suspension cellulaire	47
1.A. Isolement des cellules	47
1. Résultats pour les cellules hépatiques	48
2. Résultats pour les cellules granulosales	49
3. Résultats pour les autres types cellulaires de l'ovaire : cellules thécales, stromales et lutéales	49
4. Conclusions	50
1.B. Ligand Binding en suspension cellulaire	51
1. Recherche des conditions optimales de durée et de température d'incubation	51
2. Abondance relative des récepteurs à la GH, à la LH et à la FSH pour les différents types de cellules	52
2. Autoradiographie	54
2.A. Les récepteurs à la GH	55
1. Influence de la saison et du traitement sur les récepteurs à la GH pour les grands follicules	55
2. Effet de la taille des follicules et du traitement à la GH sur les récepteurs à la GH en milieu de saison	57
2.B. Les récepteurs à la LH	59
2.C. Les récepteurs à la FSH	61
2.D. Conclusions	63

CHAPITRE V: DISCUSSION **64**

Première partie : Discussion des techniques utilisées	64
1. La technique du Ligand Binding en suspension cellulaire	64
2. La technique de l'autoradiographie	71
Deuxième partie : Discussion générale des résultats obtenus	73
1. Les résultats obtenus par la technique du Ligand Binding en suspension	73
2. Les résultats obtenus par l'autoradiographie	74

CHAPITRE VI: CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES **77**

ANNEXE **79**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **80**

CHAPITRE I: INTRODUCTION

Le mouton domestique présente une large dispersion à travers le monde. De nos jours, l'élevage ovin est très développé dans des pays tels que l'Australie, la Nouvelle-Zélande, la France et l'Angleterre. A l'intérieur de la CEE, la Belgique ne produit que 20% de la viande ovine vendue sur son marché et tend à développer cet élevage. Pour augmenter la rentabilité de l'élevage, il serait intéressant d'allonger la saison de reproduction chez l'animal qui se reproduit en jours courts et d'augmenter le nombre de jeunes par brebis. En effet, chez la brebis, la reproduction est limitée à une courte période de l'année à cause des périodes d'anoestrus saisonnier et de lactation (post-partum). Celles-ci sont caractérisées non seulement par l'absence du comportement d'oestrus mais aussi par un état de moindre activité de l'ovaire. De plus, lors de la reprise de la cyclicité ovarienne, les premières phases lutéales sont souvent anormales avec comme conséquence des cycles oestriques courts et longs, ce qui réduit fortement l'aptitude reproductrice de la brebis à certaines périodes de l'année. Une meilleure connaissance des mécanismes ovariens est indispensable si on veut améliorer les performances de reproduction.

L'hormone de croissance (GH), connue pour ses effets extrêmement pléiotropes dans tout l'organisme semble jouer un rôle dans le développement ovarien et son fonctionnement. Elle se lie à un récepteur spécifique dont le mode de fonctionnement est très peu connu et dont la localisation est contestée.

C'est dans ce contexte que se situe notre étude qui a pour but de déterminer les effets de la GH sur son récepteur au niveau de l'ovaire de la brebis et en particulier dans les follicules. Nous détaillons, dans un premier temps et par une revue bibliographique, le cycle oestral, la croissance folliculaire, l'hormone de croissance et son récepteur. Les chapitres suivants sont réservés à la description des plans expérimentaux, des techniques utilisées et des résultats.

Nos objectifs sont:

- la mise au point de techniques qui permettent de déterminer la présence du récepteur à la GH et de les quantifier;
- l'étude de l'effet de la taille des follicules ovariens sur la quantification des récepteurs à la GH;
- l'étude de l'influence de la GH sur l'évolution de son propre récepteur et des récepteurs de deux autres hormones hypophysaires, la lutropine (LH) et la folliculotropine (FSH).

CHAPITRE II: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les différents états physiologiques du système reproducteur chez la brebis

(Bister, 1989)

Le mouton domestique est une espèce polyoestrienne à cycles saisonniers; il présente une succession de cycles oestriques pendant une saison déterminée. Lorsqu'elle n'est pas en *cycle*, la brebis peut présenter différents états physiologiques: *l'anoestrus*, la *gestation* et la *lactation*.

Pendant *l'activité cyclique*, des gamètes femelles sont produits et des conditions nécessaires à la fécondation sont établies. Ainsi on observe des modifications au niveau du tractus génital et des sécrétions hormonales et le comportement sexuel apparaît. Chez la brebis, cette activité dépend de la photopériode, c'est-à-dire de la durée du jour. Sous nos latitudes, c'est lorsque la photopériode décroît que l'activité oestrale débute; elle se maintient jusqu'à ce que la durée du jour réaugmente. La longueur de la saison de reproduction dépend également de la race: les brebis Suffolk manifestent des oestrus d'août à mars alors que la brebis Texel se reproduit d'octobre à janvier.

L'anoestrus est caractérisé par un arrêt de l'activité cyclique sexuelle tant au niveau ovarien que comportemental. Cet anoestrus peut être prépubertaire, saisonnier, post-partum, dû à la lactation ou accidentel (notamment dû à un état pathologique).

La *gestation* s'étend de la fécondation jusqu'à la mise bas. Elle permet d'assurer le développement de l'embryon dans l'utérus jusqu'à sa maturité. La gestation peut également être rattachée à un état d'anoestrus.

Pendant la *lactation*, la femelle peut présenter un anoestrus (anoestrus post-partum qui, souvent se poursuit en un anoestrus saisonnier) ou manifester une reprise des chaleurs et des ovulations si la lactation se poursuit. Il s'agit donc d'un état particulier caractérisé par des sécrétions endocrines susceptibles de modifier l'activité ovarienne.

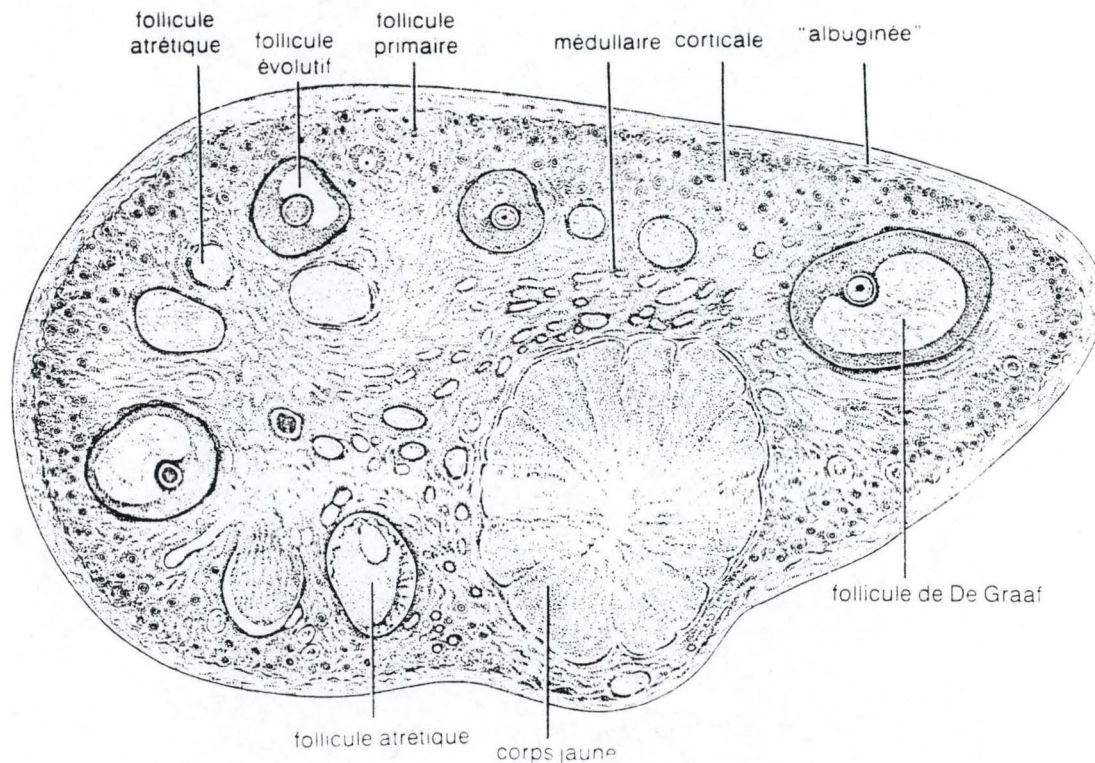


Fig. II.1 : Schéma montrant les principaux composants de l'ovaire d'une femme adulte (Junqueira et Carneiro, 1989)

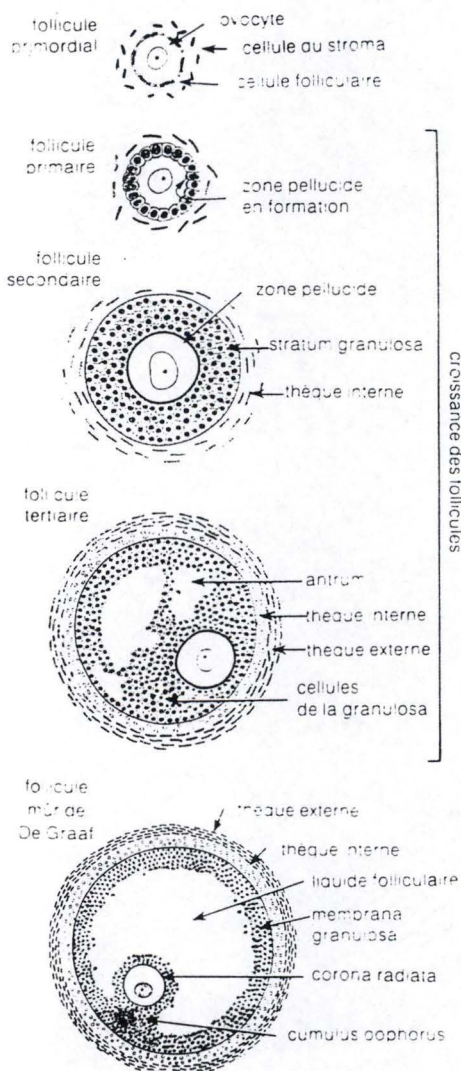
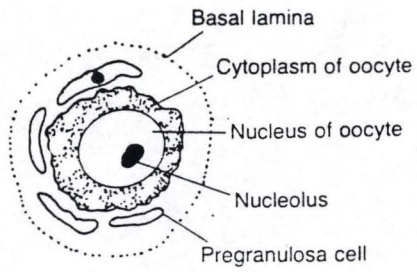


Fig. II.2 : Schéma des follicules ovariens commençant par le follicule primordial et se terminant avec le follicule mûr (Junqueira et Carneiro, 1989)



A. Primordial follicle

Fig.II.3 : Follicule primordial (Martin, 1985)

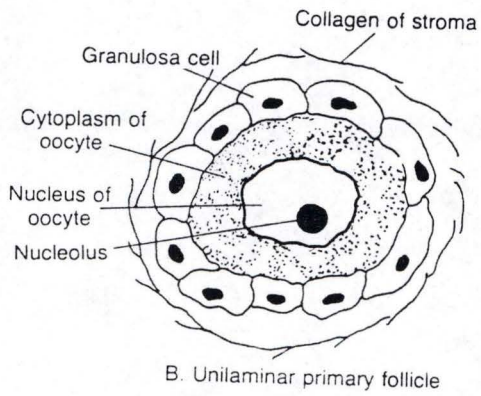


Fig.II.4 : Follicule primaire (Martin, 1985)

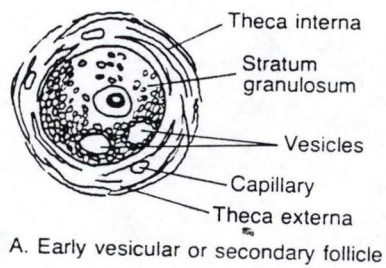


Fig.II.5 : Follicule secondaire (Martin, 1985)

2. Evolution histofonctionnelle au sein de l'ovaire

2.A. Description de l'ovaire

L'ovaire de la brebis possède une forme arrondie ou ovoïde d'environ 1 à 3 cm de section et souvent aplati transversalement. Il est délimité par une albuginée fibreuse, d'où sa couleur blanchâtre.

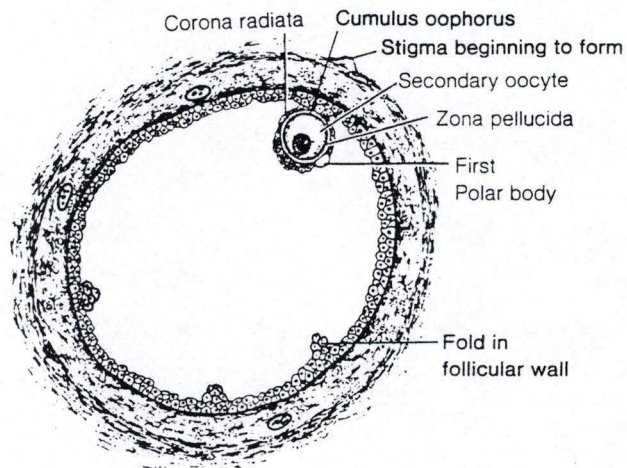
En coupe transversale on distingue trois zones au niveau de l'ovaire. La zone interne, appelée *médullaire*, contient les éléments sanguins, lymphatiques et nerveux. La zone externe, ou *corticale*, contient les éléments responsables des fonctions exocrines et endocrines principales. Ces éléments sont des follicules à divers stades de développement ou d'atrésie et, éventuellement, des corps jaunes, des "corpora albicantia". La fonction exocrine est la gamétogenèse. La troisième zone de l'ovaire est le *hile*, par lequel pénètrent ou sortent les éléments sanguins, lymphatiques et nerveux (Fig.II.1).

2.B. L'ovogenèse et la folliculogenèse (Fig.II.2)

Au début de la vie foetale, les cellules germinales primordiales, appelées *ovogonies*, migrent dans le cortex ovarien où elles se multiplient par mitose. Elles entament ensuite le processus de la méiose et se bloquent au stade diplotène de la prophase I. Appelées *ovocytes I* à ce stade, elles induisent la différenciation des cellules stromales environnantes et s'entourent d'une couche de cellules aplaties, les *cellules folliculeuses* pour former des *follicules primordiaux*. (Fig.II.3) Cette activité débute vers la 10^{ième} semaine de la vie foetale et est terminée avant la naissance. Ainsi se constitue dans les ovaires de la brebis un stock de 200 000 à 400 000 follicules primordiaux.

2.C. La croissance folliculaire (Bister, 1991)

La croissance folliculaire comporte deux étapes. La première, dite *basale* ne concerne que les follicules d'un diamètre inférieur à 2 mm chez la brebis. La seconde est appelée *terminale*. Au cours des quelques jours où elle se déroule, des follicules antraux entament une croissance rapide, certains d'entre eux atteindront un diamètre de 6 à 10 mm et pourront maturer et éventuellement ovuler. C'est lors de cette dernière étape qu'on observera le recrutement et la sélection du ou des follicules dominants.



A. Follicle at time of ovulation

Fig.II.6 : Follicule avant ovulation (Martin, 1985)

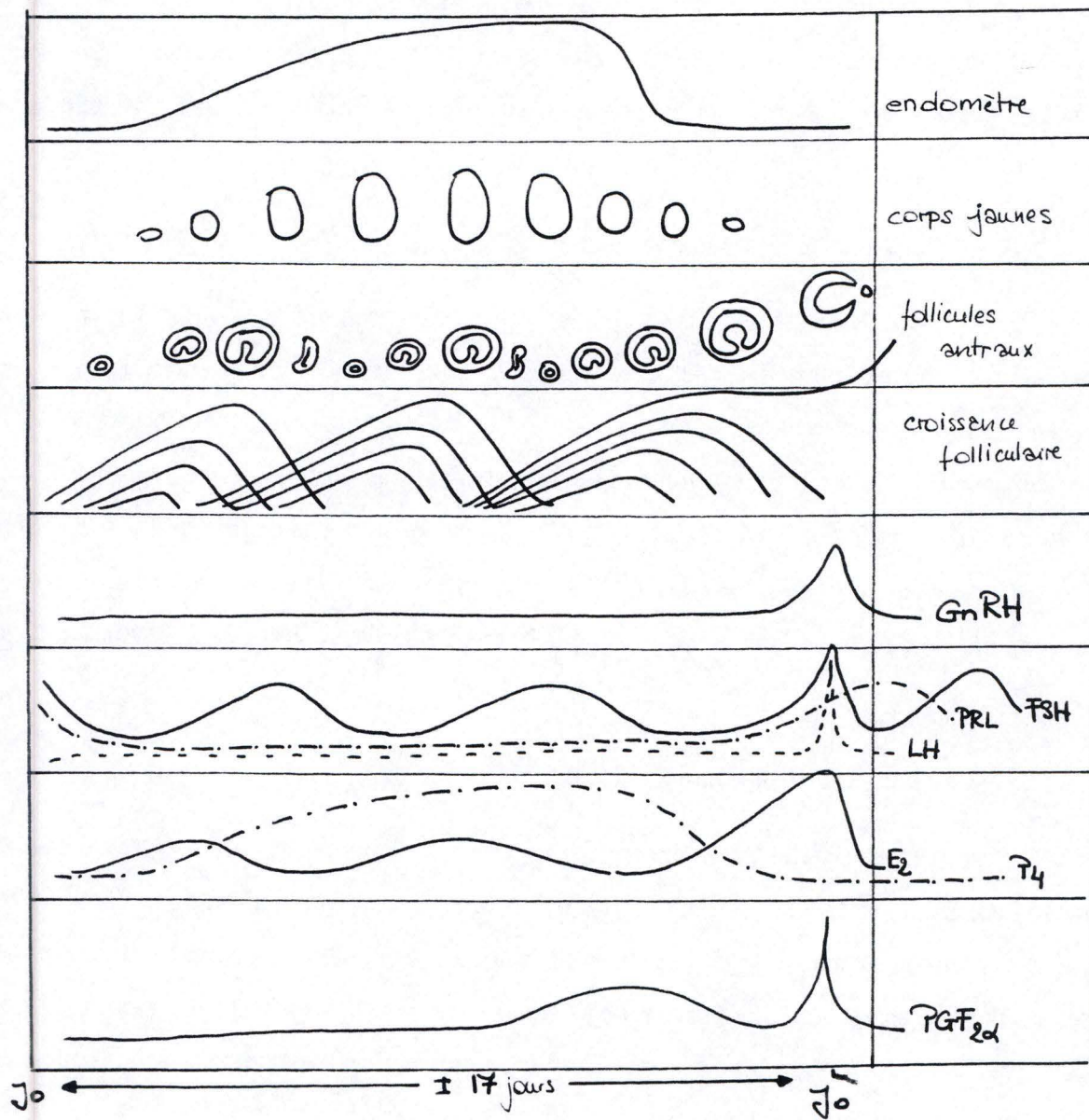


Fig.II.7 : Schéma du cycle sexuel et de la sécrétion hormonale chez la brebis (Bister, 1991)

Le premier stade de la croissance folliculaire sont les *follicules primordiaux*. Ils sont constitués d'un gros ovocyte rond contenant un noyau volumineux et entouré d'une couche simple de cellules très aplaties, les cellules *folliculeuses*. Sous l'influence d'un contrôle paracrine inconnu, les follicules primordiaux peuvent sortir de leur quiescence et entamer un processus de développement. Dans un premier stade, le système ovocyte-cellules folliculeuses devient métaboliquement plus actif. Le diamètre de l'ovocyte passera de 30 à 80-90 μm . Les cellules folliculeuses, liées à l'ovocyte par de nombreuses expansions cytoplasmiques, deviennent cubiques (Fig.II.4). Elles se mettent à proliférer pour former une couche pluristratifiée appelée *granulosa* (follicule secondaire; Fig.II.5) Les cellules granulosales présentent un gros noyau irrégulier avec un nucléole volumineux. Une *zone pellucide* sépare l'ovocyte des cellules granulosales mais elle est traversée par les prolongements cellulaires qui unissent l'ovocyte à la granulosa. Les cellules granulosales sont couplées entre elles par de nombreuses "gap junctions". Ceux-ci jouent un rôle important dans la coordination de l'activité des cellules. Une mince lame basale sépare les cellules granulosales des cellules du stroma ovarien environnant. Parmi celles-ci, on observe un certain nombre de cellules qui ont tendance à s'agréger concentriquement autour de la lame basale. Elles vont former la *thèque folliculaire*.

Par la suite, la thèque se différencie en une couche *interne*, douée de capacités sécrétoires et en une couche *externe* (la thèque externe) formée principalement d'un tissu conjonctif avec un nombre variable de cellules musculaires lisses. C'est le stade du *follicule tertiaire*.

Le passage au stade de *follicule antral* débute par l'apparition d'espaces irréguliers remplis d'un liquide clair, le fluide folliculaire, entre les cellules de la granulosa. Ce liquide provient à la fois du plasma et des cellules granulosales. Avec l'intensification de la production de ce fluide, les espaces confluent pour finalement former une cavité unique, la cavité antrale. A ce stade, le follicule grandit rapidement sous l'effet conjugué de l'accumulation de fluide folliculaire et du taux de mitoses élevé des cellules folliculaires.

La granulosa forme un épaissement, contenant l'ovocyte, d'un côté du follicule; c'est le *cumulus oophorus*. Celui-ci s'individualise progressivement, et les couches les plus proches de l'ovocyte s'organisent en *corona radiata*, qui reste intimement liée à l'ovocyte à travers la zone pellucide. Les autres cellules de la granulosa, appelées cellules granulosales *pariétales* perdent progressivement leur aspect compact et de nombreuses inclusions cytoplasmiques apparaissent dans leur cytoplasme. Des multiples contacts intercellulaires des différents types unissent les

cellules de la granulosa afin d'assurer une bonne coordination de leur activité cellulaire. Les cellules de la thèque subissent une multiplication importante semblable à celle observée pour la granulosa lors de la première partie de la croissance folliculaire. Mais pendant la phase terminale, le taux de mitose est en forte diminution.

A ce stade de plein développement (diamètre supérieur à 5 mm), le follicule antral est prêt à subir la maturation finale qui aboutira à l'*ovulation* (Fig.II.6). Si toutes les conditions endocriniennes sont réunies, les mitoses se raréfient, les connexions au niveau du cumulus oophorus sont perdues graduellement et l'ovocyte, entouré de sa granulosa, se détache de la granulosa pariétale pour flotter librement dans la cavité folliculaire. Les sensibilités différentes aux gonadotropines font que les cellules de la "corona radiata" produisent des *mucoprotéines* qui imbibent et enveloppent l'ovocyte tandis que les cellules de la granulosa pariétale produisent des grandes quantités d'*oestradiol 17 β* (E₂). Cette maturation se produit en général lorsque le follicule atteint 6 à 10 mm de diamètre chez la brebis (Fig.II.7).

L'ovocyte reprend sa méiose réductionnelle qui s'arrête à nouveau, au stade métaphase II, après expulsion d'un premier globule polaire. Son cytoplasme se contracte et la zone pellucide s'épaissit ce qui a comme conséquence une perte définitive des liens de l'ovocyte avec les cellules granulosales.

Le follicule fait protrusion à la surface de l'ovaire et un trou apparaît dans la paroi ovarienne et folliculaire (le *stigma*) qui laisserait fuir la majeure partie du fluide folliculaire. C'est une contraction des cellules folliculaires qui expulse l'ovule (Fig.II.8). Ensuite, la cavité folliculaire laissée béante se remplit de sang. Les trois couches de la paroi folliculaire, à savoir les cellules thécales externes, internes et granulosales se réorganisent pour former une glande endocrine temporaire, le *corps jaune*, richement vascularisée. Sous l'influence de la LH (Luteinizing Hormone, Hormone Lutéinisante ou Lutropine) sécrétée par l'adénohypophyse, les cellules granulosales se transforment en *cellules lutéiniques folliculaires* et se mettent à sécréter de la progestérone (P₄). Les cellules de la thèque interne deviennent des *cellules lutéiniques thécales* ou *cellules paralutéiniques*. Elles continuent à sécréter des oestrogènes (Fig.II.9).

Le corps jaune est sous la dépendance de la sécrétion de nombreuses hormones parmi lesquelles la LH, la PRL (prolactine) et l'IGF-I (Insulin-like Growth Factor I) sont considérées comme lutéotropes tandis que l'E₂, la PGF_{2 α} (Prostaglandine F_{2 α}) et l'ocytocine sont lutéolytiques.

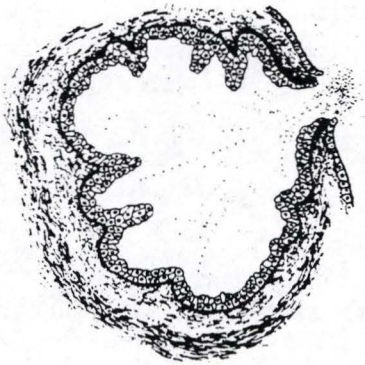


Fig.II.8 : Follicule après ovulation (Martin, 1985)

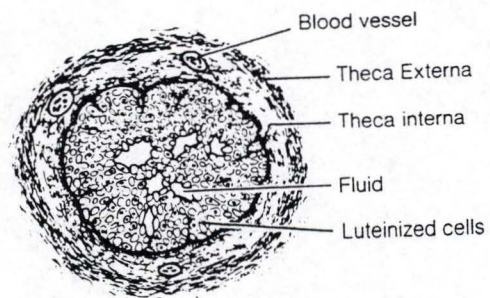


Fig.II.9 : Ovulation et formation du corps jaune (Martin, 1985)

Quand le corps jaune régresse, il se transforme en une formation scléreuse inerte, le *corpus albicans*. Lors de l'atrésie les cellules de la granulosa ne présentent plus de mitoses et commencent à se détacher de la lame basale. Les noyaux deviennent pycnotiques et le tissu fibreux. Les follicules peuvent dégénérer à n'importe quel stade de développement folliculaire. L'aspect du follicule atrétique est déterminé par le stade auquel il se trouve au moment de la dégénérescence. De ce fait, l'aspect des follicules atrétiques peut-être très variable.

Au cours de chaque cycle ovarien, de très nombreux follicules entament la croissance basale, mais seulement un ou quelques-uns arriveront au stade de l'ovulation. L'immense majorité des follicules est vouée à l'atrésie et n'atteint donc pas l'ovulation.

On distingue donc deux phases lors du développement folliculaire. La première est le développement *basal*, permanent et apparemment sans relation avec l'état physiologique de l'individu. La deuxième phase est le développement folliculaire *terminal*, influencé par les variations des concentrations d'hormones gonadotropes.

C'est tout au début du stade antral que les follicules acquièrent leur sensibilité aux gonadotropines hypophysaires. A ce moment, les follicules ont chez la brebis un diamètre d'environ 2 mm (Blumenfeld et Amit, 1994).

La durée des phases basale et terminale est très différente. Ainsi, le passage du follicule primordial au follicule préantral prendrait 3 à 6 mois, tandis que le follicule antral passe de 2 à 10 mm en 2 à 4 jours chez la brebis. Ses sécrétions hormonales, principalement de type stéroïdien, sont très importantes.

Les facteurs qui sortent les follicule primordiaux de leur quiescence sont encore presque totalement inconnus. Il semble prouvé que les gonadotropines, LH ou FSH (Follicle Stimulating Hormone, Folliculotropine ou Hormone Folliculo-Stimulante), et les autres hormones connues provenant de l'hypophyse n'ont pas d'effet direct sur ce développement de base (McNeilly *et al.*, 1986; Driancourt *et al.*, 1987). Cela a pu être démontré par une expérience d'hypophysectomie, laquelle n'entrave pas cette première phase du développement folliculaire bien qu'on constate un ralentissement de croissance.

On suppose un contrôle *paracrine* qui autorise un certain nombre de follicules à sortir de leur léthargie. Soit il y a induction de leur développement par certaines substances stimulatrices, soit il y a levée de l'inhibition exercée par des cybernines. Il est très probable que ce contrôle soit

effectué au sein de la population folliculaire par action directe des follicules les uns sur les autres ou via certaines cellules du stroma ovarien. L'inhibine (INH) et certains stéroïdes pourraient avoir un rôle, mais il paraît évident que des facteurs spécifiques de croissance sont encore à découvrir.

Pendant la croissance basale, l'activité endocrine des follicules est nulle ou très faible, certains androgènes sont produits par les plus gros follicules au stade préantral.

Les diverses études réalisées sur cette croissance folliculaire basale et qui concerne les populations folliculaires où les taux d'atrésie et les taux d'ovulation semblent concorder pour décrire ce phénomène comme une activité constante, ne présentant pas de rythme particulier ni de caractère périodique.

Il en est tout autrement de la croissance terminale. Diverses analyses permettent de suggérer un développement folliculaire sous forme de vagues chez la brebis. Certains auteurs préconisent une distribution bimodale ou trimodale (Jaques, 1989), tandis que d'autres (Turnbull *et al.*, 1977) mettent en évidence une croissance continue et aléatoire. Ceci implique la présence de gros follicules sains à n'importe quel jour du cycle.

Le développement sous forme de trois vagues peut être résumé comme suit. Une *première vague* de croissance débute peu après l'ovulation, qui se produit par convention le jour 0 du cycle. C'est surtout aux jours 1 et 2 que des petits follicules entament leur croissance. Celle-ci est rapide puisque le diamètre augmente en moyenne d'un peu plus d'un millimètre par jour. Le passage au diamètre de 4 mm marque une étape importante. En effet, plus de 30 % de follicules s'atrésient avant de l'atteindre; les autres, appelés communément *follicules sélectionnés*, acquièrent une capacité sécrétoire beaucoup plus importante notamment grâce à une activité d'aromatisation accrue permettant à la granulosa de transformer les androgènes synthétisés par la thèque en quantités massives d'oestradiol. Les quelques follicules supérieurs à 4 mm de diamètre sont responsables de plus de 90% de la production d'oestradiol.

Enfin, parmi les follicules qui atteignent ces 4 mm de diamètre, un bon nombre régresse rapidement tandis que quelques-uns se maintiennent et même continuent à croître. On les appelle *follicules dominants*, même s'il n'est pas prouvé qu'ils induisent l'atrésie de leurs contemporains.

Cette différenciation se déroule donc en plusieurs étapes: recrutement, sélection et dominance, puis éventuellement maturation et ovulation.

Au cours de cette *première vague* de croissance, qui se passe donc pendant la phase de développement du corps jaune, tous les follicules recrutés, sélectionnés et même dominants vont subir l'atrésie. Rares sont ceux qui vont pouvoir se maintenir et participer à la deuxième vague folliculaire du cycle. On les estime à environ 10%.

La *deuxième vague* débute par un recrutement de nouveaux follicules principalement aux jours 7 et 8 du cycle. De nouveau, des follicules sont sélectionnés et certains deviennent dominants. Cette vague se produit donc pendant la seconde moitié de la phase d'activité du corps jaune. Néanmoins, tous ou presque tous les follicules de cette vague ne pourront se maintenir, subiront l'atrésie et disparaîtront pour laisser la place à la nouvelle vague des recrutés. L'atrésie des derniers follicules dominants de cette vague correspond dans le temps à la régression du corps jaune.

Au cours de la *troisième vague* débutant les 13 et 14^{ième} jours du cycle, se passent de nouveau les phénomènes de sélection et de dominance. Libérés de l'inhibition due au corps jaune, certains follicules dominants vont pouvoir subir la maturation finale et atteindre l'ovulation; les autres s'atrésieront.

La vitesse de croissance des follicules est assez constante d'une vague à l'autre, en moyenne 1,1 mm de diamètre par jour. Mais au cours de cette troisième vague, les différences individuelles sont plus marquées comme si la levée de l'inhibition par le corps jaune rendait la compétition plus vive entre les follicules. Au cours de cette vague, les follicules dominants atteignent en général des tailles un peu plus élevées que pendant la phase lutéale, et un plus grand pourcentage de follicules sélectionnés deviennent dominants.

Pour expliquer la sélection et l'apparition du follicule dominant deux hypothèses ont été avancées. L'hypothèse de la **stabilité** suggère que lorsque un follicule est assez grand ou a atteint un taux suffisant de maturation, il reste à un stade d'équilibre, et ne répond plus à une diminution du taux de FSH qui conduit les autres à l'atrésie. Le ou les follicules destinés à ovuler seraient protégés par la présence de FSH et d'oestradiol dans le fluide antral (Ireland, 1987). L'hypothèse de l'**élimination** préconise qu'un follicule d'une taille donnée et à un état de maturation avancé inhibe la croissance des autres. Ce follicule sécréterait un facteur agissant directement au niveau ovarien en inhibant la réponse des autres follicules aux gonadotropines (Di Zerega et Hodgen, 1981).

Hypothalamic Hormone	Associated Functions	Remarks
Thyrotropin-releasing hormone (TRH, thyrotropin release factor, TRF, thyroid-stimulating hormone release factor, TSH-RF)	Maintains structure and functions of thyrotropes; enhances TSH secretion	Tripeptide of established structure; also synthesized outside the hypothalamus
Corticotropin release factor (CRF, corticotropin-releasing hormone, CRH)	Maintains corticotropes, enhances ACTH secretion	41-amino acid peptide identified. Many other agents enhance ACTH secretion
Somatostatin (SS, somatotropin release inhibiting factor, SRIF, growth hormone release inhibiting factor, GRIF, growth hormone inhibiting factor, GIF)	Inhibits secretion of GH	Several forms including a tetradecapeptide; also synthesized in pancreas, stomach, intestine, extrahypothalamic brain; many other actions
Growth hormone-releasing hormone (GRH, growth hormone release factor, GRF, somatotropin release factor, SRF)	Maintains somatotropes, enhances GH secretion	44-amino acid peptide identified. Endorphins, other hypothalamic components promote GH secretion
Prolactin inhibiting factor (PIF)	Inhibits secretion of prolactin	Structure not established. Some investigators believe that dopamine is the PIF, while others suggest that dopamine is a secondary regulator
Prolactin release factor (PRF, prolactin-releasing hormone)	Promotes secretion of prolactin	Important in birds; may be important during lactation in mammals; TRH enhances PRL secretion but is not identical with PRF
Luteinizing hormone releasing hormone (LRH, LHRH, Luteinizing hormone release factor, LRF), gonadotropin-releasing hormone, GnRH	Maintains gonadotropes, enhances secretion of LH and FSH	Decapeptide of established structure
Follicle-stimulating hormone release factor (FSH-RF, FRF)	Enhances secretion of FSH	No factor positively identified; some investigators doubt existence of separate hormone affecting FSH but not LH
Melanocyte releasing factor (MRF)	Promotes secretion of melanocyte-stimulating hormone (MSH) in animals that have a pars intermedia	Pentapeptide cleaved from Oxytocin. Not universally accepted as a true hormone
Melanocyte Inhibiting Factors (MIFs)	Inhibit release of MSH in animals that have a pars intermedia	Two tripeptides cleaved from Oxytocin possess such activity. Hormone status not fully established.

Tableau II.1 : Hormones hypothalamiques régulateurs des fonctions de l'adénohypophyse (Martin, 1985)

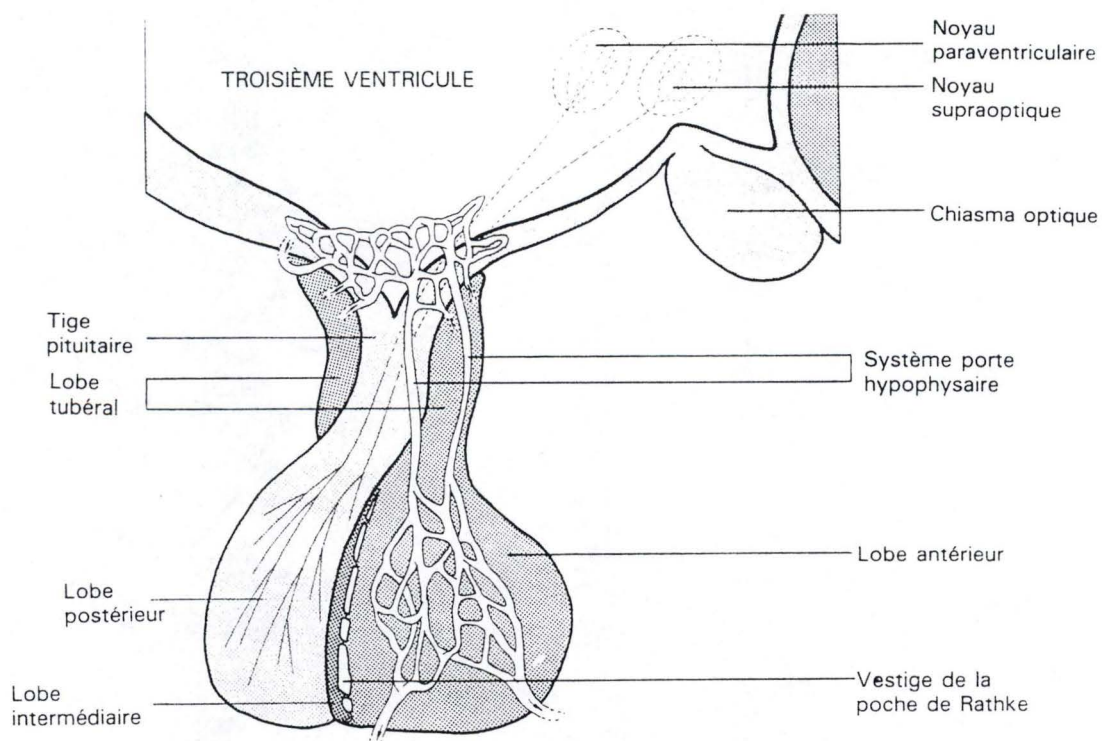


Fig.II.10 : Schéma de l'hypophyse (Wheater *et al.*, 1987)

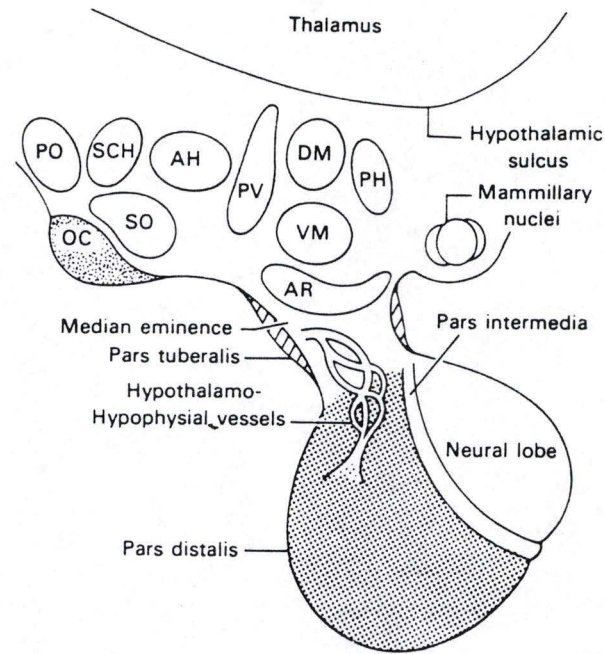


Fig.II.11 : Schéma de l'hypothalamus (Martin, 1985)

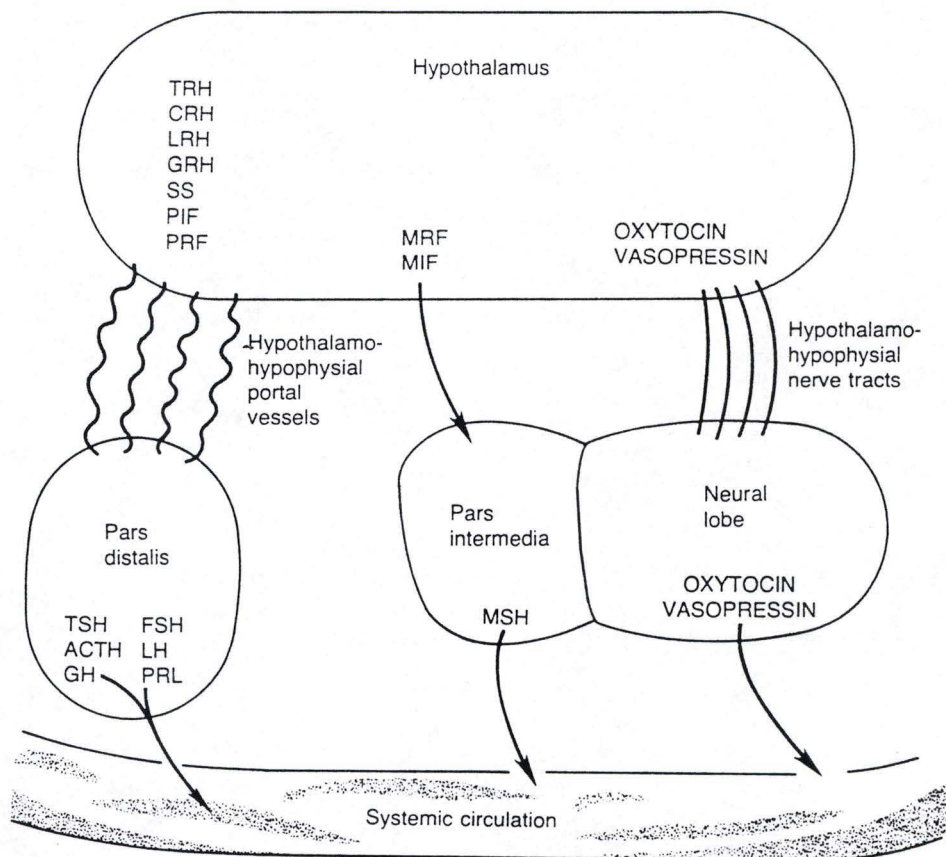


Fig.II.12 : Influences de l'hypothalamus sur l'hypophyse (Martin, 1985)

3. Hormones impliquées dans le contrôle du cycle oestral chez la brebis

Le déroulement du cycle oestral requiert des hormones sécrétées par l'appareil hypothalamo-hypophysaire, les gonades et l'utérus. D'autres éléments du système endocrinien comme l'épiphyse, la thyroïde, les glandes surrénales et le placenta participent également à ce fonctionnement.

3.A. L'hormone hypothalamique GnRH (Gonadotropine Releasing Hormone)

La gonadolibérine ou **GnRH** est un décapeptide ayant un poids moléculaire compris entre 1200 et 1400 kDa. Elle a pour cible les cellules gonadotropes de l'hypophyse. L'hormone est catabolisée au niveau du rein en 2 à 4 minutes (Derivaux et Ectors, 1986). La GnRH est émise de façon pulsatile et son rythme de sécrétion est à peu près constant pendant la majeure partie du cycle oestral excepté en période préovulatoire où il augmente (Bister, 1991).

La GnRH est sécrétée par les centres tonique et cyclique de l'hypothalamus (Tableau II.1) Elle arrive à l'hypophyse par des capillaires sanguins constituant le *système porte* hypophysaire et se fixe ensuite aux récepteurs spécifiques 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 synthèse et à la sécrétion des gonadotropines hypophysaires (Yen, 1991) (Fig.II.10).

Le contrôle de la sécrétion de la GnRH est assuré par la GnRH elle-même en un feed-back négatif *très court*. Ceci ne nécessite pas l'intermédiaire du courant sanguin: ce sont les hormones produites par les cellules hypothalamiques qui agissent sur leurs propres cellules d'origine (Martin, 1985). D'autre part, les gonadotropines hypophysaires (LH et FSH) jouent un rôle de feed-back négatif *court* sur la sécrétion de GnRH. Les hormones ovariennes, notamment la progestérone et les oestrogènes, agissent par un mécanisme de rétrocontrôle négatif *long* sur les centres de sécrétion de l'hypothalamus (Whitehead, 1990; Karsh *et al.*, 1993). Ce rétrocontrôle implique le passage des hormones dans le courant sanguin (Martin, 1985; Fig.II.11 et II.12).

3.B. Les hormones hypophysaires

L'hypophyse sécrète principalement des hormones de type protéique. Elle est un petit organe allongé, d'environ 1 cm de diamètre situé dans une dépression du plancher du crâne et se

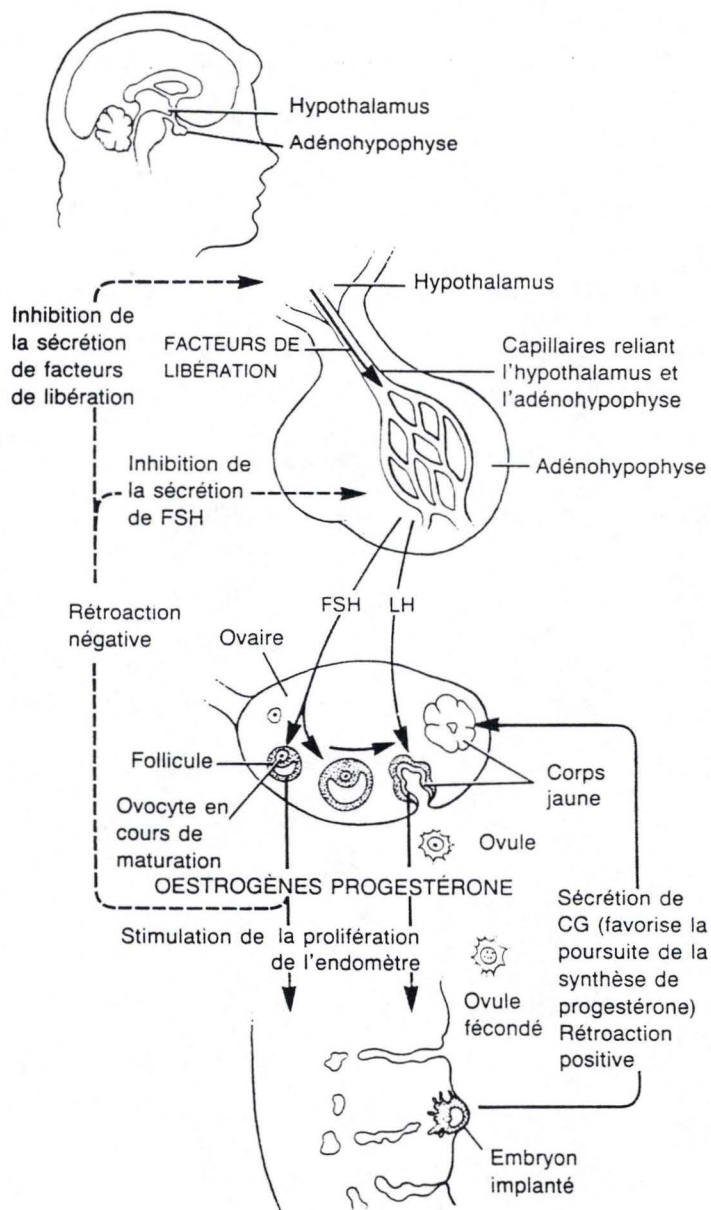


Fig.II.13 : Rétrocontrôles au niveau de l'ovaire (Darnell *et al.*, 1988)

trouvant en dessous du troisième ventricule. Richement vascularisée, elle est reliée à l'hypothalamus par un système porte traversant l'éminence médiane.

Elle est composée de parties différant en ce qui concerne leur origine embryologique, leur fonction et leur mécanisme de contrôle. Le lobe postérieur ou *neurohypophyse* est formé d'une évagination du plancher du tissu de l'hypothalamus et relié à celui-ci par la tige pituitaire. Elle sécrète principalement deux hormones par le mode de *neurosecrétion*, hormones qui agissent sur des tissus non endocriniens. C'est l'**ADH** (hormone antidiurétique) et l'**ocytocine** (Martin, 1985). Le lobe antérieur ou *adénohypophyse* provient d'une évagination de l'ectoblaste buccal, la poche de Rathke. Dans l'adénohypophyse, les cellules sécrétrices se classent en cellules *acidophiles* et *basophiles*, selon leurs affinités tinctoriales histochimiques. Parmi les cellules acidophiles, on distingue les cellules *somatotropes*, sécrétrices de l'hormone de croissance (**GH**, somatotropine, ST, hormone somatotrope) et les cellules *sécrétrices de PRL*. Les cellules basophiles sont les cellules *corticotrophes* (sécrétant l'**ACTH**, hormone adrénocorticotrope), les cellules *thyrotropes* (sécrétant la **TSH**, hormone thyrotrope, thyroid stimulating hormone) et les cellules *gonadotropes* (sécrétant la **FSH** et la **LH**; Martin, 1985). Cet épithélium glandulaire spécialisé entoure la posthypophyse et peut présenter une fente qui sépare l'adénohypophyse d'une fine zone de tissu appelé lobe *intermédiaire* et qui produit la **MSH** (Mélanotropin, α -mélanocyte stimulating hormone). Le lobe *tubéral* est une extension de l'adénohypophyse entourant la tige pituitaire.

Parmi les hormones hypophysaires, on décrira dans ce chapitre la **LH** et la **FSH**.

Sous l'influence de la GnRH, les cellules gonadotropes de l'adénohypophyse sécrètent les hormones gonadotropes LH et FSH. La concentration de l'hypophyse en gonadotropines est variable suivant les espèces et, dans une même espèce, suivant les races et les individus. Les proportions relatives de LH et 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 (Fig.II.13)

La **LH** et la **FSH** sont des glycoprotéines dimériques (α et β) d'un poids moléculaire de 30 kDa (LH) ou 32 kDa (FSH). Les deux chaînes α sont identiques alors que les chaînes β sont spécifiques à l'hormone. Les chaînes polypeptidiques sont associées de manière non covalente (Ronin, 1988). La LH présente un mode de sécrétion pulsatile qui entraîne durant les pics des taux plasmatiques pouvant atteindre 10 fois le taux basal. La fréquence de décharge est d'environ

Il pulse toutes les 4 à 8 heures (Bister et Paquay, 1983). En phase préovulatoire, on observe une sommation des pulses atteignant 100 fois le niveau de base résultant de décharges de LH dans des intervalles de plus en plus réduits: ce phénomène s'appelle *pic* ou *décharge préovulatoire* (Haresign *et al.*, 1984). Cette décharge dure entre 8 et 20 heures (Mandiki, 1991).

Au cours d'un cycle ovulatoire, les taux plasmatiques de FSH ne témoignent pas d'un mode de sécrétion pulsatile, mais présentent 3 vagues majeures d'une périodicité de 5 à 6 jours. Une des vagues coïncide avec les décharges ovulatoires de LH et GnRH (Bister et Paquay, 1983).

La LH et la FSH sont véhiculées dans le sang sous forme libre. Leur demi-vie est déterminée par leur teneur en acide sialique. Celui de la LH est estimé à 12 à 25 minutes tandis que celui de la FSH est de 3 à 4 heures (Derivaux et Ectors, 1986).

La LH et la FSH sont très importantes pour la stéroïdogénèse. En effet, les cellules de la thèque synthétisent et sécrètent des *androgènes* sous la stimulation de la LH. Ces androgènes servent de substrat aux cellules granulosales qui, sous l'influence de la FSH, transforment ces androgènes en E2 par des enzymes spécifiques notamment des *aromatases*. La FSH maintient entre autres l'intégrité des cellules granulosales et stimule leur métabolisme cellulaire. De plus, elle induit les récepteurs à la LH au niveau des follicules préantraux (Driancourt *et al.*, 1991). La LH joue un rôle important dans la maturation folliculaire et l'expulsion de l'ovocyte lors de l'ovulation (McNatty *et al.*, 1984) et stimule l'activité du corps jaune qui sécrète la P4.

En ce qui concerne la régulation de la sécrétion des deux hormones hypophysaires on est généralement d'accord pour impliquer la GnRH hypothalamique qui aurait un effet simultané sur les cellules responsables des deux types de sécrétions. Néanmoins l'hypothèse de l'existence d'une FSH-RH (FSH-releasing hormone) spécifique a été avancée, mais jusqu'à présent aucune preuve évidente n'a pu être prouvée (Rotten, 1991).

La sécrétion des gonadotropines hypophysaires est modulée également par les stéroïdes ovariens, à savoir la P4, l'E2 et l'androstènedione ($\Delta 4$) et d'autres hormones comme l'INH.

Il faut remarquer enfin une corrélation évidente existant entre les 3 vagues de sécrétion de FSH et les 3 vagues de croissance folliculaire (Jacques, 1989).

Un démarrage de croissance folliculaire est observé en coïncidence avec les teneurs plasmatiques élevées en FSH. Par après, les taux de FSH diminuent alors que les follicules se développent et réaugmentent alors que le nombre de follicules atreétiques augmente (Noël, 1994).

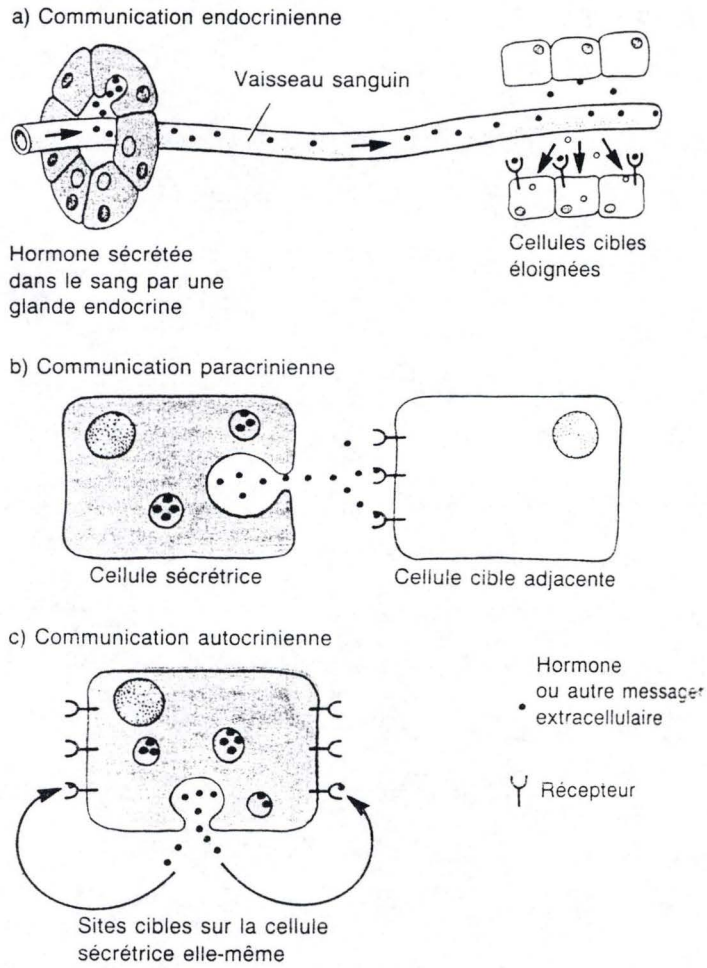


Fig.II.14 : Trois modes de communication intercellulaire (Darnell *et al.*, 1988)

L'hypothèse du contrôle de la croissance folliculaire est donc basée sur les effets rétroactifs unissant la FSH et les sécrétions folliculaires (Bister, 1991; Karsh *et al.*, 1993).

La première vague de développement folliculaire démarre avec la décharge préovulatoire. L'E2 et l'INH sécrétées d'autant plus que les follicules grossissent, induisent un feed-back négatif de plus en plus important qui aboutit à une forte diminution des taux de FSH dans le sang. A ce moment, la FSH n'est plus présente en quantité suffisante pour stimuler l'activité folliculaire et les follicules s'atrophient, ce qui permet une nouvelle hausse de FSH et une deuxième vague de croissance.

Chaque vague dure environ 6 jours. La troisième se déroulera donc après la lutéolyse; l'ovulation ne sera plus inhibée par la P4 et, les taux élevés d'E2, au lieu d'induire la chute de la FSH, provoqueront la décharge préovulatoire de GnRH, LH et FSH. Un ou quelques follicules de cette vague pourront alors ovuler.

4. L'hormone de croissance et son récepteur

4.A. Communication entre cellules: hormones et récepteurs (Darnell *et al.*, 1988)

Aucune cellule ne vit isolée. Il existe un réseau complexe de communications entre cellules pour coordonner la croissance, la différenciation et le métabolisme dans les divers tissus et organes. L'établissement de contacts spécifiques est essentiel pour la différenciation de plusieurs tissus. En petits groupes, les cellules communiquent entre elles par des contacts directs, mais elles doivent aussi pouvoir communiquer à des distances plus grandes. Pour cela, une *cellule signalante* sécrète une substance qui est captée par une *cellule cible* dans laquelle cette substance induit une réponse adéquate. Selon la distance à laquelle ces substances agissent, on distingue divers types de communication: (Fig.II.14)

- endocrine: les cellules signalantes n'appartiennent pas au tissu-cible; elles sécrètent des hormones véhiculées par le sang.
- paracrine: les cellules cibles sont adjacentes aux cellules signalantes. C'est le cas des neurotransmetteurs et des cybernines (par ex. les facteurs de croissance) qui assurent une activité coordonnée des cellules d'un tissu.
- autocrine: la cellule répond à des substances qu'elle a elle-même sécrétées.

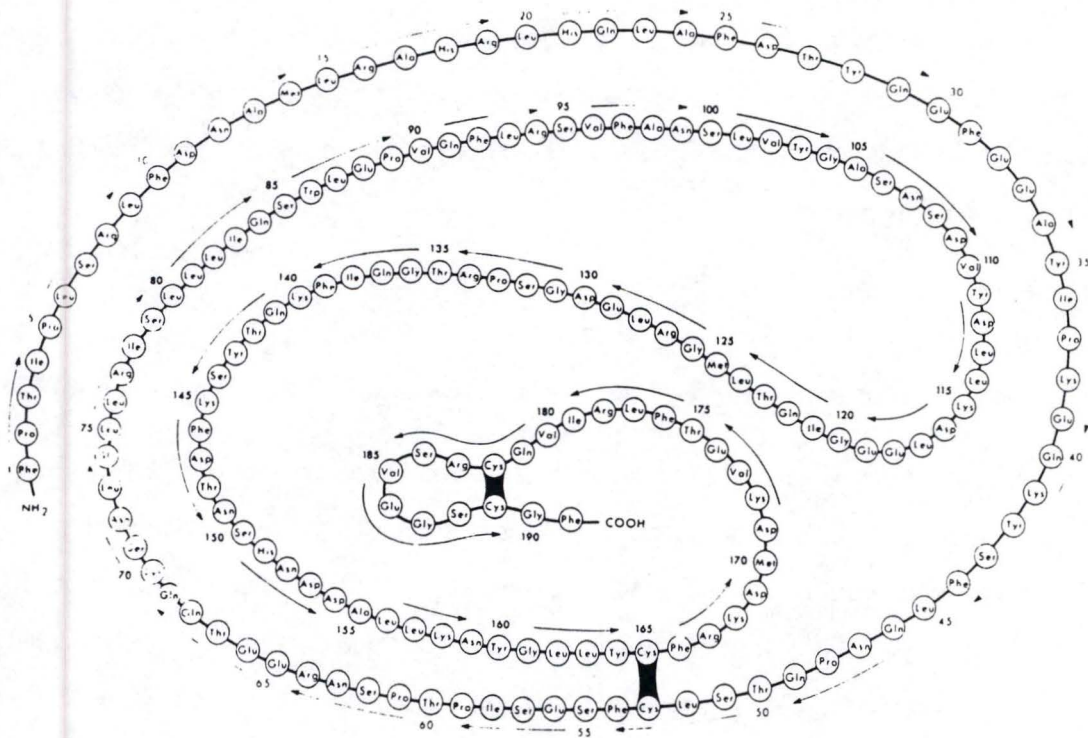


Fig.II.15 : La séquence des acides aminés de la hGH (Martin, 1985)

La communication par messagers extracellulaires nécessite 6 étapes: la synthèse, la sécrétion, le transport, la détection, la transduction du signal et la réponse.

Des récepteurs spécifiques servent d'intermédiaire dans la réponse des cellules aux messagers extracellulaires. La cellule cible possède des récepteurs protéiques comportant un ou des sites de liaison ayant une grande affinité pour un messager particulier. Lorsque le messager se lie au récepteur, le complexe ligand-récepteur amorce une séquence de réactions qui modifient le fonctionnement de la cellule. La réponse dépend du récepteur et de la réaction intracellulaire provoquée par la liaison de cette hormone à son récepteur. Elle dépend donc du nombre mais aussi de la spécificité de liaison et de la spécificité effectrice des récepteurs.

En règle générale, la réponse de la cellule cible aux hormones hydrosolubles se produit en quelques secondes ou minutes. Souvent elle consiste à changer une activité enzymatique présente. Par contre, l'action des hormones liposolubles (comme les hormones stéroïdes) change le mode d'expression génétique et est plus lente et de plus longue durée. Ces hormones interviennent par exemple dans la croissance et la différenciation.

L'hormone est emmagasinée dans des granules de sécrétion en dessous de la membrane plasmique de la cellule signalante. Ce système permet d'avoir une réserve suffisante pour assurer une autonomie d'action de un à plusieurs jours. Une stimulation (hormonale ou nerveuse) provoque l'exocytose du produit de sécrétion.

Souvent, l'hormone n'est pas sécrétée de façon active mais sous forme d'un polypeptide plus long, la "prohormone", laquelle sera clivée par des enzymes spécifiques afin de devenir active.

La demi-vie des hormones, et donc la durée de leurs effets, est de quelques minutes ou heures. En effet, les protéases du sang et des tissus détruisent les hormones et stoppent ainsi leur activité. Par contre, les stéroïdes et la thyroxine s'associent à des protéines vectrices, leurs effets peuvent s'étendre à quelques jours.

4.B. L'hormone de croissance (Martin, 1985)

a. Structure de la GH

L'hormone de croissance, également appelée somatotropine, hormone somatotrope ou GH (Growth Hormone) est un polypeptide dépourvu d'hydrates de carbone ayant un poids moléculaire apparent entre 19.500 et 22.000 Daltons, la taille variant d'une espèce à l'autre. Chez

le mouton, la GH a un poids moléculaire de 47.800 Daltons et se présente probablement sous forme d'un dimère (Fig.II.15).

Des préparations purifiées contiennent des mélanges complexes d'hormones de croissance mais la mieux connue est la "*hGH little*" (petite hormone de croissance humaine) dont le poids moléculaire est de 21.500 et qui possède 191 acides aminés (aa) et deux ponts disulfures reliant les aa 51-165 et 183-189. Le nombre de ponts disulfures chez le mouton s'élève à 5.

La GH est synthétisée sous forme d'une "pré-protéine" (prohormone) comportant une séquence signal de 26 aa et d'un poids moléculaire de 4.500. La prohormone est activée par excision de cette séquence grâce aux enzymes protéolytiques situées au niveau des membranes plasmiques dans l'hypophyse mais aussi en périphérie. Les molécules de GH peuvent former des liaisons non-covalentes. Le résultat est la formation de dimères ou même d'agrégats plus volumineux. On a observé des complexes qui, de cette manière, avaient un poids moléculaire de 160.000 chez l'homme et de 70.000 à 200.000 chez le rat. Ces "big GH's" n'ont plus aucune immunoréactivité mais préservent néanmoins une faible activité de stimulateur de croissance.

L'hormone de croissance fait partie d'une famille de protéines reliées chimiquement et biologiquement. Dans cette famille on trouve la somatotropine chorionique (CSH), Placental Lactogen (PL) ou la somato-mammotropine chorionique et la PRL qui ressemble à la GH. La hCSH est un peptide de 191 aa dont 85% sont communs avec la hGH. Son ARNm présente 92% d'homologie avec celui de la hGH. La comparaison des séquences aminées des hormones entre différentes espèces montre que la GH bovine (bGH), la GH ovine (oGH), la GH équine (eGH) et la GH porcine (pGH) présentent 65% d'homologie (Paladini *et al.*, 1983).

Chaque espèce a sa propre GH mais il y a une forte conservation de la séquence au sein de l'évolution. Les différentes hormones semblent dériver d'un gène ancestral commun.

b. Mode et contrôle de la sécrétion de la GH

La GH est synthétisée et sécrétée par les cellules somatotropes de l'adénohypophyse.

La plupart des auteurs s'accordent à dire que la GH est sécrétée de façon pulsatile. Chez des rats mâles la fréquence des pulses de sécrétion de GH est de 0,3/heure (Hochberg *et al.*, 1994). Chez la brebis, la concentration de GH dans le sang est de l'ordre de 20 ng/ml (Lagache, 1994).

Les mécanismes qui régulent le niveau de base, la fréquence et l'amplitude des pulses de sécrétion sont encore loin d'être élucidés car ils sont très variés.

Au niveau primaire, les hormones hypothalamiques contrôlent la synthèse et la sécrétion de la GH. La somatolibérine ou GHRH (Growth Hormone Releasing Hormone) stimule sa sécrétion tandis que la somatostatine ou GIH (GH Inhibiting Hormone) l'inhibe. Le problème se complique lorsque l'on sait que la TRH (Thyréotropine Releasing Hormone) responsable de la sécrétion de la TSH et de la PRH (Prolactin Releasing Hormone), possède également une action non négligeable sur la libération de GH. D'autre part, la GIH qui est un neuromédiateur, est également sécrétée comme hormone par le pancréas endocrine.

c. Les régions cérébrales impliquées dans le contrôle de la sécrétion de la GH

L'hypothalamus a des connections avec d'autres parties du cerveau et une stimulation nerveuse venant de différentes régions (hippocampus, amygdala) se répercute sur le mode de sécrétion de la GH. Parmi les autres substances qui contribuent au contrôle de la sécrétion de la GH, on note la dopamine, la noradrénaline, la sérotonine, la β -endorphine et d'autres neurotransmetteurs.

La plupart des stimulations nerveuses qui influencent l'action de l'hypothalamus sur la sécrétion de GH proviennent des noyaux ventromédians et arqués de l'hypothalamus.

Ces multiples connexions expliquent l'énorme influence des facteurs environnementaux et humoraux sur la libération de la GH. Le moment de la journée, l'état nutritionnel, la glycémie et les acides aminés circulants, l'âge et le sexe ne sont que quelques facteurs modifiant de manière très significative la sécrétion de GH. Chez les primates, les moutons et beaucoup d'autres espèces, une augmentation de la sécrétion de GH se produit suite à un stress: ce n'est pas le cas pour le rat et d'autres rongeurs (Mustafa *et al.*, 1994).

L'équilibre endocrinien modifie également le mode général de libération de la GH. Les effets se font sentir via le contrôle neuroendocrinien ou par un effet direct au niveau hypophysaire.

Les glucocorticoïdes augmentent la sensibilité des cellules somatotropes envers la GHRH et diminuent cette sensibilité envers la GIH.

Les oestrogènes accélèrent la synthèse de GH et augmentent la concentration de l'hormone dans l'hypophyse. La sensibilité des cellules somatotropes envers certains stimulants

est également augmentée. Pourtant, certains effets sont masqués en présence de glucocorticoïdes et les effets des oestrogènes se trouvent controversés. Enfin, GH et PRL autocontrôlent leur propre sécrétion au niveau hypophysaire.

d. Les Somatomédines

Des tests sur les effets de la GH sur la croissance d'explants de cartilage ont permis de tirer diverses conclusions. Les séra d'animaux intacts sont capables de stimuler cette croissance alors que les séra d'animaux hypophysectomisés en sont incapables. La GH ne restitue pas l'effet stimulateur de croissance quand elle est additionnée au sérum alors que des séra d'animaux hypophysectomisés prétraités avec la GH ont un effet stimulateur sur la croissance du cartilage. Il est donc évident que certaines actions de la GH sont dues à elle-même, d'autres sont provoquées par des substances médiatrices. Celles qui possèdent cette propriété sont appelées 'somatomédines' (SM). Celles-ci constituent un groupe de peptides GH-dépendants et agissent sur l'os, favorisent la synthèse de collagène et de protéines et ont une activité Insuline-like.

Au fur et à mesure de l'avancement des découvertes, de nombreuses substances susceptibles d'être des somatomédines ont été isolées ou suspectées et baptisées de différents noms. Elles sont rapportées ici pour mémoire. Les substances connues sont:

- les **NSILA** (nonsuppressible insulin-like activity), représentées probablement par les IGF-I et II,
- les **Somatomédines C (SMCs)**, dont la production dépend fortement de la GH et qui ont une configuration moléculaire fort semblable à celle de la proinsuline. Elles sont indistinguables d'un point de vue immunologique des IGF-I (Insuline-like Growth Factor I), de même que d'un point de vue liaison au récepteur d'IGF-I,
- les **Somatomédines A (SMAs)**, qui ressemblent aux SMCs et qui pourraient être identiques aux IGF-II. Les SMAs interviendraient lors de la croissance fœtale, les SMCs après la naissance,
- le **MSA** (Multiplication Stimulating Activity), qui est un peptide d'un poids moléculaire de 7.000 à 13.000 et qui pourrait être identique à la SMA. Le taux dépend fortement de la GH,
- le facteur de croissance pour le squelette,

- le **BGA** (Brain Growth-promoting Activity) qui est un mitogène potentiel pour les neuroblastes humains et du rat et dont le taux de sites de liaison est plus élevé lors de la phase de croissance fœtale du cerveau.

La nouvelle nomenclature réunit les médiateurs de la GH et d'autres substances contrôlant la multiplication ou la différenciation cellulaire sous l'appellation "facteur de croissance" ou **GF** (Growth factors).

Appartiennent aux facteurs de croissance, outre les IGF-I et II:

- la **somatomédine B** qui favorise la croissance des cellules gliales,
- les **EGF** (Epidermal Growth Factors) qui stimulent la croissance de l'épiderme, la kératinisation et la différenciation des fibroblastes,
- les **NGF** (Nerve Growth Factors), régulés par les androgènes et les hormones thyroïdiennes et qui influencent la maturation du système nerveux sympathique,
- les **FGF** (Fibroblast Growth Factors) qui stimulent les cellules endothéliales vasculaires, les myoblastes et les fibroblastes amniotiques et,
- les **PDGFs** (Platelet Derived Growth Factors) qui sont sécrétés par les plaquettes sanguines et stimulent la croissance des fibroblastes, des cellules musculaires lisses artérielles et des cellules gliales. Elles favorisent la migration cellulaire, le transport d'acides aminés (aa), la synthèse de cholestérol et de protéines.

D'autres peptides encore sont impliqués dans la croissance et la prolifération. Citons parmi ceux-ci:

- l'érythropoïétine et les **CSFs** (Colony Stimulating Factors) qui contrôlent la multiplication et la différenciation des éléments figurés du sang.

Tous ces facteurs de croissance appartiennent à la fois aux systèmes de contrôle endocrine et paracrine, ceci à des niveaux divers et apparemment, sous des contrôles différents d'une substance à l'autre et d'un système à l'autre. Ils se retrouvent dans la plupart des tissus.

Des récepteurs aux GFs sont distribués partout dans l'organisme et présentent des spécificités variables. Ainsi, un récepteur 'growth factor type I' a été identifié dans le muscle squelettique. Il lie avec une forte affinité l'IGF-I, avec une moindre affinité l'IGF-II et très faiblement l'INH.

e. Actions de la GH

Actuellement, il est prouvé que la GH est une hormone impliquée dans les mécanismes de régulation et de développement folliculaire. Cet effet se manifeste soit de manière directe par les récepteurs spécifiques de la GH présents sur différents sites ovariens, soit de manière indirecte, en modulant la libération d'autres hormones sanguines (Monget, 1993).

e.1. Effets de la GH sur les sécrétions hormonales

Les concentrations en **IGF-I** dans le plasma et dans le fluide folliculaire peuvent être influencées par la GH. En effet, l'administration *in vivo* de l'hormone de croissance augmente les teneurs plasmatiques moyennes en IGF-I chez différentes espèces telles, la brebis (Perrad, 1994), le porc, le rat (Davoren *et al.*, 1986), la vache (Davis *et al.*, 1990). Chez la femme, ce même traitement augmente la teneur en IGF-I dans le plasma et dans le fluide folliculaire (Barecca *et al.*, 1990 et Christman et Halme, 1992).

L'administration de GH *in vivo* a également pour effet d'augmenter la teneur plasmatique moyenne en **INH** chez la brebis (Perrad, 1994) et la vache (Gong *et al.*, 1991; Webb *et al.*, 1994).

Les gonadotropines hypophysaires peuvent également être influencées par l'administration de GH. C'est ainsi que chez la brebis, des injections quotidiennes diminuent les concentrations plasmatiques en **FSH** et ce, quel que soit l'état physiologique de l'animal. Ce même traitement supprime également son émission sous formes de vagues normalement observées en début et milieu de saison de reproduction (Perrad, 1994). Chez la vache par contre, aucune modification des sécrétions plasmatiques en FSH n'est observée suite au traitement (Gong *et al.*, 1991). Pour ce qui est de la **LH**, ni la teneur plasmatique moyenne, ni le mode d'émission ne sont modifiés suite aux injections quotidiennes *in vivo* de GH chez la brebis (Perrad, 1994) et chez la vache (Gong *et al.*, 1991).

L'hormone de croissance, injectée chez la brebis *in vivo*, ne modifie pas les teneurs plasmatiques moyennes de **P4** et **E2** (Perrad, 1994). Par contre, elle semble modifier la stéroïdogénèse des cellules folliculaires cultivées et stimulées *in vitro*. Comme le montrent des expériences effectuées sur des cultures de cellules lutéales humaines (Mason *et al.*, 1990) et ovines (Juengel *et al.*, 1994), la GH augmente le taux de progestérone sécrétée par ces cellules. De

même, la GH agit en synergie avec la FSH sur la production d'oestrogènes et de récepteurs à la LH par les cellules granulosales de rat (Lippe et Nakamoto, 1993).

e.2. Effets de la GH sur les croissances folliculaires et les taux d'ovulation

La croissance folliculaire peut également être influencée par la GH. Lorsque celle-ci est injectée quotidiennement à des vaches, elle modifie le recrutement folliculaire et augmente le nombre de petits follicules. Cette action sur la croissance est liée à une augmentation de la concentration périphérique en IGF-I et insuline. La dynamique et le nombre de vagues de croissance folliculaire, ainsi que le taux d'ovulation ne sont pas affectés par le traitement (Gong *et al.*, 1991). Si les injections de GH sont suivies d'une injection de PMSG (gonadotropine possédant une action comparable à celle de la LH et de la FSH; Gong *et al.*, 1993) ou de FSH, le taux d'ovulation est alors significativement augmenté.

Chez la brebis par contre, quelle que soit la période de l'année analysée, un traitement à la rbGH 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. En saison de reproduction, le traitement améliore la croissance folliculaire terminale en augmentant le nombre de follicules recrutés, sélectionnés et dominants. Il a également pour effet de mener un plus grand nombre de follicules dominants jusqu'à l'ovulation. En période d'anoestrus, le traitement augmente le nombre de follicules sélectionnés et dominants (Perrad, 1994).

Une augmentation du taux d'ovulation est également obtenue chez la truie suite à un traitement quotidien de GH durant l'entièreté du cycle (Kirkwood *et al.*, 1988).

f. Effets métaboliques de la GH

La GH participe à l'homéostasie de la glycémie. Quelques minutes après l'injection de GH, le foie stoppe la sécrétion de glucose et la glycémie chute. Suite à une sécrétion d'hormones hyperglycémiantes (glucagon), la glycémie retourne à la normale après 30 minutes.

Lorsqu'on ajoute la GH à du muscle squelettique *in vitro*, on observe une internalisation accélérée de glucose après 20 minutes.

L'hormone, administrée à des doses modérées, favorise le stockage du glucose sous forme de glycogène dans le muscle squelettique en augmentant l'activité glycogène synthétase.

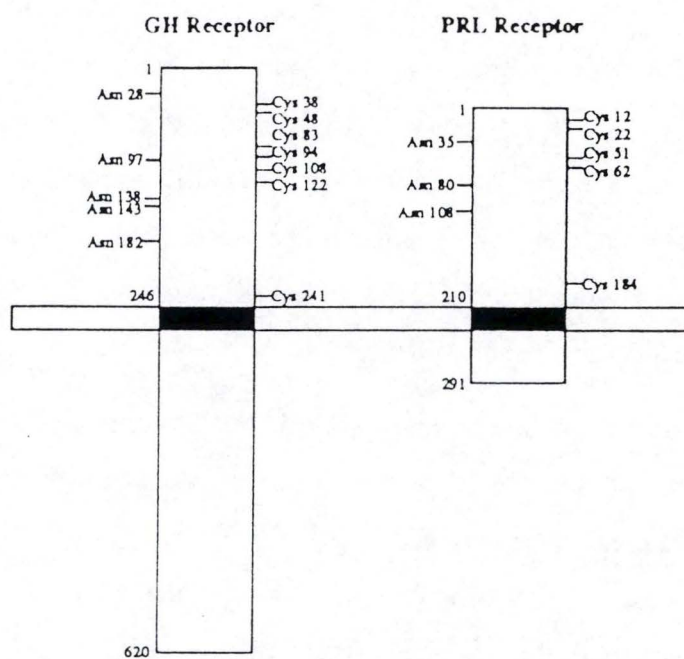


Fig.II.16 : Représentation schématique du récepteur GH et PRL (Kelly *et al.*, 1993)

Elle antagonise les effets glycolytiques et elle est lipolytique. Ces effets peuvent être potentialisés par des glucocorticoïdes et la théophylline.

Quand la GH est administrée *in vitro* à du muscle squelettique d'animaux hypophysectomisés, on observe une accélération de l'internalisation de certains aa alimentaires. La sélectivité diffère de celle observée pour l'insuline. La période de latence et la durée de la réponse sont semblables à celles observées pour l'internalisation du glucose mais les mécanismes sont différents.

La GH accélère l'incorporation des aa dans les protéines et le site d'action pour cet effet pourrait être la petite sous-unité 40 S des ribosomes car les organelles prélevées d'animaux hypophysectomisés montrent des taux subnormaux d'incorporation. Un prétraitement à la GH normalise le taux d'incorporation.

4.C. Le récepteur de l'hormone de croissance

Le récepteur membranaire de la GH (GHR) appartient à la famille des récepteurs hématopoïétiques et est structurellement apparenté à ceux de la PRL.

La présence de récepteurs membranaires spécifiques sur les cellules cibles avait été démontrée il y a de nombreuses années. Cependant, ce n'est qu'à la suite du clonage de l'ADN complémentaire (ADNc) du récepteur, réalisé pour la première fois en 1987 chez l'homme et le lapin, que certains aspects du mécanisme de transduction du signal hormonal ont pu être élucidés au niveau moléculaire (Le Cam et Legraverend, 1993). Depuis, le récepteur a été cloné chez diverses espèces, dont l'homme, le lapin, le rat, la souris, la vache, la brebis, le porc et le poulet.

a. Structure

Le GHR est une protéine transmembranaire composée de trois domaines: extracellulaire, transmembranaire et intracytoplasmique. La famille des récepteurs GH/PRL/cytokines présente trois caractéristiques principales:

- 2 paires de cystéines presque toujours dans la région N-terminale,
- un motif WSXWS (tryptophane, sérine, acide aminé quelconque, tryptophane, sérine) hautement conservé, proche de la région C-terminale, trouvé partout dans les membres de cette famille sauf chez le GHR.

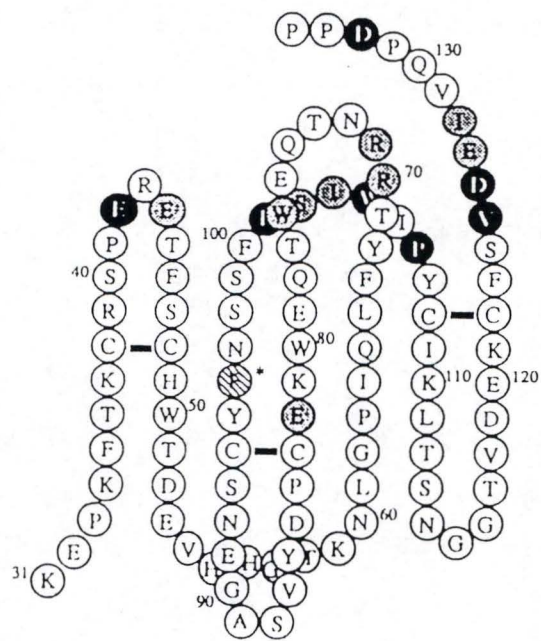


Fig.II.17 : Résidus d'une partie du domaine de la région extracellulaire du récepteur GH impliqué dans la liaison de la hGH (Kelly *et al.*, 1993)

- peu de conservation de la séquence intracytoplasmique. Néanmoins, trois régions, appelées " boîte 1 ", " boîte 2 " et " boîte 3 " se trouvent chez beaucoup de membres de cette famille (Kelly *et al.*, 1994) (Fig.II.16).

Chez le lapin et chez l'homme, le GHR est une protéine d'une seule chaîne de 620 aa. Le domaine extracytoplasmique comporte 246 aa, 5 sites potentiels de N-glycosylation et 2 paires de ponts disulfures intracaténares, impliqués dans la liaison à la GH (Maes *et al.*, 1995).

La région de liaison à la GH implique environ 100 aa, mettant en jeu les 4 premières cystéines. Cette région forme 7 brins antiparallèles groupés en sandwich avec un feuillet β (Kelly *et al.*, 1994).

A cette partie extracellulaire se joint la partie transmembranaire hydrophobe, composée de 24 aa (Maes *et al.*, 1995).

La partie intracellulaire comporte 350 aa. Elle est responsable de la transmission du message via la phosphorylation d'au moins une tyrosine kinase, appelée **JAK2** (just another kinase; Maes *et al.*, 1995). Cette partie de la protéine comporte 10 résidus tyrosine susceptibles d'être phosphorylés, 6 d'entre eux étant fortement conservés dans plusieurs espèces (Kelly *et al.*, 1993).

L'affinité de liaison K_a pour la GH est de $10 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, le poids moléculaire (PM) du récepteur est d'environ 130 kDa .

Le PM du récepteur déglycosylé est de 95.000, ce qui est considérablement plus élevé que le PM de 70.000 calculé à partir de la séquence d'ADN. Aucune explication détaillée pour cette différence entre le récepteur glycosylé de 130.000 et le PM théorique de 70.000 n'a été trouvée jusqu'à maintenant, même si certains considèrent qu'une molécule d'ubiquitine se lie de façon covalente au récepteur. Mais cette ubiquitine n'apporterait qu'un supplément de PM de 10.000 environ (Kelly *et al.*, 1993).

La découverte, chez les patients présentant le syndrome de Laron, de formes mutantes du récepteur incapables de lier l'hormone, a permis de localiser le site de liaison à la GH au niveau de la phénylalanine 96 (Fig.II.17). La délétion des 165 aa de la partie carboxyterminale du récepteur a peu ou pas d'effet sur la liaison de l'hormone, l'internalisation du récepteur, la stimulation de la synthèse lipidique et de la prolifération cellulaire, la stimulation des protéines kinases activées par les mitogènes (MAP kinases) et la phosphorylation du récepteur sur des résidus tyrosine. En

revanche, la délétion complète du domaine intracellulaire abolit toutes ces activités, hormis la liaison de l'hormone. La partie juxtamembranaire du domaine intracellulaire du récepteur comprend une région riche en proline (aa 279 à 293), absolument requise pour l'activation transcriptionnelle, appelée "boîte 1" (Le Cam et Legraverend, 1993). Les aa hydrophobes (ILV) de la région N-terminale des 8 aa de la boîte 1 seraient essentiels à l'action fonctionnelle du GHR (Kelly *et al.*, 1994).

On a supposé que le GHR existe sous différentes formes. Des expériences de liaison de la GH aux membranes de foie de lapin, l'"épitope mapping" avec des anticorps monoclonaux anti-GHR et des études de cross-linking ont montré différentes formes du GHR dans le foie de souris et de l'homme, et dans des cellules RIN, une lignée de cellules tumorales d'ilôt de Langerhans (pancréas) de rat. L'origine et la signification physiologique de ces différentes formes de récepteurs reste inconnue (Kelly *et al.*, 1993).

Ces formes résulteraient de différentes modifications post-traductionnelles d'une seule protéine puisque, jusqu'à présent, un seul gène a été identifié. Chez le mouton, on a trouvé un seul transcrit de 4,5 kb pour le GHR (Kelly *et al.*, 1994).

b. Localisation

Le GHR a été trouvé dans de nombreux tissus et cellules, mais les hépatocytes et les adipocytes sont les cellules dans lesquelles le niveau d'expression est le plus élevé. L'expression du récepteur de l'hormone de croissance varie au cours du développement. Dans le foie, le taux de transcrit de 4,5 kb est très faible durant la vie foetale, augmente 20 à 30 jours après la naissance et se stabilise à environ 40 jours. La capacité des cellules hépatiques à lier l'hormone apparaît d'une manière concomitante et reste constante durant la vie adulte (Le Cam et Legravende, 1993).

En ce qui concerne la localisation du GHR au niveau de l'ovaire, les avis sont partagés.

Chez le bovin, la plupart des follicules ne possèdent pas le GHR (Lucy *et al.*, 1993). De même pour le stroma ovarien, le tissu conjonctif, l'endothélium et les érythrocytes qui n'expriment pas le GHR. Par contre, le corps jaune, et spécialement les grandes cellules lutéales montrent le niveau le plus élevé d'expression, les petits cellules thécales n'exprimant pas le GHR.

Chez l'homme, l'ARNm du GHR a été trouvé dans les cellules granuleuses de follicules dominants et antraux, ainsi que dans le corps jaune, les *corpus albicans* et l'endothélium (Shahara

et Nieman, 1994). L'ARNm n'a pas été trouvé dans les follicules préantraux, la thèque interne, les ovocytes, ni dans le stroma. Dans les tissus où le GHR est observé on peut trouver un transcrite majeur de 4,5 kb et un transcrite mineur de 1,3 kb (Carlsson *et al.*, 1992).

Chez le rat, les transcrits de GHR et GHBP (protéine de liaison de la GH) sont exprimés dans les follicules et moins dans le corps jaune (Carlsson *et al.*, 1993).

Dans le cerveau de rat, le plexus choroïde contient des quantités importantes de sites de liaison pour la hGH. Le nombre est comparativement plus élevé chez la femelle que chez le mâle (Blumenfeld et Amit, 1994).

c. Régulation de l'expression

L'expression du GHR est contrôlée par diverses hormones et d'une manière différente selon les tissus. Ainsi, l'hypophysectomie, dont la conséquence majeure est une perte de production de l'hormone de croissance, des hormones thyroïdiennes et de glucocorticoïdes, diminue l'expression du GHR dans l'adipocyte mais l'augmente dans l'hépatocyte. La GH, la thyroxine et les glucocorticoïdes rétablissent l'expression adipocytaire des récepteurs chez les animaux hypophysectomisés et augmentent la capacité des hépatocytes en culture à lier l'hormone.

L'expression des GHRs hépatiques (ARNm et protéine) augmente au cours de la grossesse et diminue lors du jeûne. Ceci concorde avec l'effet lipolytique et hypoglycémiant de la GH. Talamantes (1994), observe chez la souris une élévation importante du taux de protéines et de l'ARNm de GHR et GHBP lors de la gestation. L'expression du mGHR (ARNm du GHR) et du mGHBP (ARNm de la GHBP) pendant la gestation est régulée par des facteurs comme la GH et le nombre d'unités placentales-foetales.

Diverses substances, éventuellement non hormonales, sont susceptibles de modifier le nombre de GHR. La diminution de l'expression du GHR avec le temps lors d'une culture d'hépatocytes porcins est moins prononcée lorsque des taux élevés de glucose (5g/l) sont additionnés au milieu de culture (Bramfeld *et al.*, 1995). De même, l'addition de 100 nmol/l de dexaméthasone augmente l'expression du GHR et du récepteur à l'IGF-I.

L'addition de T₃ ou T₄ augmente l'expression de l'ARNm du GHR induite par la dexaméthasone, alors que la T₄ seule n'élève l'expression du récepteur à l'IGF-I que légèrement.

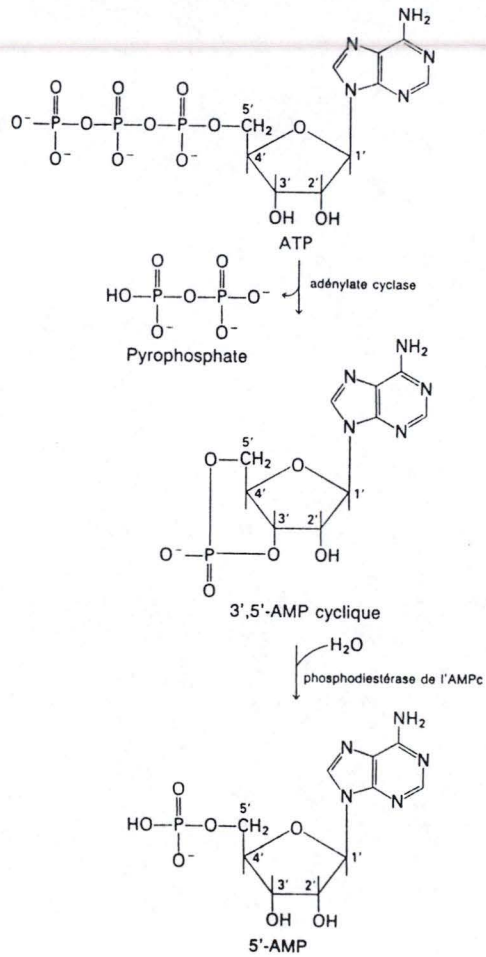


Fig.II.19 : Synthèse et dégradation de l'AMPc (Darnell et al., 1988)

I = Forme inactive d'une enzyme
 A = Forme active d'une enzyme

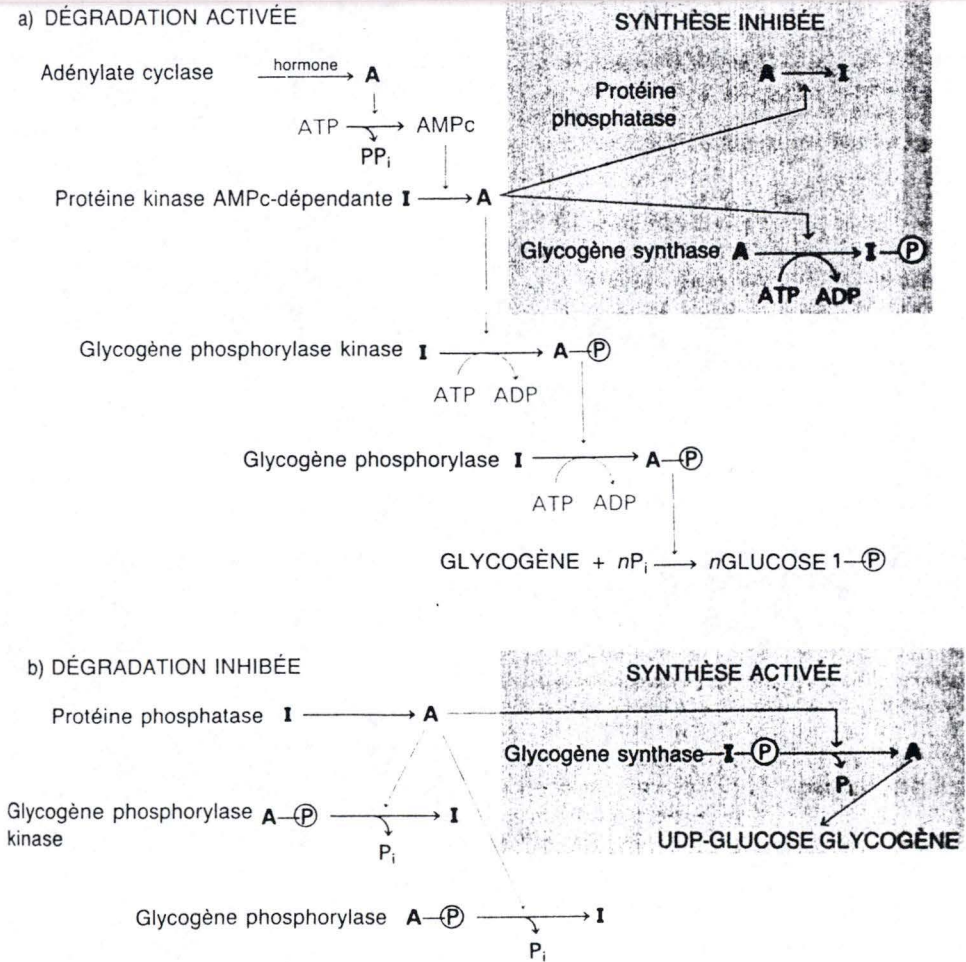


Fig.II.18 : Phosphorylation en cascade : exemple (Darnell et al., 1988)

Ceci démontre une interaction des glucocorticoïdes et des hormones thyroïdiennes avec l'axe GH-IGF-I.

Maes *et al* en 1995 étudient la liaison de la GH au tissu hépatique du rat en fonction de l'âge et du sexe. On constate que le taux de liaison est très faible durant la période néonatale, qu'il augmente ensuite rapidement durant la période prépubertaire pour plafonner chez le jeune rat adulte. Par la suite, on observe un dimorphisme sexuel; le foie de la femelle liant 2 à 3 fois plus de GH que celui du mâle adulte. Le nombre de récepteurs change, mais pas l'affinité de liaison.

Hochberg *et al.* en 1994 observent que chez le rat mâle non-traité à la GH, la demi-vie du GHR est de 45 à 100 minutes. En un laps de temps de 180 minutes le GHR disparaît, se recycle et réapparaît à la surface cellulaire. L'administration de GH toutes les 45 minutes à des rats hypophysectomisés réduit cet intervalle à 135 minutes et une administration continue de GH fait que ce cycle se fait en 90 minutes.

d. Formation et devenir du complexe hormone-récepteur

Le mode d'action de l'hormone de croissance est très peu connu ainsi que la transduction du signal par le GHR. Récemment on a observé des GHR à l'intérieur du noyau, ce qui laisse soupçonner l'énorme complexité de fonctionnement du complexe GH-GHR.

La liaison d'une hormone peptidique à son récepteur déclenche une cascade de réactions qui vont finalement aboutir à changer l'activité des enzymes de la cellule cible. Pour y parvenir, trois voies sont décrites: celle de la phosphorylation en cascade, celle des médiateurs lipidiques et celle de l'action intranucléaire directe.

d.1. La voie de la phosphorylation en cascade (Darnell et al., 1988) (Fig.II.18)

Une molécule de GH se lierait à deux molécules de GHBP. La formation de ce dimère serait nécessaire pour l'activité biologique de l'hormone. C'est ce complexe qui se lierait au GHR et induirait la chaîne des phosphorylations (Kelly *et al.*, 1994).

La dégradation et la synthèse du glycogène dans le foie et les muscles sont un exemple pour la voie de la phosphorylation en cascade. Ce mécanisme est déclenché par une élévation du taux d'*AMPC*. Celui-ci est généré par une *adénylate cyclase* (AC) activée suite à la liaison d'une hormone à son récepteur (Fig.II.19)

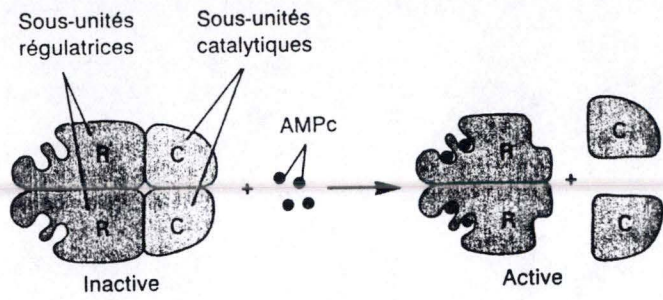


Fig.II.20 : Activation de la protéine kinase AMPc-dépendante (Darnell *et al.*, 1988)

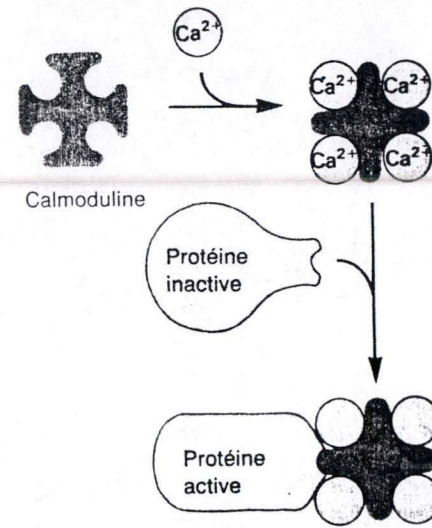


Fig.II.22 : Activation d'une enzyme par la Ca^{++} - Calmoduline (Darnell *et al.*, 1988)

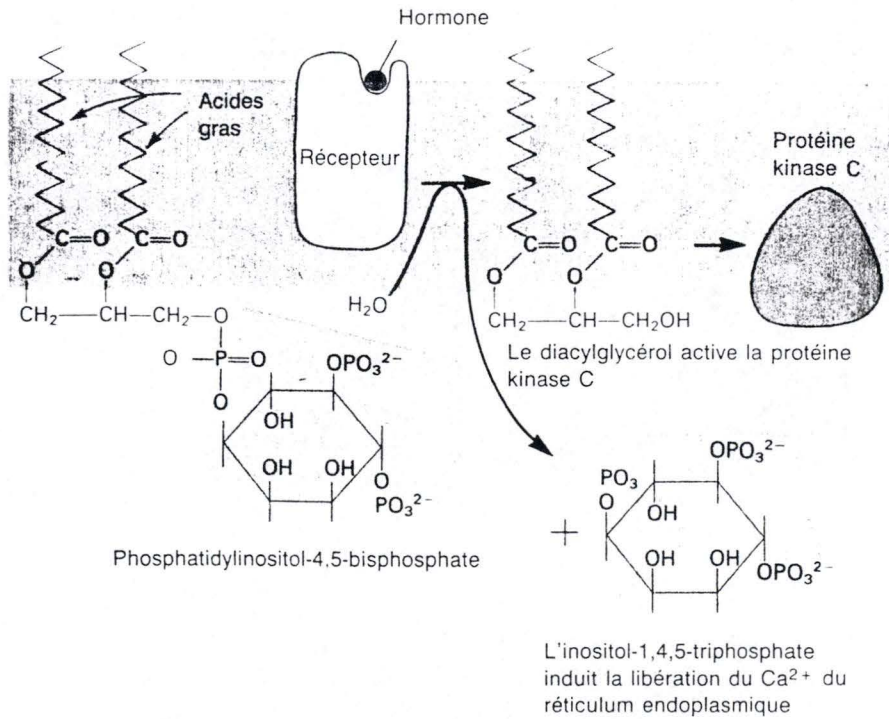


Fig.II.21 : La voie des médiateurs lipidiques (Darnell *et al.*, 1988)

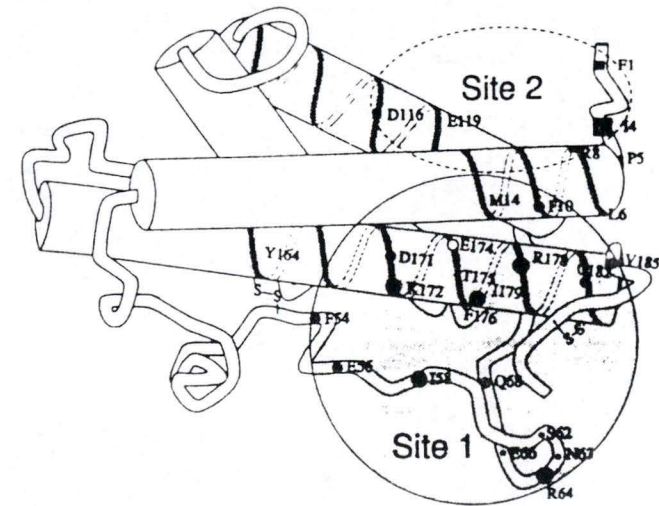


Fig.II.23 : Site 1 et 2 de la hGH (Waters *et al.*, 1994)

L'adénylate cyclase (AC) est une protéine se trouvant sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique. Elle catalyse la formation de l'AMPc.

La protéine G est composée de trois polypeptides: α , β et γ . La GTP se lie de façon non covalente à la protéine G, plus précisément à la sous-unité α . La protéine G se lie au récepteur et à l'AC. Lorsque le GTP se lie à la sous-unité α , ce complexe peut se lier à l'AC qu'il active. L'AC catalyse ensuite la formation de l'AMPc à partir de l'ATP. Lorsque la GTP est hydrolysée en GDP, la sous-unité α se dissocie de l'AC et se réassocie aux autres sous-unités de la protéine G.

L'AMPc est le messenger second de plusieurs hormones. Il modifie l'activité enzymatique par l'intermédiaire de *protéines kinases AMPc-dépendantes*. (Fig.II.20)

Les protéines kinases transfèrent le groupement phosphate de l'ATP à des sérines, thréonines ou tyrosines de leurs substrats protéiques. La forme ainsi phosphorylée de plusieurs enzymes est beaucoup plus active que la forme déphosphorylée.

Un premier contrôle du taux d'AMPc s'effectue au niveau de l'AC lors de sa génération. Les phosphodiesterases (PD) dégradent l'AMPc. Plusieurs PDs sont activées par une hausse en Ca^{++} cytosolique. Le Ca^{++} se lie à la calmoduline, protéine omniprésente. Suite à la fixation du complexe Ca^{++} -calmoduline la PD hydrolyse l'AMPc (Fig.II.21 et II.22).

Kelly et collaborateurs (1994) observent que les premières et quatrièmes hélices α de la GH du bovin interagissent directement avec le récepteur, pendant que la troisième hélice interagirait avec une autre molécule indispensable à l'activité fonctionnelle (Fig.II.23). Cette molécule, une protéine, serait une deuxième molécule de récepteur. Il y a donc formation d'un homodimère: 2 molécules de récepteur se liant avec une molécule de GH. L'auteur conclut que sur la hGH (hormone de croissance humaine) on a 2 sites identiques, site 1 et site 2, se liant à la même région de hGHR. La séquence proposée est celle-ci: la GH se lie par son site 1 à une première molécule de GHR, puis, par son site 2, à une deuxième molécule de GHR suivi par une interaction entre les molécules de récepteur qui maintient le dimère. Les observations de (Herington, 1993) vont dans le même sens. Pour lui, le rapprochement physique des deux domaines extracellulaires génère une conformation qui permet l'interaction avec les facteurs de transduction du signal. Il constate également qu'une autre protéine membranaire, non-liante de GH, s'associe au GHR. Un arrangement pareil est analogue à l'association du récepteur IL-6 (un

membre de la famille des récepteurs à la GH/PRL/cytokines) avec une glycoprotéine membranaire de 130.000 Daltons, appelée gp130, qui apparaît être importante pour la transduction du signal de l'IL-6. La gp130 fait également partie de la famille des récepteurs GH/PRL/cytokines.

La JAK2 est une tyrosine kinase associée au GHR. Toutes ces protéines partagent la propriété un peu inhabituelle d'avoir deux domaines kinase. Le processus de transduction du signal pourrait impliquer d'autres kinases, la phospholipase Ca (PLC-Ca), le DAG (diacylglycérol) et quelques protéines effectrices. La GH activerait une protéine cytoplasmique connue comme p91 ou STAT (signal transducer and activator of transcription) en les phosphorylant (Kelly *et al.*, 1994).

Postel-Vinay *et al.* (1995) ont effectué l'expérience suivante pour déterminer quelles parties du domaine intracytoplasmique sont essentielles à l'activité de transcription de la GH. Les gènes spi 2.1 (sérine protéase inhibitor) ou la β -lactoglobuline (protéine du lait) sont sensibles à la GH. On enlève le promoteur de ces gènes et on les couple à un gène rapporteur, comme la CAT (chloramphénicol acétyltransférase) ou la luciférase. Ensuite on transfecte des cellules CHO (chinese hamster ovary) avec cette construction spi-CAT ou spi-luciférase. Les cellules CHO ne possèdent pas de récepteurs endogènes à la GH. On observe qu'une grande partie du domaine intracytoplasmique est nécessaire à l'activité de transcription. Ainsi, on trouve que les 80 derniers aa sont indispensables à l'activité de transcription. La présence de 3 résidus tyrosine dans cette région C-terminale suggère l'association possible avec les récepteurs de protéines à domaine SH2.

En revanche, pour l'effet prolifératif de la GH, pour l'activation de la JAK2 et pour la stimulation de l'activité MAP kinase, les premiers 46 aa du domaine cytoplasmiques sont suffisants.

La boîte 1, par contre, est nécessaire pour tous les effets de la GH.

d.2. La voie des médiateurs lipidiques

L'*inositol 1,4,5-triphosphate* et les *diacylglycérols* (DAG) sont les messagers seconds de certains signaux cellulaires. Le premier est formé par hydrolyse d'un phosphatidylinositol-4,5-biphosphate, un des glycolipides contenant de l'inositol et logé dans le feuillet interne de la membrane plasmique. Il induit la libération de Ca^{++} à partir du réticulum endoplasmique. Le DAG est le produit d'hydrolyse et diffuserait dans la membrane pour activer une protéine kinase C.

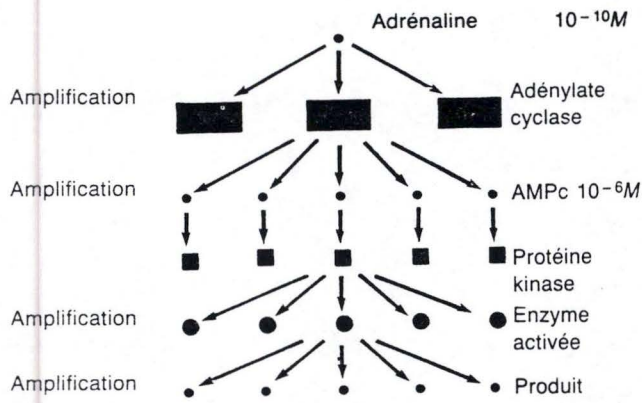


Fig.II.24 : Transduction et amplification d'un signal extracellulaire dans une cellule (Darnell *et al.*, 1988)

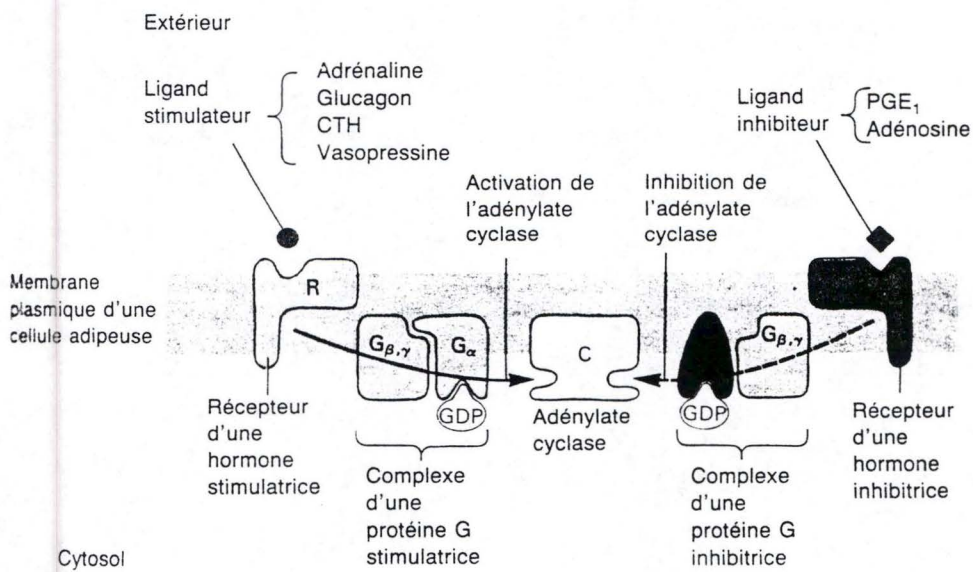


Fig.II.25 : Activation et inhibition de l'adénylate cyclase (AC) par les protéines G (Darnell *et al.*, 1988)

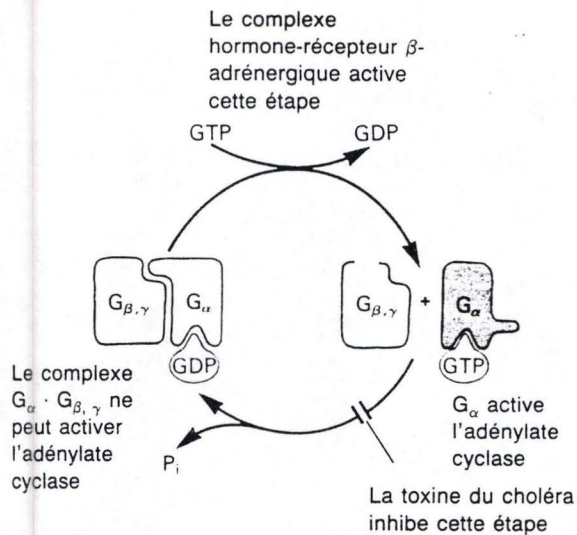


Fig.II.26 : Le cycle de liaison du GTP et du GDP (Darnell *et al.*, 1988)

Le système de génération de messagers secondaires, phosphorylations, déphosphorylations etc. a l'avantage de pouvoir amplifier un signal de faible amplitude et de contrôler un groupe de réactions enzymatiques par une seule molécule: l'AMPc (Fig.II.24-27).

d.3. L'activité associée au noyau

Alternativement, on trouve qu'il est possible que la GH entre dans le noyau et génère un signal de transcription de façon directe ou par intermédiaire d'un GHR nucléaire (kinase nucléaire; Waters *et al.*, 1994). Le même auteur observe que la GHBP est présente dans les noyaux de lapin et de rat, la GH a été trouvée dans les noyaux lors d'expériences *in vitro* et *in vivo* et le GHR entier a été localisé dans le noyau. On postule dès lors un système GH/GHR/GHBP qui peut réguler la transcription par activation locale de JAK2 ou PLC (Fig.II.27 et 28).

Les observations de Lobie *et al.* (1994) vont dans le même sens. Ils observent également le GHR dans le noyau. La GH serait rapidement transloquée vers le noyau comme molécule intacte. Une translocation maximale aurait lieu endéans 30 minutes après injection. Des expériences avec des inhibiteurs de cytosquelette (vinblastine, vincristine, colchicine etc.) ont montré que ce dernier ne participerait pas dans cette internalisation.

4.D. La protéine de liaison de l'hormone de croissance

Les protéines de liaison de l'hormone de croissance (GHBP, pour GH Binding Protein) ont été identifiées dans le sang et dans les fractions solubles cytoplasmiques de certains tissus de quelques espèces.

a. Structure

La GHBP est principalement constituée d'un peptide identique au domaine extracellulaire du GHR. Le mécanisme de synthèse de cette GHBP semble être spécifique selon l'espèce, les ruminants étant à parts des autres espèces (Herington *et al.*, 1994); Fig.II.29).

Ainsi, lorsque Devolder *et al.* (1993) ont voulu isoler la GHBP, ils ont trouvé trois peptides liant la GH dans le plasma et le lait du bovin. La première de 58 kDa a une haute affinité pour la GH et est identique à la partie extracellulaire du GHR. La deuxième, de 190 kDa, est une GHBP de faible affinité. La troisième, de 31kDa, correspondrait à la forme déglycosylée de la variante 58 kDa. Les GHBP trouvées chez la plupart des espèces montrent une grande

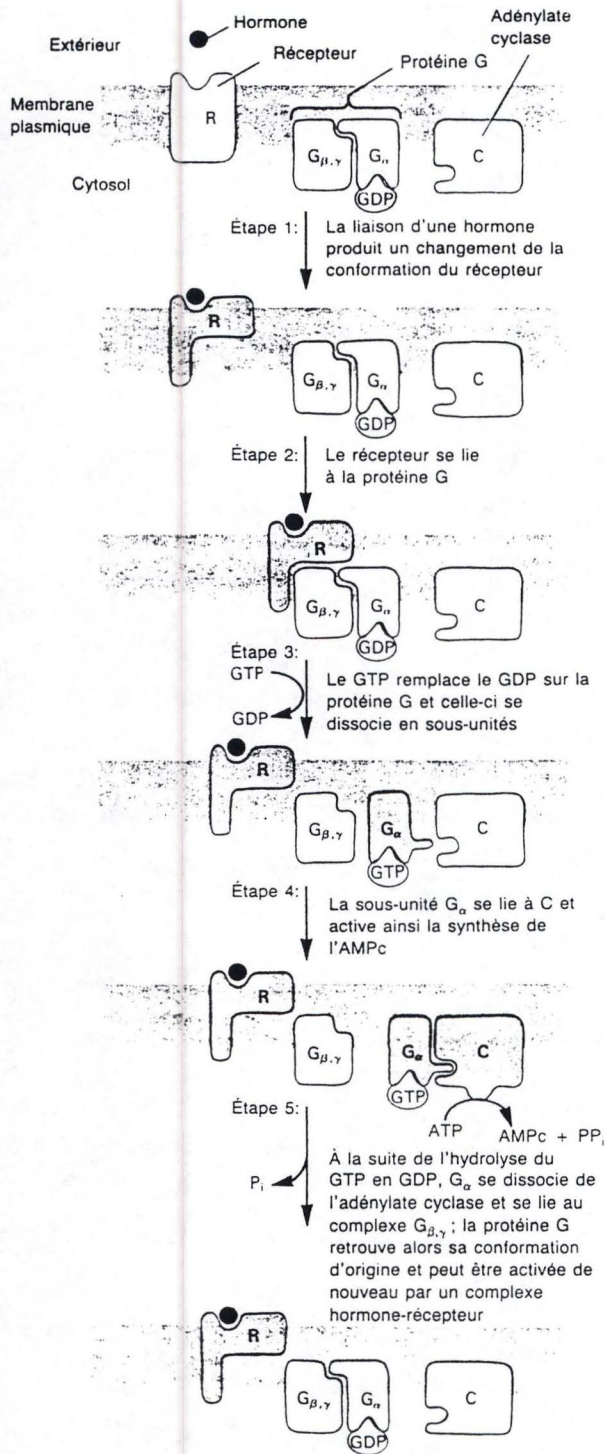


Fig.II.27 : Activation de l'adénylate cyclase après liaison de l'hormone (Darnell *et al.*, 1988)

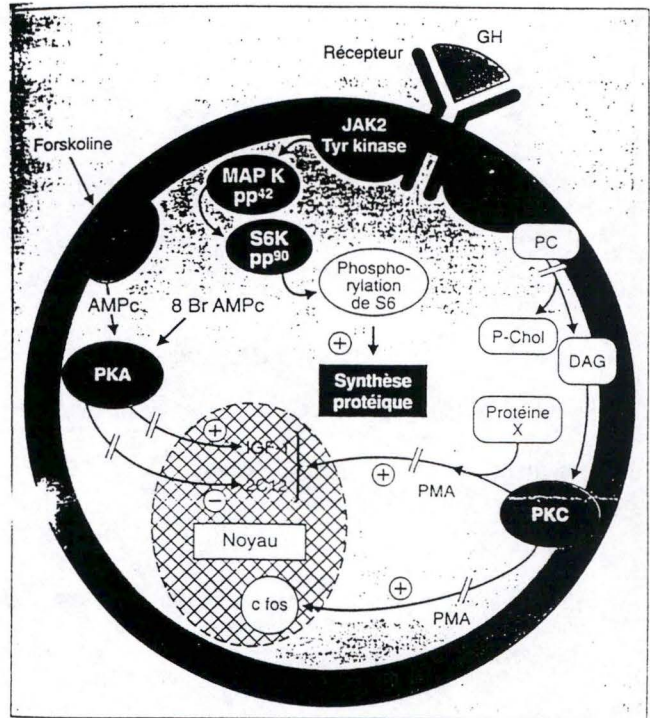


Fig.II.28 : Les voies de signalisation de l'hormone de croissance (Le Cam et Legraverend, 1993)

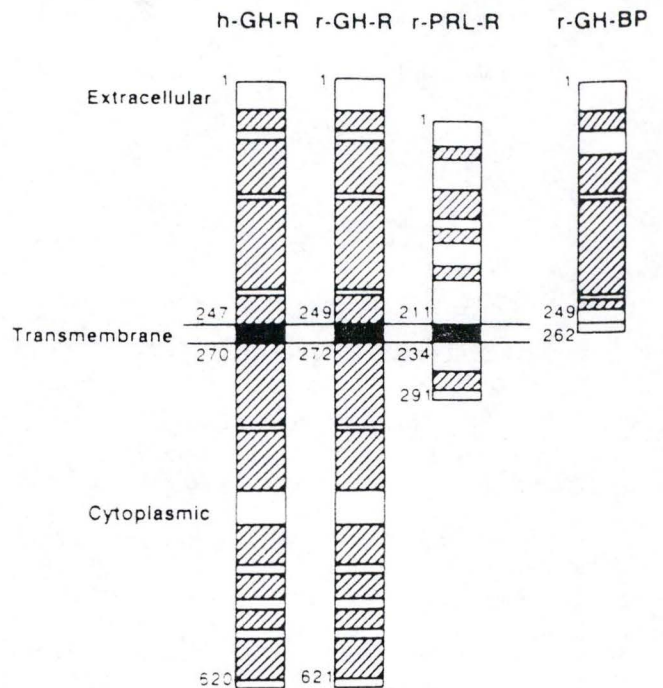


Fig.II.29 : Structure schématisée du récepteur à la GH et la GH-BP (Maes *et al.*, 1995)

hétérogénéité de PM allant de moins de 50 kDa à plus de 300 kDa. Quelques unes de ces formes présentent des modifications post-translationnelles (par exemple la glycosylation) (Herington *et al.*, 1994).

b. Génération de la GHBP

La GHBP peut être obtenue par deux mécanismes: l'épissage alternatif d'un transcrite primaire de l'ARNm et le clivage protéolytique.

Lors de *l'épissage alternatif*: le domaine intracytoplasmique et la partie transmembranaire sont substitués par une queue hydrophile. Selon Bingham *et al.* (1994), cette queue est constituée de 17 aa et permet à la GHBP d'être excrétée de la cellule. L'épissage alternatif fait qu'on trouve deux transcrits, habituellement d'environ 4,5 kb et de 1,2 kb, comme chez le rat et la souris (Kelly *et al.*, 1994): l'un code pour le GHR entier, l'autre pour la GHBP.

Le *clivage protéolytique* ne fait intervenir qu'un seul transcrite d'environ 4,5 kb chez certaines espèces (Kelly *et al.*, 1994) comme chez le mouton. Ceci suggère la génération de la GHBP par clivage protéolytique. Cette coupure a lieu près du domaine transmembranaire. Il y a 2 sites de clivage sérine protéase (Herington, 1993) possibles mais une protéase spécifique n'a pas été identifiée (Herington *et al.*, 1994).

c. Fonction de la GHBP

La GHBP servirait de réservoir de GH dans la circulation (Kelly *et al.*, 1994). Elle diminue le taux de dégradation de la GH chez le rat. Additionnellement, elle diminue la concentration en GH libre au moment des pics et assure une concentration minimale de GH libre entre les pics via la dissociation de la GH liée à la GHBP (Maes *et al.*, 1995). Alternativement, elle bloque l'action de la GH en contrecarrant une liaison de celle-ci à son récepteur. (Blumenfeld et Amit, 1994; Kelly *et al.*, 1994)

Chez le rat, la GHBP infusée *in vitro* potentialise l'action mitogénique de la GH (probablement en prolongeant la demi-vie plasmatique de l'hormone et en la protégeant contre une dégradation trop rapide). *In vitro*, la GHBP inhibe l'action lipogénique (qui se manifeste uniquement pendant 30 minutes après une élévation importante de la glycémie, sinon la GH a une action lipolytique) de la GH en entrant en compétition avec le récepteur GH (Maes *et al.*, 1995).

Chez l'homme, on observe que 45% de la GH circulante est liée à la GHBP de haute affinité (Maes *et al.*, 1995).

La GH possède 2 sites de liaison se liant séquentiellement chacun à une séquence identique d'une molécule de GHR. Ainsi, on trouve que la GH se lie à deux GHBP (Maes *et al.*, 1995) et que cette dimérisation semble être indispensable à sa bioactivité (Herington *et al.*, 1994). D'après Baumann *et al.* (1990), la relation stoechiométrique (soit 2 GHBP pour 1GH, soit 1GHBP pour 1 GH) dépend de la concentration en GHBP. Chez l'homme, à des concentrations plasmatiques physiologiques de GHBP, le complexe 1:1 prédomine tandis qu'à des concentrations plus élevées, la GH est captée dans des complexes 2:1.

Certains auteurs pensent que le taux circulant de GHBP serait un reflet fidèle du nombre de GHR tissulaire (Amit *et al.*, 1993). D'autres pensent que la GHBP possède un rôle *autocrine/paracrine* étant donné qu'elle se trouve partout et qu'elle est spécifique à la cellule qui la synthétise. On a supposé également un rôle *intracrine*, c'est-à-dire intracellulaire, par exemple comme facteur de transcription (Herington, 1993).

CHAPITRE III: MATERIEL ET METHODES

1. Rappel des objectifs poursuivis

Le but de ce travail est de localiser et de quantifier les récepteurs spécifiques de la GH dans les différents sites de l'ovaire de la brebis et tout spécialement dans les follicules. Si certains essais de mises au point de techniques ont déjà été réalisés au sein du laboratoire de physiologie animale, aucun d'entre eux n'a encore donné pleinement satisfaction. Il était donc primordial de tester différentes méthodes afin de retenir la plus appropriée. Parmi les méthodes citées dans la littérature, nous avons choisi l'autoradiographie et le "Ligand Binding" sur cellules isolées. L'autoradiographie a pu être réalisée avec le matériel existant au laboratoire ; la technique du Ligand Binding en suspension cellulaire a nécessité une mise au point inachevée jusqu'à présent.

Le premier but de notre travail est de mettre au point la technique de quantification des récepteurs à la GH par Ligand Binding en suspension cellulaire réalisée sur des cellules hépatiques et granulosaes isolées à partir de tissus prélevés à l'abattoir. Son application devrait permettre d'étudier l'influence de la taille des follicules sur le nombre des récepteurs à la GH à la surface des cellules granulosaes.

Le second but de notre travail est d'améliorer et d'adapter la technique d'autoradiographie (ARG) afin de déterminer l'emplacement préférentiel des récepteurs à la GH dans les cellules granulosaes ou thécales de follicules prélevés sur des ovaires provenant de l'abattoir. Une fois la quantification possible, l'application de cette technique nous permettra de déterminer les conséquences de l'état physiologique de la brebis Suffolk et de l'administration d'hormone de croissance recombinante bovine *in vivo* ou *in vitro* sur l'évolution quantitative de ces récepteurs.

Dans ce chapitre, nous décrivons les conditions expérimentales ainsi que les techniques utilisées. Nous réservons au chapitre suivant la description de la mise au point de la technique du Ligand Binding en suspension cellulaire.

2. Conditions expérimentales

Les premières étapes de mise au point de la technique du Ligand Binding en suspension cellulaire et de la technique de l'autoradiographie ont été réalisées à partir de prélèvements de foie et de follicules ovariens provenant de l'abattoir d'Anderlecht. De même, l'étude de l'influence de la taille des follicules sur la quantité de récepteurs à la GH a été effectuée à partir de follicules ovariens récoltés à l'abattoir. Ces follicules provenaient donc de brebis se trouvant dans des états physiologiques variables.

Les follicules ayant servi à l'étude de l'influence de l'état physiologique de la brebis et d'un traitement à la GH administré *in vivo* ou *in vitro* ont été prélevés sur des brebis de race Suffolk provenant du Centre de Recherches Ovines de Faulx-les-Tombes (CRO) après ovariectomie ou abattage.

Les mises au point de la localisation et de la quantification des récepteurs à la GH, ainsi que la mise en culture des follicules ont été réalisées au Laboratoire Physiologie Animale des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix (FUNDP) à Namur. Les études histologiques ont été effectuées au Laboratoire d'Histologie des mêmes Facultés.

3. Plans expérimentaux

3.A. Ponction des follicules ovariens pour l'application de la technique du Ligand Binding en suspension cellulaire

Dans le cadre de cette première expérience, nous avons déterminé l'influence de la taille des follicules sur la présence des récepteurs à la LH, à la FSH et à la GH au niveau des cellules granulosales. A partir d'ovaires prélevés à l'abattoir, des pools de cellules granulosales sont obtenus par ponction des follicules selon deux catégories: la première comprend tous les follicules dont le diamètre est inférieur à 2,5 mm et la seconde regroupe les follicules dont le diamètre est supérieur à 3 mm.

Les cellules granulosales provenant de petits follicules sont obtenues par ponction des follicules à l'aide d'une seringue de 5 ml HSW DIN 13098-A-10LN équipée d'une fine aiguille TERUMO® 0,5x16 NEOLUS stérile.

Les cellules granulosales provenant des grands follicules sont obtenues par aspiration à l'aide d'une fine aiguille reliée à un tube de polystyrène maintenu sous vide à l'aide d'une pompe à eau.

A partir des deux pools de cellules granulosales ainsi récoltées, l'application de la technique du Ligand Binding en suspension cellulaire permet d'estimer de manière relative les récepteurs à la GH, à la LH et à la FSH.

3.B. Mises en évidence des effets de l'état physiologique et d'un traitement à la GH *in vivo* et/ou *in vitro* sur la présence des récepteurs à la GH par la technique d'autoradiographie

Une expérience réalisée dans le cadre d'une recherche au laboratoire vise à étudier les effets de la GH administrée *in vivo* ou *in vitro* sur la stéroïdogénèse et la réactivité aux hormones gonadotropes de follicules ovariens prélevés sur des brebis lors de différentes périodes physiologiques. Cette expérience vise également à mettre en évidence les effets de l'hormone de croissance sur l'évolution quantitative des récepteurs hormonaux présents à la surface des cellules thécales et granulosales.

Le protocole expérimental peut-être résumé comme suit. Six brebis de race Suffolk sont synchronisées en milieu de saison de reproduction (octobre) et 6 en anoestrus (avril). L'étude des effets de la GH sur l'activité folliculaire est réalisée en divisant le groupe de 6 brebis en 2 lots:

- le premier (4 brebis) ne reçoit pas de traitement *in vivo*. Il fournit pour la culture deux groupes de follicules :
 - * le premier qui n'est soumis à aucun traitement à la GH ni *in vivo*, ni *in vitro* est appelé **follicules témoins**;
 - * l'autre soumis à la GH *in vitro* est appelé **follicules traités *in vitro***.
- le deuxième (2 brebis) reçoit un traitement à la bGHrec (GH bovine recombinante) *in vivo* (injection de 6 mg/jour) durant les 16 jours précédant la mise en culture des follicules. Ce lot fournit lors de la culture, le groupe de follicules que nous appelons **follicules traités *in vivo***.

Durant chacune des saisons, les ovaires sont prélevés lors du 18^{ème} jour suivant le traitement de synchronisation. Les follicules ne présentant pas de signes d'atrésie sont disséqués et placés dans un système de culture *in vitro*. La technique de culture utilisée est la périfusion (Fig.

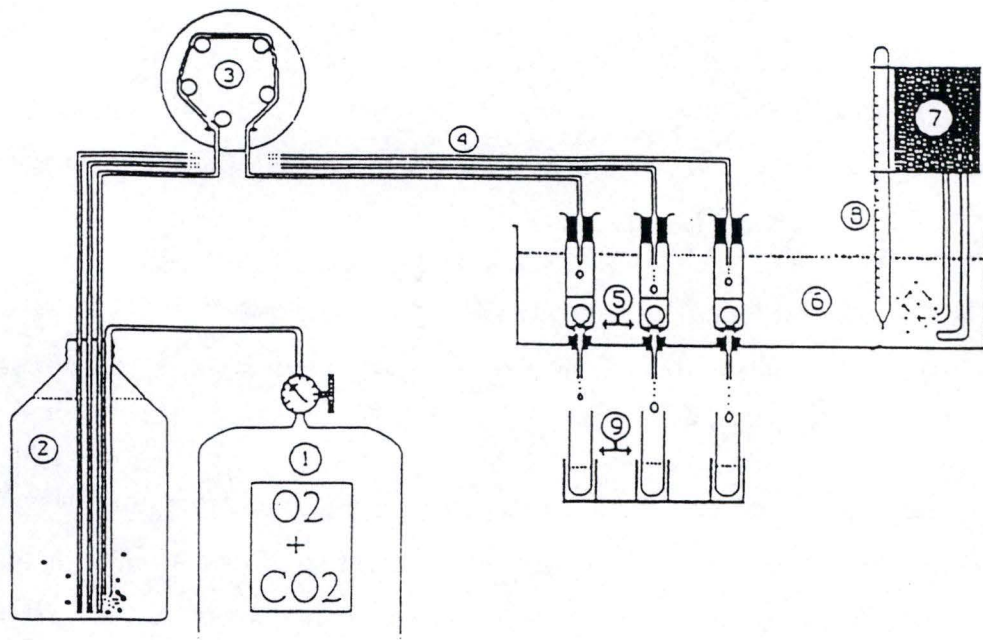


Fig.III.1 : Système de perfusion

1. Mélange gazeux O_2 (95%) + CO_2 (5%)
2. Milieu de culture
3. Pompe péristaltique
4. Tuyau en Tygon
5. Chambres de culture
6. Bain thermostatisé
7. Pompe péristaltique
8. Thermomètre
9. Tubes-collecteurs

III.1). Elle a été mise au point au laboratoire (Demuynck, 1990), à partir des données de différents auteurs (Bahr *et al.*, 1980; Terqui *et al.*, 1988). Cette technique permet une survie totale des follicules pendant au moins 10 heures. Les follicules maintiennent leur synthèse et leur sécrétion de stéroïdes pendant toute la durée de la culture.

Au total, trois groupes de 8 follicules sont placés en culture lors des périodes de reproduction et d'anoestrus. Chaque groupe est constitué de 4 petits et de 4 gros follicules. Le premier groupe (follicules témoins) ne reçoit pas de traitement à la GH *in vitro*. Le deuxième (follicules traités *in vivo*) provient d'ovaires de brebis prétraitées à la GH *in vivo* et ne recevant pas de traitement à la GH *in vitro*. Le troisième (follicules traités *in vitro*), est stimulé avec la GH directement *in vitro*.

Au terme de la culture, les follicules sont congelés et conservés à -70°C . C'est à partir de là qu'intervient notre travail. Nous avons en effet utilisé une partie des follicules congelés en vue de réaliser une étude quantitative des récepteurs de la GH à la surface des cellules granulosales et thécales par autoradiographie.

4. Techniques

4.A. Transport et préparation des tissus pour la mise au point et l'application des techniques

a. Transport des ovaires et des prélèvements de foie

Pour la technique d'autoradiographie, les ovaires et les prélèvements de foie sont récoltés à l'abattoir et transportés à 4°C dans du tampon PBS (pH 7,4). Au laboratoire, les prélèvements sont directement congelés et conservés à -70°C jusqu'à utilisation (la technique de congélation des tissus est décrite au point 4.C.f.1, p.44).

Pour l'application de cette technique, les ovaires sont récoltés au Centre de Faulx-les-Tombes, transportés dans du PBS (pH 7,4) et disséqués au laboratoire afin d'isoler les follicules à congeler à -70°C .

Dans le cadre de la recherche portant sur la technique du Ligand Binding en suspension cellulaire les tissus sont prélevés à l'abattoir, plongés et transportés dans du PBS (pH 7,4) aux

environs de 20°C. Au laboratoire, certains ovaires sont disséqués en vue d'isoler les cellules stromales, thécales et lutéales. Les autres sont réservés pour la ponction des follicules en vue de récolter les cellules granulosales. Les prélèvements de foie sont découpés en fractions d'environ 1x1 mm en vue d'isoler les cellules hépatiques. Les tissus préparés et/ou les cellules isolées sont directement utilisés pour la suite des manipulations.

4.B. La technique du Ligand Binding en suspension cellulaire

a. Principe

La technique du "ligand binding" est appliquée sur différents types cellulaires après isolement. Elle a pour principe d'incuber les cellules en présence de l'hormone radioactive qui se fixe sur ses récepteurs spécifiques. Après fixation de l'hormone marquée, le comptage de la radioactivité émise par le culot cellulaire permet de quantifier de manière relative les récepteurs. La quantification nécessite cependant une détermination correcte de la liaison *totale*, *spécifique* et *non spécifique*.

Comme nous l'avons signalé précédemment, l'objectif de cette technique est de mettre en évidence les récepteurs à la GH. Cette mise au point est réalisée sur des cellules hépatiques, dont le nombre de récepteurs à la GH est connu pour être élevé. Peu de données sont actuellement publiées quant à la concentration en récepteurs à la GH sur les cellules granulosales.

b. Solutions utilisées

Les différentes solutions utilisées pour la mise au point et l'application de la technique sont les suivantes:

- PBS (pH 7,8);
- PBS (pH 7,8) BSA 0,1 %;
- PBS (pH 7,8) glutaraldéhyde 3% (solution aqueuse 50%, Sigma, Code G-6403);
- tampon Wide;
- tampon Wide-NaCl;
- milieu de culture M199.

Le tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) est préparé à partir de 8 g de NaCl (137 mM), 0,2 g de KCl (2,7 mM), 1,44 g de Na₂HPO₄ (10 mM) et 0,24 g de KH₂PO₄ (1,8 mM) pour 800 ml

Synthetic Culture Media



Medium 199¹

Component	Cat No.		
	31100 Powder mg/L	22340 1X Liquid mg/L	20011 Powder mg/L
INORGANIC SALTS:			
CaCl ₂ (anhyd)	200.00	-	200.00
CaCl ₂ • 2H ₂ O	-	264.00	-
Fe(NO ₃) ₃ • 9H ₂ O	0.72	0.10	0.72
KCl	400.00	400.00	400.00
MgSO ₄ (anhyd.)	97.67	-	97.67
MgSO ₄ • 7H ₂ O	-	200.00	-
NaCl	6300.00	6300.00	6300.00
NaHCO ₃	-	2200.00	-
NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	140.00	-	140.00
NaH ₂ PO ₄ • 2H ₂ O	-	158.00	-
OTHER COMPONENTS:			
Adenine Sulphate	10.00	10.00	10.00
Adenosine-5-triphosphate	1.00	1.00	1.00
Adenosine-5-phosphate	0.20	0.20	0.20
Cholesterol	0.20	0.20	0.20
Deoxyribose	0.50	0.50	0.50
D-Glucose	1000.00	1000.00	1000.00
Glutathione (reduced)	0.05	0.05	0.05
Guanine HCl	0.30	-	0.30
Guanine	-	0.30	-
HEPES	-	5960.00	5958.00
Hypoxanthine	-	0.30	-
Hypoxanthine (Na Salt)	0.354	-	0.354
Phenol Red	20.00	20.00	20.00
Ribose	0.50	0.50	0.50
Sodium Acetate	50.00	83.00	50.00
Thymine	0.30	0.30	0.30
Tween 80*	20.00	20.00	20.00
Uracil	0.30	0.30	0.30
Xanthine	-	0.30	-
Xanthine (Na Salt)	0.344	-	0.344
AMINO ACIDS:			
DL-Alanine	50.00	50.00	50.00
L-Arginine • HCl	70.00	70.00	70.00
DL-Aspartic Acid	60.00	60.00	60.00
L-Cysteine HCl • H ₂ O	0.11	-	0.11
L-Cysteine HCl	-	0.11	-
L-Cystine	-	20.00	-
L-Cystine • 2HCl	26.06	-	21.90
DL-Glutamic Acid • H ₂ O	150.00	133.66	150.00
L-Glutamine	100.00	100.00	100.00
Glycine	50.00	50.00	50.00
L-Histidine HCl • H ₂ O	21.88	21.88	26.10
L-Hydroxyproline	10.00	10.00	10.00
L-Isoleucine	40.00	40.00	40.00
DL-Leucine	120.00	120.00	120.00
L-Lysine • HCl	70.00	70.00	70.00
DL-Methionine	30.00	30.00	30.00
DL-Phenylalanine	50.00	50.00	50.00
L-Proline	40.00	40.00	40.00
DL-Serine	50.00	50.00	50.00
DL-Threonine	60.00	60.00	60.00
L-Tryptophan	10.00	10.00	10.00
L-Tyrosine	-	40.00	-
L-Tyrosine (disodium salt)	57.88	-	57.90
DL-Valine	50.00	50.00	50.00

Component	Cat No.		
	31100 Powder mg/L	22340 1X Liquid mg/L	20011 Powder mg/L
VITAMENS:			
Ascorbic Acid	0.05	0.05	0.05
α-Tocopherol Phosphate (disodium salt)	0.01	0.01	0.01
d-Biotin	0.01	0.01	0.01
Calciferol	0.10	0.10	0.10
D-Ca Pantothenate	0.01	0.01	0.01
Choline Chloride	0.50	0.50	0.50
Folic Acid	0.01	0.01	0.01
i-Inositol	0.05	0.05	0.05
Menadione	0.01	0.01	0.01
Niacin	0.025	0.025	0.025
Niacinamide	0.025	0.025	0.025
Para-aminobenzoic Acid	0.05	0.05	0.05
Pyridoxal HCl	0.025	0.025	0.025
Pyroxidine HCl	0.025	0.025	0.025
Riboflavin	0.01	0.01	0.01
Thiamine HCl	0.01	0.01	0.01
Vitamin A (acetate)*	0.14	0.10	0.14

References:
 1. Morgan, Morton and Parker (1950) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 73, 1.
 a. Values established by the Tissue Culture Standards Committee.
 *Tween 80 is a registered trademark of ICI Americas inc.

Tableau III.1 : Composition du milieu de culture M199/25 HEPES. Le milieu utilisé est indiqué par la flèche verticale. Il est commercialisé sous forme de poudre par GIBCO LIFE TECHNOLOGIES.

d'eau déminéralisée et désionisée. Le pH est ajusté à la valeur souhaitée (soit pH 7,4 ou 7,8) et le volume final de la solution est porté à un litre.

Le tampon Wide 0,6 M est préparé à partir de 7,5 g de KH_2PO_4 et 77,9 g de Na_2HPO_4 par litre d'eau distillée. A partir de cette solution stock 0,6 M, le tampon Wide 0,06 M est préparé par dilution 10x.

Le tampon Wide-NaCl est préparé à partir de tampon Wide auquel est ajouté du NaCl afin d'obtenir une solution 0,9%.

Le milieu de culture M 199 est nécessaire pour l'isolement des hépatocytes.

Le milieu de culture utilisé est le M 199 W/ 25 HEPES commercialisé sous forme de poudre par la firme GIBCO LIFE TECHNOLOGIES (cat.n°20011-037). Sa composition est décrite dans le tableau III.1. La dissolution de ce milieu est réalisée à l'aide d'eau déminéralisée et désionisée. Du NaHCO_3 (MERCK 6329, PM 84,01) est ensuite ajouté à raison de 2,2 g par litre de milieu. Le pH est vérifié et porté si nécessaire à 7,2 avec du HCl 1N ou du NaOH 1N. Le milieu est filtré par une pompe péristaltique simple millipore Cat. No. XX80 202 30, équipée de filtres millipores (Sterivex TM - GV Cat.No. SVGV01015 de 0,22 μm) et récupéré dans des récipients préalablement autoclavés. Après filtration, on ajoute de la gentamycine (50 ng/ml, Gibco, n° 043-05750D) à raison de 1 ml par litre de milieu.

c. Marquage des hormones

Le traceur radioactif est obtenu de la façon suivante. Toute l'opération se passe dans la fiole à fond conique dans laquelle l'iode 125 a été expédiée. On tamponne ^{125}I avec 25 μl de tampon Wide et on ajoute ensuite 40 μl de LH (soit 4 μg) ou 40 μl de FSH (soit 4 μg) ou 25 μl de GH (soit 5 μg). La réaction est initiée par l'adjonction de 20 μl de chloramine T et arrêtée après 30 secondes par l'adjonction de 25 μl de disulfite de sodium. Le contenu de la fiole est ensuite prélevé et chromatographié sur une colonne de 15 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 avec 2 ml de sérum albumine bovine (fraction V, Sigma® A-4503) à 2%. Des fractions de 1 ml sont recueillies et leur radioactivité est mesurée de façon à repérer le pic de radioactivité correspondant au passage de l'hormone marquée. Ces tubes sont ensuite portés à la dilution voulue. La radioactivité choisie pour la technique du Ligand Binding en suspension cellulaire est

de 200000 cpm/100 μ l. La radioactivité de l'hormone marquée et la concentration correspondante sont:

type d'hormone	radioactivité de l'hormone (cpm)	concentration en hormone
GH	200 000	4 ng/100 μ l
LH	200 000	2 ng/100 μ l
FSH	200 000	1.5 ng/100 μ l

Tableau III.2 : Concentration en hormone marquée (ng/100 μ l) (GH, LH et FSH) pour une radioactivité de 200 000 cpm.

d. Techniques

d.1. Isolement des cellules et constitution des pools cellulaires

Afin d'isoler les cellules granulosales, nous nous sommes inspirés des travaux de Quewet (1994) qui avait mis la technique au point à partir d'ovaires prélevés à l'abattoir. Son principe peut-être décrit comme suit.

Les ovaires récoltés à l'abattoir d'Anderlecht sont transportés jusqu'au laboratoire dans du PBS pH 7,4 à température ambiante. Une fois au laboratoire, les pools de cellules granulosales sont obtenus par ponction de follicules ovariens ne présentant pas de signe d'atrésie. Les cellules granulosales sont recueillies par aspiration des follicules à l'aide d'une fine aiguille reliée à un tube de polystyrène maintenu sous-vide à l'aide d'une trompe à eau. Les cellules sont récoltées dans du milieu de culture M199 hépariné. Elles sont alors récupérées par centrifugation pendant 10 minutes à 1000 g. Le culot de cellules est lavé deux fois dans 1 ml de M199 contenant 2% de BSA par centrifugation à 1000 g pendant 20 minutes. Il est ensuite resuspendu dans du M199/2% de BSA.

Le nombre de cellules granulosales à obtenir par échantillon est fixé à 1 million. Ce nombre est basé sur les travaux de Channing et Ledwitz-Rigby (1975).

L'isolement des cellules hépatiques a fait l'objet de plusieurs étapes de mises au point qui sont décrites dans le chapitre suivant.

Afin de répondre à l'objectif principal dans la mise au point de cette méthode qui est de quantifier les récepteurs à la GH à la surface des cellules ovariennes, nous avons établi trois pools

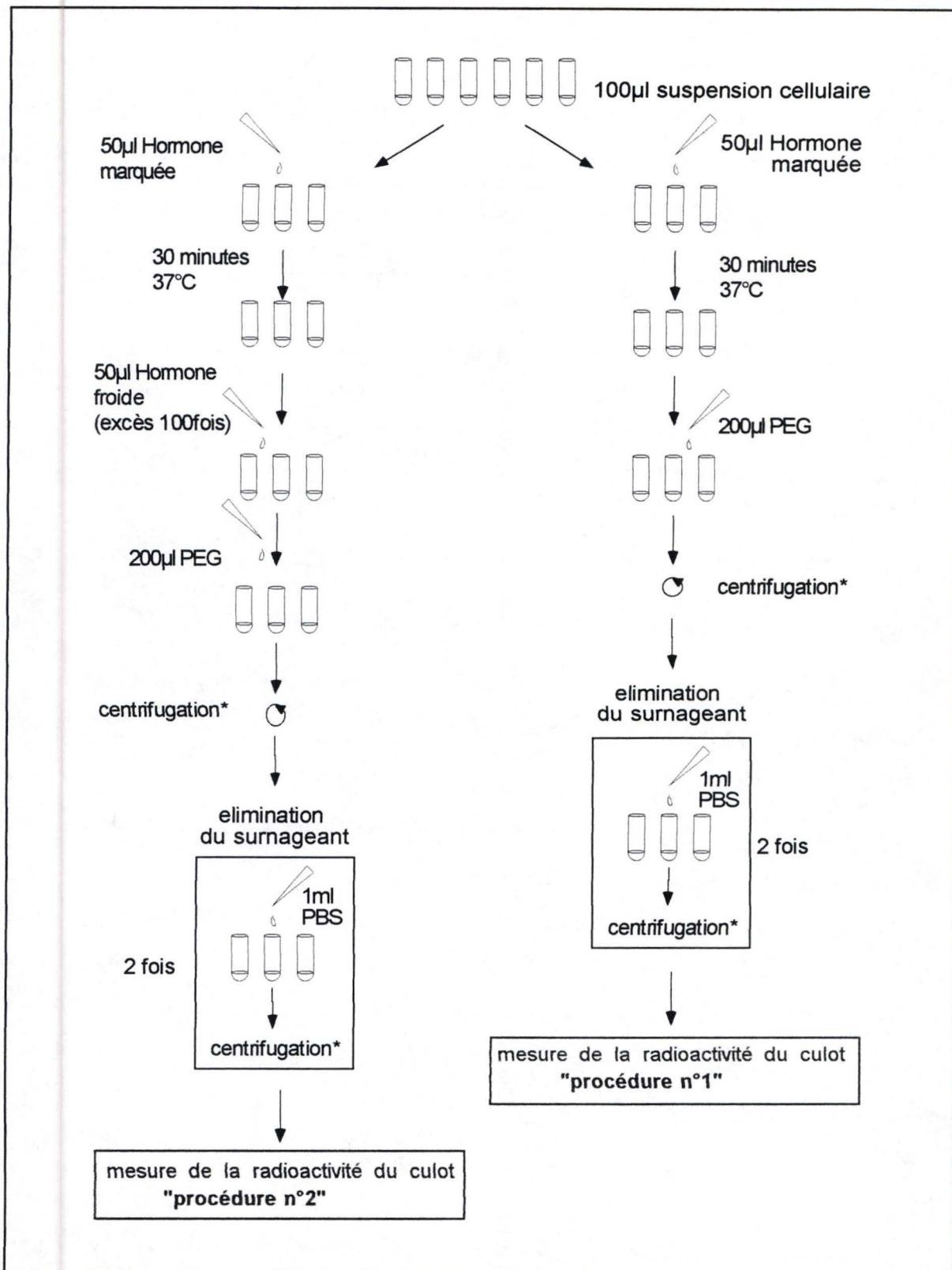


Fig. III.2: Ligand Binding en suspension cellulaire - Les deux procédures utilisées. La procédure n°1 vise à mesurer la fixation totale d'hormone marquée à son récepteur. La procédure n°2 vise à mesurer la fixation spécifique.

* centrifugation à 1200rpm, pendant 5 minutes à température ambiante

de cellules différentes. Les cellules granulosales constituent le pool 'test'. En effet, le nombre de récepteurs pouvant se trouver en surface cellulaire y est inconnu. Les cellules hépatiques, connues pour une expression constante et élevée de ces récepteurs, constituent le pool cellulaire 'contrôle positif'.

d.2. Incubation des cellules avec de l'hormone marquée et comptage (Fig.III.2)

Les hormones utilisées dans le cadre de cette expérience (oLH, oFSH et oGH) sont fournies par le NIH (National Institute of Health, Maryland). La technique d'iodination des hormones est décrite au point 4.B.c, p.37.

Les incubations cellulaires sont réalisées après dilution des hormones dans un milieu de liaison que nous appelons 'Binding Medium' (BM). Ce milieu est établi à partir de M199 additionné de 2% de BSA et de 0,1 % de streptomycine selon les conseils de Park *et al.* (1986) et de Laburthe *et al.* (1984).

Les pools cellulaires sont récoltés dans des tubes en plastique afin de minimiser l'adhérence possible des cellules aux parois du tube (Channing et Ledwitz-Rigby, 1975).

Lors de chacune des expériences, nous établissons un échantillon 'Back Ground' (BG) contenant l'hormone radioactive en absence de cellules.

Les cellules granulosales sont incubées à raison de 100 μ l de suspension cellulaire pour 50 μ l d'hormone marquée à 200.000 cpm pendant 30 minutes à 37°C (procédure n°1). Cette première procédure vise de déterminer la liaison totale (LT). La procédure n°2 vise à mesurer la liaison spécifique (LS). Les cellules sont incubées pendant 30 minutes à 37°C avec l'hormone marquée. Ce temps écoulé, 50 μ l d'hormone froide en excès (à une concentration 100 fois supérieure à celle utilisée pour l'hormone radioactive) sont rajoutés et le tout est incubé durant 30 minutes à la même température. Le culot est récupéré par centrifugation à 1200 rpm pendant 5 minutes à 20°C et le surnageant aspiré. Deux lavages successifs sont ensuite réalisés avec 1 ml de PBS. Le culot cellulaire est récupéré par centrifugation à 1200 rpm pendant 5 minutes à 20°C. La radioactivité du culot est mesurée au compteur Gamma (1277 Gammamaster Automatic Gamma Counter LKB Wallac). Cette façon de procéder pose cependant problème à plusieurs niveaux et sera discutée au chapitre V dans le cadre de la critique des techniques utilisées.

Après incubation des cellules avec l'hormone marquée, la radioactivité totale (Total Count; TC) est mesurée avant de procéder au lavage du culot cellulaire qui est effectué de la façon suivante (Fig.III.2) :

- additionner 200 µl de BM complété avec 6% de PEG (Polyéthylène Glycol) et centrifuger à 1200 rpm pendant 5 min à une température de 20°C;
- éliminer le surnageant contenant l'hormone libre;
- laver à deux reprises par centrifugation le culot cellulaire dans 1 ml de PBS;
- aspirer le surnageant contenant l'hormone libre et compter la radioactivité émise par le culot cellulaire au compteur gamma.

Chaque échantillon est réalisé en triplicat.

Après le lavage, la radioactivité du culot cellulaire est mesurée au compteur Gamma afin d'estimer la liaison de la GH, de la LH et de la FSH sur les cellules granulosales.

e. Etude de paramètres

Avant de passer à l'étude quantitative des récepteurs de la GH au niveau de différents types cellulaires, il s'est avéré important de vérifier certains paramètres susceptibles d'influencer la liaison entre l'hormone et son récepteur.

Nous avons testé les effets de la température et du temps d'incubation avec la GH radioactive sur la quantification des récepteurs à la surface des cellules. Ce test a été réalisé sur 1 million d'hépatocytes.

4.C. La technique d'autoradiographie

a. Principe

Pour rappel, la technique d'autoradiographie est utilisée en vue de localiser et de quantifier les récepteurs folliculaires à l'hormone de croissance. Cette mise en évidence des récepteurs est possible grâce à l'utilisation d'isotopes radioactifs placés en contact avec le tissu à étudier. Le marquage du récepteur par cette technique se fait après prélèvement des tissus, placement dans un cryogène à -70°C et conservation jusqu'à réalisation des coupes au cryostat. Les coupes, une fois réalisées, incubent avec l'agent radioactif. L'ARG est obtenue en déposant une couche d'émulsion radiosensible sur la coupe de tissu contenant le matériel radioactif. Après

exposition et développement, l'examen au microscope optique décèle les grains d'argent réduits en regard des structures émettrices.

Les essais ont porté sur des ovaires entiers, sur des follicules obtenus par microdissection et sur des fragments de foie.

b. Solutions utilisées

Les différentes solutions utilisées pour la mise au point et l'application de la technique d'ARG sont les suivantes:

- PBS pH 7,8;
- PBS pH 7,8 BSA 0,1 %;
- PBS pH 7,8 glutaraldéhyde 3% (solution aqueuse 50%, Sigma, Code G-6403);
- tampon Wide;
- tampon Wide-NaCl;
- Emulsion Ilford K5;
- solution révélatrice (Ilford PQ Universal Cat. 757277);
- solution fixatrice (Ilford HYPAM Cat.758221).

L'émulsion utilisée dans le cadre de ce travail est l'Ilford K5 (code 4645). Elle est constituée de cristaux dont le diamètre est de 0,20 μm . L'émulsion est chauffée et fondue dans un bain-marie à 40 °C et diluée à l'aide d'eau distillée dans les proportions 1:1. Le mélange est alors filtré à travers deux couches de gaze et coulé dans un guide en Opalin.

Les solutions révélatrice et fixatrice sont préparées en diluant cinq fois chacune des solutions stock (Ilford PQ et Ilford HYPAM) dans de l'eau distillée.

La préparation des solutions M199 et du tampon PBS est identique à celle décrite précédemment, au point 4.B.b, p.36.

c. Préparation des lames APES (3 aminopropyléthoxysilane)

Les lames APES doivent assurer une meilleure adhésion du tissu aux lames porte-objet. Les différentes étapes de préparation de ces lames (Vel, code 1169461) sont les suivantes:

- un bain de 30 secondes dans de l'acétone;
- un bain de 4 minutes dans une solution d'acétone / APES 2%;

- rinçage rapide dans de l'eau distillée.

d. Colorations

d.1. Coloration de coupes à l'H.E.S. (Hémalum Erythrosine Safran)

Cette coloration permet d'évaluer l'état physiologique et la structure histologique des tissus utilisés en autoradiographie. Les différentes étapes de cette coloration sont les suivantes:

- un bain de 10 minutes dans l'hémalum filtré au préalable;
- rinçage rapide dans l'eau de source;
- différenciation dans l'éthanol-HCl pendant 20 secondes;
- arrêt de la différenciation dans un bain pendant 10 minutes dans l'eau courante;
- un bain de 6 minutes dans l'érythrosine;
- rinçage rapide à l'eau courante;
- différenciation dans l'alcool éthylique 70% pendant 20 secondes;
- trois bains d'isopropanol;
- un bain de 7 minutes dans du safran;
- trois bains d'isopropanol;
- trois bains de toluol;
- montage de la lamelle couvre-objet.

d.2. Coloration hématoxyline Ehrlich

Ce colorant renforce le contraste provoqué par le marquage du tissu. La solution est préparée de la façon suivante (pour 620 ml):

- 4 g d'hématoxyline (Hématoxyline trihydratée, 6698 UCB VEL),
- 200 ml d'éthanol 95%,
- 200 ml d'eau distillée,
- 200 ml de glycérine,
- 6 g d'aluminium potassium sulfate,
- 20 ml d'acide acétique.

Cette solution peut être préparée 15 jours avant son utilisation et remuée de temps en temps.

e. Marquage des hormones

Le principe du marquage des hormones à l'iode 125 est identique à celui décrit au point 4.B.c, p.37. Les hormones sont diluées à une radioactivité de 40 000 cpm. Les radioactivités et les concentrations en hormone correspondantes sont présentées dans le tableau III.3:

type d'hormone	radioactivité de l'hormone (cpm)	concentration en hormone
GH	40 000	$8 \cdot 10^{-4} \mu\text{g}/100\mu\text{l}$
LH	40 000	$4 \cdot 10^{-4} \mu\text{g}/100\mu\text{l}$
FSH	40 000	$3 \cdot 10^{-4} \mu\text{g}/100\mu\text{l}$

Tableau III.3 : Concentration en hormone marquée ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$) (GH, LH et FSH) pour une radioactivité de 40 000 cpm.

f. Technique

f.1. Cryofixation

La cryofixation des ovaires entiers, des follicules après dissection, ou des fractions de foie est réalisée en plaçant les tissus à congeler dans une nacelle de papier aluminium remplie d'un cryoprotecteur (Tissue-Tek; O.C.T. compound, Miles Laboratoires, Elkart, USA). Les tissus sont ensuite congelés par le dépôt de ces nacelles dans du méthanol dont la température, avoisinant les -80°C , est maintenue à l'aide de carboglace. Les follicules et ovaires congelés sont stockés dans un congélateur à -70°C . A cette température, les tissus peuvent être conservés jusqu'au moment de la réalisation des coupes histologiques. Ces coupes permettent de réaliser une étude, d'une part autoradiographique et d'autre part histologique. Pour vérifier l'état histologique des tissus, une coloration H.E.S. est effectuée pour chaque série de coupes.

f.2. Mise sur lame

La réalisation de coupes à partir du tissu congelé se fait par un cryostat (MICROM HM 500-OM). Celui-ci est constitué d'une chambre dans laquelle le microtome, la lame et la pièce à couper sont maintenus à une température d'environ -25°C . Les follicules cryofixés sont sectionnés au cryostat à des épaisseurs de $7\mu\text{m}$. Les sections sont déposées sur lames SuperFrost

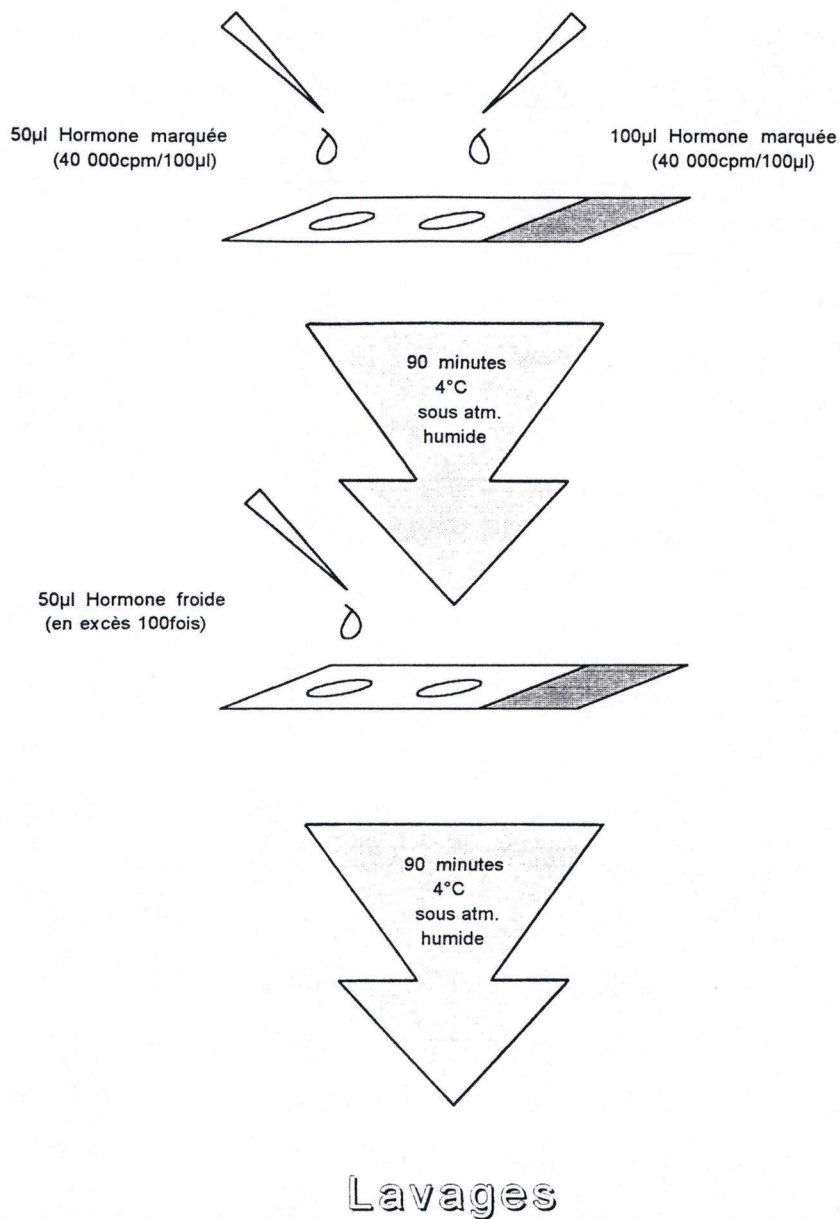


Fig.III.3 : Autoradiographie. Incubation des tranches de tissus avec l'hormone marquée et non marquée. Après incubation les coupes sont lavées.

Color (76 x 26mm Art. Nr.04 1207 Menzel-Gläser) ou APES, séchées pendant quelques minutes et stockées à -70°C jusqu'à utilisation.

f.3. Incubation des tissus avec l'hormone marquée (Fig.III.3)

L'incubation des tissus sur coupe se réalise en présence de l'hormone marquée.

Deux tranches de tissus sont distribuées par lame et chacune est entourée d'une chambre de DPX. La première est mise en contact avec 100 μl de la solution dissoute de oLH, oFSH ou oGH marquée et diluée à 40 000 cpm/100 μl . Cette étape permet de dénombrer la quantité totale de liaisons (LT) obtenue par l'hormone marquée ; elle inclut la fixation spécifique de l'hormone aux sites d'affinité élevée ainsi que l'adhérence non spécifique à d'autres molécules de la surface cellulaire.

La seconde tranche de tissu est mise en présence d'une quantité identique d'hormone radioactive puis avec un excès (100 fois) de la même hormone froide. Il se crée dès lors une réaction de compétition entre l'hormone froide et l'hormone radioactive pour le même récepteur. Cette étape permet de différencier les liaisons spécifiques (LS) des liaisons non spécifiques (LNS). En effet, elle permet d'évaluer la contribution de la fixation non spécifique à la fixation globale en mesurant la participation de l'hormone radioactive en présence d'un excès d'hormone froide en vue de saturer pratiquement tous les sites d'affinité élevée.

Pour évaluer la LT, chaque tranche de tissu incube avec 100 μl d'hormone marquée pendant 90 minutes à 4°C , sous atmosphère humide.

Pour évaluer la LNS, chaque tranche incube avec 50 μl d'hormone marquée pendant 90 minutes puis avec 50 μl d'hormone froide en excès pendant 90 minutes à 4°C , sous atmosphère humide.

La liaison spécifique (LS) est égale à la soustraction de la liaison non spécifique (LNS) de la LT.

f.4. Lavage des coupes, fixation et recouvrement des lames (Fig.III.4)

Après incubation des coupes, celles-ci sont rincées à deux reprises dans du PBS (pH 7,8) et plongées directement dans deux bains successifs de PBS (pH 7,8) à 4°C pendant 2 minutes. Elles sont ensuite fixées dans une solution de glutaraldéhyde 3% - PBS (pH 7,8) à 4°C pendant 15

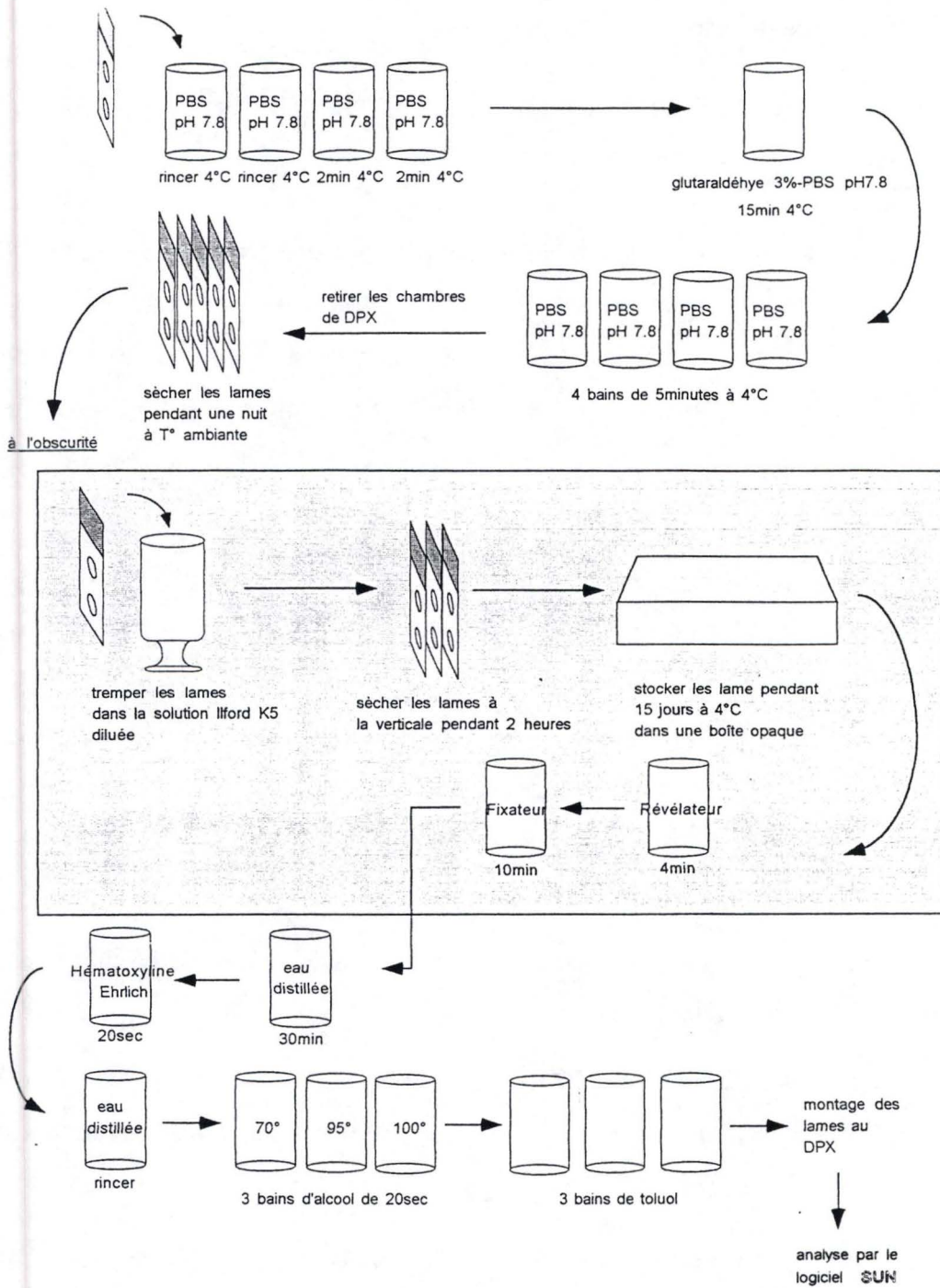


Fig.III.4 : L'autoradiographie. Après incubation, les coupes d'autoradiographie sont lavées, séchées, couvertes avec une solution radiosensible et incubées pendant 15 jours à l'obscurité. Ensuite les coupes autoradiographiées sont révélées, fixées et contrecolorées. La dernière étape consiste à monter un lame couvre-objet sur les lames autoradiographiés.

minutes. Après fixation les coupes sont lavées à quatre reprises dans du PBS pH 7,8 à 4°C pendant 5 minutes. Une température de 4 °C garantit une conservation maximale des tissus. Après le retrait des chambres de DPX autour de chaque coupe à l'aide d'une pincette, les lames sèchent pendant une nuit à température ambiante.

Le recouvrement des lames avec l'émulsion Ilford K5 se déroule en chambre noire. Après avoir dilué et coulé l'émulsion dans un guide en Opalin, nous y trempions les lames verticalement à deux reprises afin d'obtenir une couche uniforme. Les lames sont ensuite installées verticalement sur un portoir pendant 2 heures à température ambiante et ensuite déposées dans une boîte opaque. Les boîtes sont conservées au moins 15 jours à 4°C avant les opérations suivantes.

f.5. Révélation, fixation et coloration des coupes (Fig.III.4)

La révélation, la fixation et la coloration des coupes se font selon les procédés histologiques classiques.

Les coupes trempent durant 4 minutes dans la solution révélatrice et durant 10 minutes dans la solution fixatrice. Cette étape est réalisée dans l'obscurité.

Les lames sont ensuite rincées dans un bain d'eau distillée durant 30 minutes et colorées dans la solution d'hématoxyline Ehrlich pendant 20 secondes. Ce colorant renforce le contraste provoqué par le marquage du tissu. Les étapes de la coloration se poursuivent à la lumière et de la façon suivante:

- un bain d'eau distillée afin de rincer les coupes;
- déshydratation dans trois bains d'alcool de 20 secondes chacun à 70°, 95° et 100°;
- passage des coupes dans trois bains de toluol;
- montage des lames au DPX

g. Détermination du nombre de récepteurs à l'aide du logiciel Biomage (SUN)

Une fois les coupes histologiques révélées, l'estimation quantitative des récepteurs hormonaux est réalisée sur base de photographies de la coupe. La photographie est photocopiée sur un transparent, ce qui permet de réaliser une analyse bidimensionnelle par ordinateur. Cette étape est nécessaire pour que l'ordinateur puisse transformer l'image en données qui lui sont compréhensibles. L'image digitalisée est donc formée d'un ensemble bidimensionnel de points, ou

pixels (512 sur 512), chacun prenant une valeur correspondant à la quantité de gris de la zone définie par le pixel. La taille d'un pixel définira le degré de résolution de l'image, le premier paramètre important. Plus cette taille est petite, plus la précision obtenue est importante. Le second paramètre important de la digitalisation est la résolution en niveaux de gris. Le digitaliseur transforme le degré de gris des pixels en valeur numérique. Chaque pixel contient 256 niveaux de gris possibles. Pour transformer les niveaux de gris en densité optique, une échelle de calibration allant de 0,05 à 3 d'absorbance est utilisée (Pirson, 1993)

4.D. Analyses statistiques

Les résultats obtenus pour le "ligand binding" sur les suspensions cellulaires ont été traités selon le modèle d'analyse de la variance à deux critères de classification (ANOVA 2 croisée fixe). Le critère utilisé est le type de cellules (fixe) et le type de récepteur (fixe).

Les résultats obtenus pour l'autoradiographie ont été traités selon le modèle de la variance à deux critères de classification (ANOVA 2). Les critères utilisés sont la saison (fixe) et le type de traitement (fixe). Les expériences du traitement à la GH *in vitro* ont été analysées par des tests de comparaison de moyennes (test t).

CHAPITRE IV : RESULTATS

1. Ligand Binding en suspension cellulaire

Les étapes préliminaires à une expérience de ligand binding en suspension cellulaire sont au nombre de six. La première consiste à prélever l'organe cible et à isoler les cellules par une technique enzymatique ou mécanique. Les deuxième et troisième sont les lavages et l'estimation de la viabilité des cellules avec élimination des cellules mortes. La quatrième étape consiste à séparer les différents types cellulaires par des techniques appropriées expliquées dans le chapitre 'Matériel et Méthodes'. La caractérisation et le comptage des cellules étudiées forment les deux dernières étapes.

Dans le cadre de ce travail nous avons effectués quelques expériences introductives de mise au point de la technique. Les cellules choisies pour ces expériences sont les hépatocytes. Notre choix s'est porté sur ces cellules pour deux raisons : premièrement, elles possèdent un grand nombre de récepteurs à la GH. Deuxièmement, le tissu hépatique est un tissu dont les cellules sont faciles à isoler et qui permet d'obtenir ces cellules en grand nombre. Après avoir appliqué la technique du Ligand Binding en suspension sur les hépatocytes, on l'appliquera sur les cellules granulosaes de petits et grands follicules.

1.A. Isolement des cellules

Comme énoncé plus haut, les étapes à réaliser avant de commencer la technique du ligand binding en suspension sont l'isolement, le lavage, le comptage et la détermination du nombre des cellules étudiées.

Pour isoler les hépatocytes une technique enzymatique a été utilisée, à savoir l'utilisation de la collagenase à 37°C. Pour l'isolement des cellules hépatiques et de diverses cellules ovariennes (stromales, thécales et lutéales) nous nous sommes inspirée des travaux de Bramfeld *et al.*, (1995) et de Channing et Ledwitz-Rigby (1975). Les cellules granulosaes ont été isolées par aspiration du fluide folliculaire du follicule avec une seringue, mise au point par Qewet (1994) et expliquée plus en détail au chapitre 'Matériel et Méthodes'. Le fluide folliculaire contient des cellules granulosaes isolées.

Concentration en collagénase (mg/ml) ⇒	0.1		1	
	Nombre de cellules / μ l	Viabilité (%)	Nombre de cellules/ μ l	Viabilité (%)
1 heure	500	95	1000	96
2 heures	3500	94	4500	95

Tableau IV.1 : Isolement des cellules - Résultats pour les hépatocytes. Les valeurs présentées sont le résultat d'un comptage.

	nombre de cellules / μ l	viabilité (en %)
petits follicules	47410 \pm 9847	95 \pm 5
grands follicules	10861 \pm 6073	95 \pm 5

Tableau IV.2 : Isolement des cellules - Résultats pour les cellules granulosales. Les valeurs présentées sont des moyennes \pm SEM de trois comptages.

1.A.1. Résultats pour les cellules hépatiques

La méthode employée pour les cellules hépatiques s'appuie sur une technique bien établie : la technique de la perfusion du foie *in vivo* avec de la collagenase en solution (Bramfeld *et al.*, 1995). En effet, au laboratoire, l'animal (souvent un rat ou une souris) est anesthésié et la collagenase diffuse dans le foie par les vaisseaux sanguins. Pour nous, le recours à cette technique a toutefois posé des problèmes à plusieurs niveaux. Comme nous ne réalisons pas de culture d'hépatocytes, nous serions obligés d'isoler les cellules hépatiques *de novo* avant chaque expérience. Le nombre d'animaux à y consacrer serait tout simplement trop élevé. Deuxièmement, nous ne maîtrisons pas la technique de la perfusion *in vivo* du foie et nous avons donc été obligée de recourir à un autre moyen d'isolement des hépatocytes. Ainsi avons nous choisi d'isoler les hépatocytes en incubant des petits morceaux de foie (des cubes de 1 x 1 x 1mm) avec de la collagenase à 37°C. En découpant le foie en petits morceaux nous espérons augmenter la surface de contact de la collagenase avec le tissu hépatique. Dans la technique de la perfusion *in vivo*, cette surface de contact de l'enzyme avec le tissu cible est en effet augmentée car l'enzyme diffuse dans le tissu par le réseau de capillaires.

Après incubation, la suspension cellulaire est filtrée sur deux couches de gaze afin de séparer les fractions tissulaires et cellulaires. La fraction cellulaire est ensuite répartie par volumes de 1ml dans des tubes à fond conique et lavée. Le lavage se fait à trois reprises avec 1ml de tampon PBS puis centrifugation pendant 5 minutes à 1200 rpm à 4°C. Le culot final est suspendu dans un volume déterminé de M199. Après les lavages, la viabilité des cellules du culot est estimée à l'aide du trypan bleu et un comptage est effectué sur une cellule de Bürker après avoir dilué 50µl de suspension cellulaire dans 1ml de PBS.

Pratiquement, nous avons testé à plusieurs reprises deux paramètres de la technique :

- des concentrations de 0.1mg/ml et 1mg/ml en collagénase dans du milieu de culture (M199)
- deux temps d'incubation de l'enzyme avec le tissu hépatique à 37°C : 1 et 2 heures

A titre d'exemple, le tableau IV.1 donne les résultats d'un des tests. Nous avons présenté les résultats d'un comptage.

L'échantillon ayant incubé pendant deux heures en présence de 1mg/ml de collagénase donne un nombre de cellules et un pourcentage de viabilité. L'isolement des hépatocytes se fera donc dorénavant en incubant les morceaux de tissu hépatique en présence de collagénase

diluée à raison de 1mg/ml dans du milieu de culture M199. L'incubation se réalisera à 37°C pendant 2 heures.

1.A.2. Résultats pour les cellules granulosales

Les cellules granulosales en suspension sont obtenues par aspiration du liquide folliculaire des follicules. Entre 30 et 50 ovaires sont en moyenne ponctionnés, suivant le nombre de brebis abattues à l'abattoir d'Anderlecht. Le liquide folliculaire est recolté dans un tube à fond conique contenant une goutte d'héparine pour éviter que le liquide folliculaire forme des caillots fibrineux. Les valeurs sont présentées au tableau IV.2 .

Pour les expériences du Ligand Binding en suspension 1 million de cellules sont nécessaires. On doit donc, si la quantité nécessaire n'est pas atteinte spontanément, pooler les différentes fractions ensemble, les centrifuger, éliminer le surnageant et recompter à nouveau.

1.A.3. Résultats pour les autres types cellulaires de l'ovaire : cellules thécales, stromales et lutéales

a) Les cellules thécales

Les follicules vides qui ont servi à isoler les cellules granulosales sont coupés en deux. Des morceaux de thèque sont enlevés en grattant légèrement la surface interne du follicule à l'aide d'une spatule. Le problème de cette technique est qu'il n'existe pas de limite visible entre granulosa et thèque. C'est donc une approche approximative d'isolement de cellules et une contamination importante par d'autres types cellulaires est très probable. Cette méthode d'isolement des cellules doit donc absolument se poursuivre par une séparation des différents types cellulaires.

b) Les cellules stromales

Les ovaires dont on a isolé les petits et grands follicules sont utilisés pour isoler les cellules stromales. Comme pour les cellules thécales, on rencontre un simple problème pratique quant à la dissection des morceaux de stroma. On ne peut pas voir les tout petits follicules, ni les vaisseaux sanguins. Une dissection du stroma sans follicules, corps atrétiques et vaisseaux sanguins est donc impossible. Les morceaux de trame 'stromale' sont donc probablement très hétérogènes. Les cellules isolées doivent donc absolument être purifiées afin d'obtenir des préparations cellulaires stromales pures.

		Concentration en collagénase (mg/ml) ⇒			
		0.1		1	
type de cellule ↓	Temps d'incubation (en heures) ↓	Nombre de cellules / μ l	Viabilité (en %)	Nombre de cellules / μ l	Viabilité (en %)
thèque	1	100	93	500	94
	2	1500	91	12500	93
stroma	1	500	94	3000	90
	2	1000	95	10500	95
corps jaune	1	5000	94	/	/
	2	1000	95	4000	94

Tableau IV.3 : Isolement des cellules - Résultats pour les autres types cellulaires : cellules thécales, stromales et lutéales. Les valeurs sont le résultat d'un comptage effectué lors d'un essai.

c) Les cellules lutéales

Les cellules lutéales (corps jaune) ne sont pas disponibles pendant toute l'année. En effet, ces cellules ne peuvent être isolées qu'en période de reproduction, quand les ovulations ont eu lieu. Ici on rencontre un autre problème, à savoir une quantité très faible de corps jaunes se trouvant au même stade d'évolution. Le corps jaune se forme à partir d'un follicule qui a ovulé. Progressivement le follicule est envahi par des vaisseaux sanguins. Les cellules thécales et granulosaes se transforment pour constituer les cellules lutéales. La composition cellulaire est donc différente au cours du temps et une séparation des différents types cellulaires et une caractérisation sont indispensables.

c) Etude et résultats

Comme pour les hépatocytes, deux paramètres de l'incubation ont été testés :

- deux concentrations différentes en collagénase : 0.1 mg/ml et 1mg/ml. L'enzyme est dissoute dans du milieu de culture M199.
- deux temps d'incubation à 37°C: 1 et 2 heures

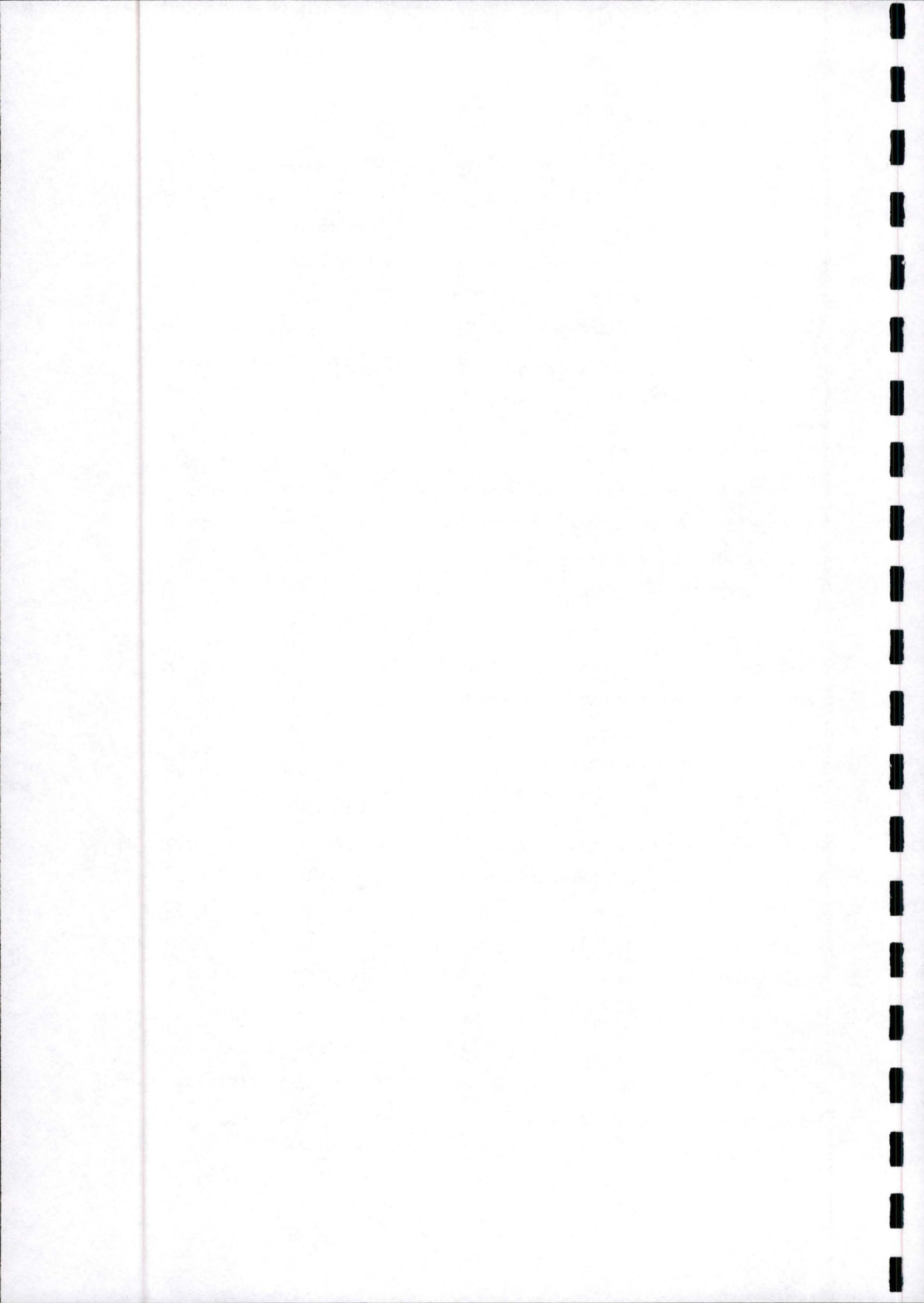
Les tests de viabilité ont été effectués à l'aide du trypan bleu.

Les résultats obtenus pour ces trois types de cellules sont résumés dans le tableau IV.3. Il s'agit d'un comptage unique effectué lors d'un essai.

1.A.4. Conclusions

Les premiers résultats décrits étaient donc l'isolement des différents types de cellules, à savoir les hépatocytes et les cellules granulosaes de petits et grands follicules. Des essais ont été faits pour isoler d'autres types cellulaires de l'ovaire ovin, à savoir les cellules thécales, stromales et lutéales. Néanmoins, uniquement trois types cellulaires seront utilisées lors de notre travail pour les expériences du Ligand Binding en suspension : les hépatocytes, les cellules granulosaes de petits follicules et les cellules granulosaes de grands follicules.

Pour ces trois types de cellules ovariennes, thécales, stromales, lutéales, les cellules granulosaes et les hépatocytes on constate que la viabilité des cellules est suffisante, ce qui concorde avec les résultats de Gospodarowicz (1972) dont les travaux portaient sur l'isolement de cellules lutéales bovines moyennant des techniques enzymatiques.



Les étapes qui n'ont pas été réalisées dans le cadre de nos travaux sont une séparation des différents types cellulaires afin d'obtenir des suspensions pures d'un type de cellules et une caractérisation des cellules étudiées. Les résultats obtenus pour la technique du Ligand Binding en suspension cellulaire ne peuvent être considérées qu'à titre indicatif.

1.B. Ligand Binding en suspension cellulaire

Dans le cadre de ce travail, une mise au point a été effectuée pour rechercher les conditions optimales de durée et de température d'incubation. Ensuite, différentes expériences ont été effectuées pour estimer le nombre de récepteurs de trois hormones différentes, la GH, la LH et la FSH. Les influences de certains paramètres, comme la saison, un traitement à la GH *in vivo* ou *in vitro* ont été étudiés grâce à cette technique. Néanmoins, les résultats sont plutôt approximatifs. En effet, deux méthodes différentes ont été utilisées pour étudier le nombre de récepteurs (voir Fig.III.2, p. 39). Ces deux procédures seront discutées de façon plus détaillée dans le chapitre 'Discussion'. Les valeurs présentées dans la partie « résultats » seront celles issues de la procédure n° 1 car elle est probablement porteuse de moins d'erreur. La mesure du nombre de récepteurs est celle d'une liaison 'totale'. Elle comporte aussi bien la liaison spécifique que la non spécifique. Or, pour faire des comparaisons précises du nombre de récepteurs différents la connaissance de la liaison spécifique est indispensable. Par conséquent, les valeurs obtenues par cette procédure n°1 ne pourront certainement pas servir pour faire des comparaisons précises concernant l'abondance relative des récepteurs sur les cellules, mais elles donneront une idée approximative.

1.B.1. Recherche des conditions optimales de durée et de température d'incubation

Afin de trouver les conditions optimales d'incubation, les effets de deux temps d'incubation et de deux températures différentes ont été testés : trois suspensions cellulaires contenant 1 million d'hépatocytes ont été incubées avec 50 μ l d'hormone radioactive à une activité de 200 000 cpm. Cette radioactivité correspond à une concentration de 4 ng/100 μ l de GH marquée. L'incubation se fait pendant 30 et 60 minutes à une température de 4°C et 37°C.

La radioactivité du culot de cellules a été mesurée après lavage, les valeurs moyennes \pm SEM (n=3) sont données en cpm dans le tableau IV.4 et schématisées à la figure IV.1:

	30 min	60 min
4°C	3904 ± 720	3655 ± 904
37°C	4774 ± 539	4989 ± 1925

Tableau IV.4 : Recherche des conditions optimales de durée et de température d'incubation. Les valeurs présentées sont les moyennes ± SEM en cpm (n=3).

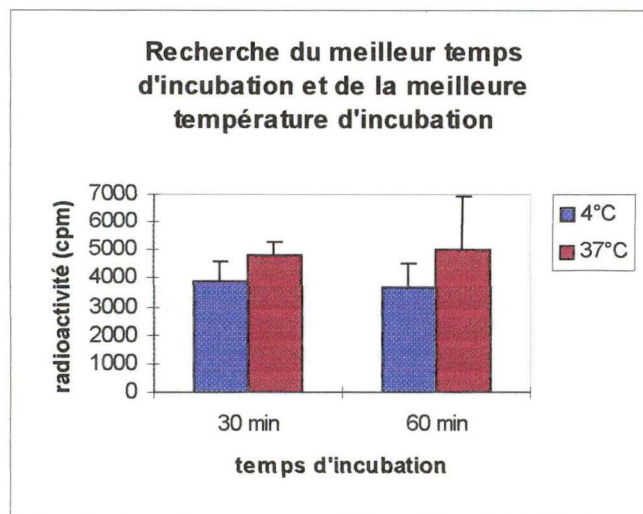


Fig.IV.1 : Recherche des conditions optimales de durée et de température d'incubation. Les valeurs en cpm présentées graphiquement sont les moyennes ± SEM (n=3)

Cette expérience ne nous permet pas de montrer une différence significative entre l'incubation à 4°C ou à 37°C, que le temps d'incubation soit de 30 ou de 60 minutes. Les valeurs sont pratiquement égales pour les deux temps d'incubation. Il est donc inutile d'incuber pendant 60 minutes et on choisira un temps d'incubation de 30 minutes afin de garantir la survie des cellules en suspension. La température de 37°C sera retenue.

1.B.2 Abondance relative des récepteurs à la GH, à la LH et à la FSH pour les différents types de cellules

L'expérience a été réalisée pour mesurer la quantité relative des trois types de récepteurs pour les trois types de cellules retenues, à savoir les **hépatocytes**, les **cellules granulosales de petits follicules** et les **cellules granulosales de grands follicules**. La LH et la FSH radioactive sont à des concentrations de 2 ng/100µl et 1.5 ng/100µl respectivement. Comme indiqué plus haut, les résultats sont ceux de la liaison totale. Toute conclusion sur l'abondance relative des récepteurs à la GH, LH et FSH est donc à prendre qu'à titre indicatif. Pour la même raison énoncée plus haut on s'est contenté d'analyser les données à l'aide d'une

ANOVA II fixe sans préciser les différences individuelles entre les populations étudiées. Les moyennes en cpm \pm SEM (n=3) de cette expérience sont présentées dans le tableau IV.5 et à la figure IV.2 :

	GH	LH	FSH
foie	48137 \pm 7091	32471 \pm 7645	1278 \pm 102
petits follicules	521 \pm 16	5048 \pm 372	10400 \pm 468
grands follicules	1422 \pm 117	479 \pm 30	533 \pm 61

Tableau IV.5 : Abondance relative des récepteurs à la GH, à la LH et à la FSH pour les différents types de cellules. Les valeurs en cpm présentées sont des moyennes \pm SEM (n=3).

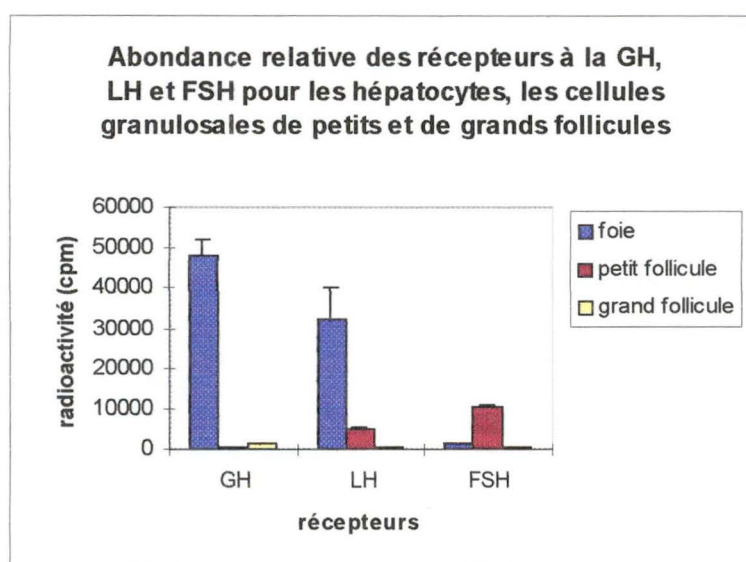


Fig.IV.2 : Abondance relative des récepteurs à la GH, à la LH et à la FSH pour les différents types cellulaires. Les valeurs en cpm présentées sont les moyennes \pm SEM (n=3)

L'analyse statistique montre qu'il y a une différence hautement significative ($p < 0.99$) entre les abondances des récepteurs. On montre également une différence hautement significative ($p < 0.99$) d'un type de cellule à l'autre. L'interaction est également positive, c'est à dire l'abondance des récepteurs est différente d'un type cellulaire à l'autre ($p < 0.99$). On constate que les récepteurs à la GH sont proportionnellement beaucoup plus abondants sur les hépatocytes qu'au niveau des cellules granulosales de petits et grands follicules. Il est plus étonnant de constater que les récepteurs à la LH sont beaucoup plus abondants sur les hépatocytes que sur les cellules granulosales de petits et grands follicules. Par contre, les récepteurs à la FSH sont les plus importants au niveau des cellules granulosales de petits follicules.

2. Autoradiographie

L'autoradiographie est une autre approche de l'étude des récepteurs. Des coupes de follicules sont incubées à 4°C pendant 90 minutes. Après quelques essais infructueux, dus semble-t-il à une mauvaise qualité des produits de révélation ou à une mauvaise fixation des coupes sur lames, l'autoradiographie a pu être réalisée sur base des travaux de Monget *et al.* (1989) pour les récepteurs à la GH, à la LH et à la FSH. Des coupes de 7µm, effectuées sur des follicules congelés, ont été incubées avec de l'hormone marquée à l'¹²⁵I (Fig.III.3, p.44). Après révélation (Fig.IV.3, 1), la densité des coupes d'autoradiographie est mesurée grâce à un logiciel d'analyse d'image (SUN)(2). De la même coupe d'autoradiographie une photo est prise par microscope (3). Cette photo est photocopiée sur un transparent (4) et analysée par le même logiciel qui mesure les densités optiques (5). En effet, le logiciel peut travailler en deux modes : il peut compter des spots distincts et il peut mesurer la densité optique. Sur le transparent on comptera le nombre de spots (6). Sur la coupe, à partir de laquelle on a fait le transparent on comptera les densités optiques par surface (7). Ainsi on pourra établir une droite d'étalonnage portant le nombre de spots en fonction de la densité optique (8). La valeur d'une densité optique nous permettra alors d'estimer le nombre de spots. Cette droite d'étalonnage n'a été établie que pour les autoradiographies du tissu hépatique. Une autre étape serait de faire cette même droite d'étalonnage pour les autoradiographies de follicules. Le résultat pour la droite d'étalonnage pour le tissu hépatique donne un coefficient de corrélation de 0.777 pour une droite de régression d'équation $y = 114.31 + 965.6 x$. A une valeur de D.O.=1.000 correspond un nombre de 1080 spots. Le logiciel SUN calcule la D.O. par surface intégrée : la taille différente des coupes de follicules n'influencera donc pas la D.O. mesurée. Tous les résultats d'autoradiographie sont exprimés en D.O.

Comme pour la technique du Ligand Binding, les mesures des 'liaisons totales' et 'non spécifiques' ne sont pas au point et les résultats présentés ici ne permettent pas de différencier précisément la liaison spécifique de la liaison non spécifique. Les conclusions tirées concernant les récepteurs à la GH, à la LH et à la FSH par les analyses statistiques ne sont donc à considérer qu'à titre approximatif. Pour cette même raison nous nous sommes contentée d'analyser les effets des facteurs étudiées (saison, taille des follicules etc.) sans préciser les différences entre les populations étudiées.

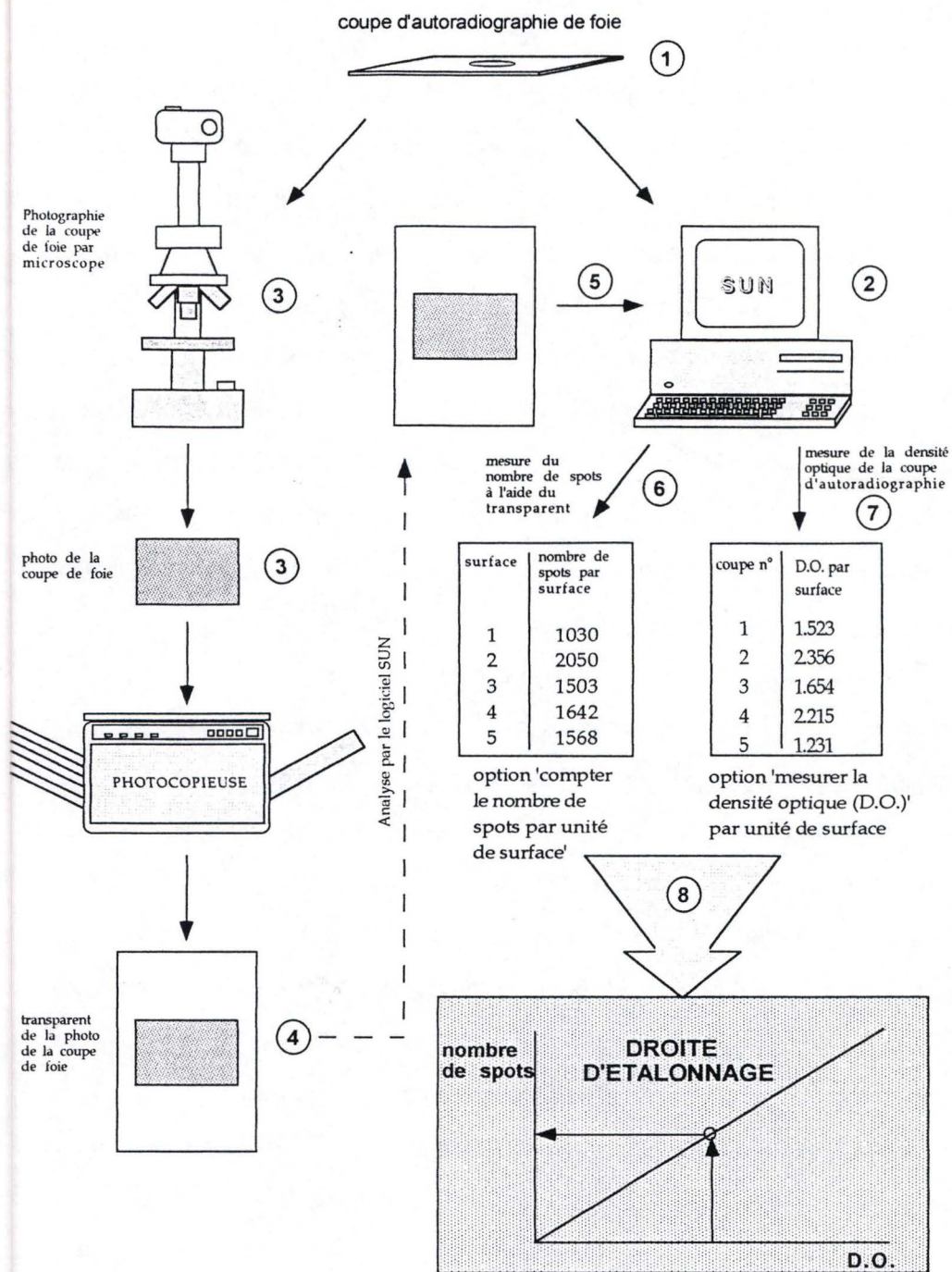


Fig.IV.3 : L'analyse des coupes d'autoradiographie par le logiciel SUN. Une droite d'étalonnage est établie en mesurant sur une coupe d'autoradiographie à la fois le nombre de spots et la densité optique.

2.A. Les récepteurs à la GH

Nous nous sommes intéressée au nombre de récepteurs à la GH en fonction de la saison et en fonction d'un traitement à la GH *in vivo* et *in vitro*. Le traitement à la GH *in vivo* consiste à injecter de la GH à des brebis pendant une période donnée. Ce traitement a été effectué en période de reproduction et en période d'anoestrus. Le traitement à la GH *in vitro* consiste à placer des follicules isolés en culture et d'ajouter de la GH dans le milieu. Les deux techniques de traitement à la GH sont détaillées dans le chapitre 'Matériel et Méthodes'.

L'influence de la taille des follicules sur le nombre de récepteurs à la GH en fonction des traitements à la GH, *in vivo* et *in vitro*, a aussi été examinée. Les résultats de cette expérience ne portent que sur les expériences réalisées en milieu de saison de reproduction.

2.A.1. Influence de la saison et du traitement sur les récepteurs à la GH pour les grands follicules

L'expérience suivante a été réalisée pour tester l'effet de la saison et d'un traitement à la GH sur le nombre des récepteurs à la GH dans les grands follicules. Pour cela, deux séries d'expériences de traitement à la GH ont été réalisées, l'une en anoestrus, l'autre en milieu de saison. Le 'témoin' est constitué par des follicules n'ayant pas subi de traitement spécifique. Les grands follicules du groupe 'GH *in vivo*' sont des follicules provenant de brebis qui ont reçu des injections de GH. Tous les follicules ont été congelés à -70°C et les autoradiographies ont été faites au même moment pour les quatre groupes de follicules.

Le tableau IV.6 et la figure IV.4 présentent les résultats de densité optique (moyenne \pm SEM, $n=4$).

	témoin	GH <i>in vivo</i>
milieu de saison	3,678 \pm 0,638	2,472 \pm 0,164
anoestrus	0,478 \pm 0,176	1,450 \pm 0,141

Tableau IV.6 : Influence de la saison et du traitement sur les récepteurs à la GH pour les grands follicules. Les valeurs en D.O. présentées sont les moyennes \pm SEM ($n=4$).

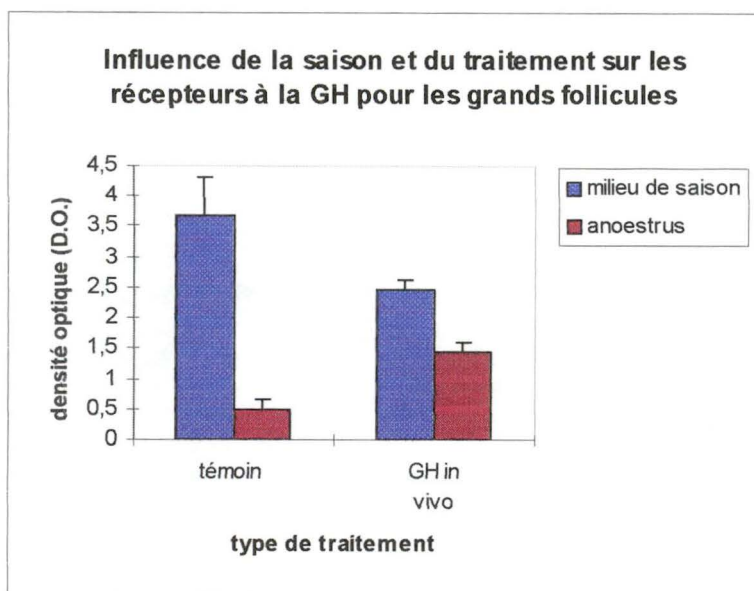


Fig.IV.4 : Influence de la saison et du traitement à la GH *in vivo* sur les récepteurs à la GH pour les grands follicules. Les valeurs en D.O. présentées sont les moyennes \pm SEM (n=4)

L'analyse statistique permet de montrer que la saison influence de façon hautement significative la quantité de récepteurs à la GH dans les grands follicules ($p < 0.99$). Par contre, elle ne permet pas de montrer une influence du traitement sur la quantité des récepteurs. Néanmoins l'interaction entre ces deux facteurs est positive, ce qui signifie que l'effet de la saison ne serait pas le même suivant le traitement subi ($p < 0.99$).

L'effet de la saison sur le nombre de récepteurs à la GH lors d'un traitement à la GH *in vitro* a aussi été déterminé pour les grands follicules. Les valeurs de densité optique sont présentées dans le tableau IV.7 et à la figure IV.5 (moyenne \pm SEM, n=4).

milieu de saison	anoestrus
1,274 \pm 0,168	1,512 \pm 0,123

Tableau IV.7 : Effet de la saison pour les grands follicules sur le nombre de récepteurs à la GH lors d'un traitement à la GH *in vitro*. Les valeurs en D.O. présentées sont les moyennes \pm SEM (n=4)

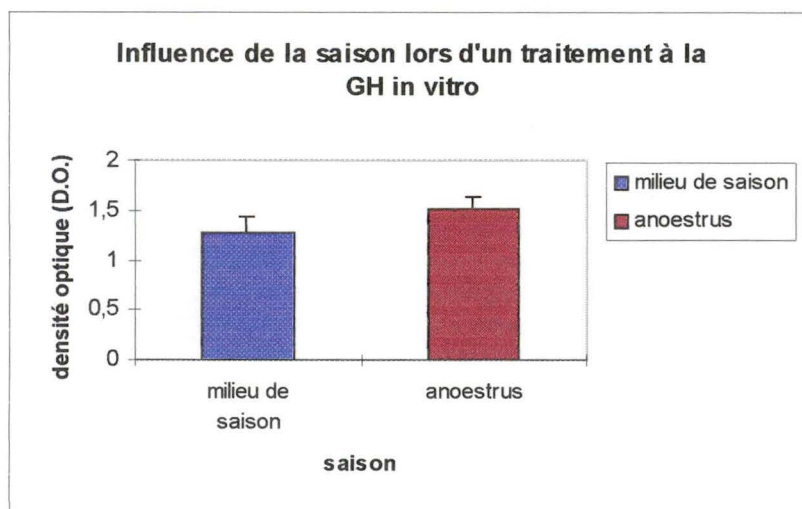


Fig.IV.5. : Effet de la saison sur le nombre de récepteurs à la GH lors d'un traitement à la GH *in vitro* pour les grands follicules. Les valeurs en D.O. représentées graphiquement sont les moyennes \pm SEM (n=4)

L'analyse par un test de Student ne permet pas de révéler une différence significative entre ces deux valeurs. Cette expérience ne permet donc pas de démontrer un effet de la saison sur le nombre de récepteurs à la GH lors d'un traitement à la GH *in vitro* pour les grands follicules.

2.A.2. Effet de la taille des follicules et du traitement à la GH sur les récepteurs à la GH en milieu de saison

Un essai a été réalisé afin de déterminer l'effet de la taille des follicules prélevés en saison sur la quantité de récepteurs à la GH pour différents traitements à la GH. Afin de réaliser cet essai, des coupes à congélation de grands et de petits follicules du groupe 'témoin' et du groupe 'GH *in vivo*' ont été incubées avec de l'hormone marquée à l' ^{125}I . Les valeurs de densité optique sont présentées dans le tableau IV.8 et à la figure IV.6 (moyennes \pm SEM, n=4):

	témoin	GH in vivo
grands follicules	3,68 \pm 0,636	2,472 \pm 0,164
petits follicules	0,881 \pm 0,711	1,444 \pm 0,407

Tableau IV.8 : Effet de la taille des follicules et du traitement à la GH sur les récepteurs à la GH en milieu de saison. Les valeurs présentées sont les moyennes \pm SEM (en D.O.) (n=4).

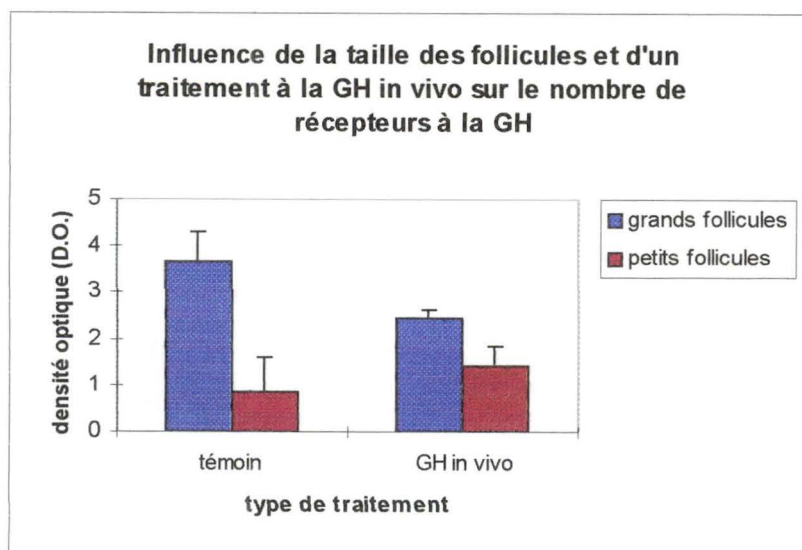


Fig.IV.6 : Effet de la taille des follicules et d'un traitement à la GH sur le nombre de récepteurs à la GH. Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM (n=4).

L'analyse statistique nous permet de montrer un effet hautement significatif de la taille du follicule sur la quantité de récepteurs à la GH dans les follicules ($p < 0.99$). Elle permet également de montrer une interaction significativement positive ($p < 0.95$). Cela signifie que l'effet du traitement n'est pas identique suivant qu'il s'agit d'un petit ou d'un grand follicule. Cette interaction n'est néanmoins pas hautement significative. Par contre, ce test ne permet pas de montrer un effet du traitement sur la quantité des récepteurs à la GH dans les grands et petits follicules.

Un autre essai a été réalisé pour déterminer l'effet de la taille des follicules sur le nombre de récepteurs à la GH lors d'un traitement à la GH *in vitro*. Les valeurs de densité optique sont présentées dans le tableau IV.9 et à la figure IV.7 (moyenne \pm SEM, n=4).

grands follicules	petits follicules
1,274 \pm 0,168	2,551 \pm 0,146

Tableau IV.9 : Effet de la taille des follicules sur le nombre de récepteurs à la GH lors d'un traitement à la GH *in vitro*. Les valeurs présentées sont les moyennes \pm SEM (en D.O.) (n=4)

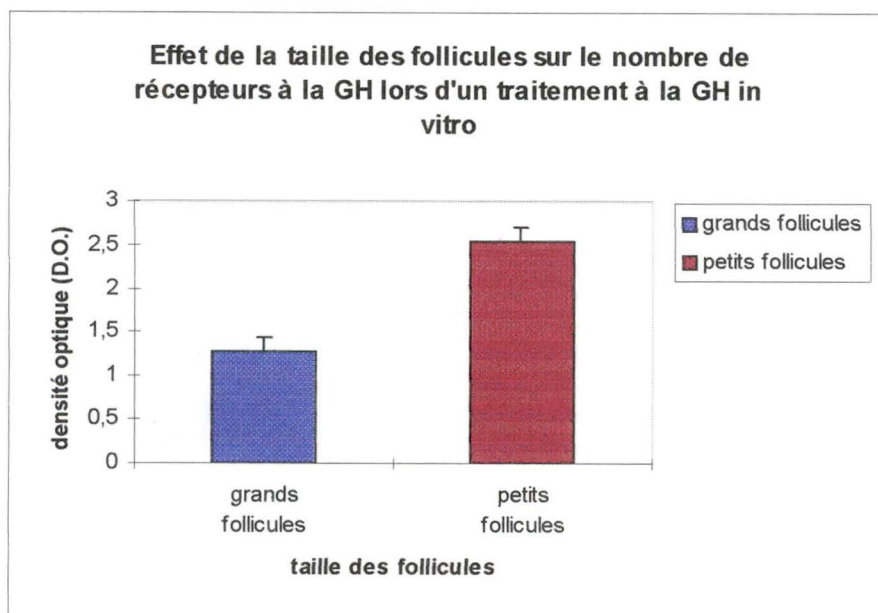


Fig.IV.7 : Effet de la taille des follicules lors d'un traitement à la GH *in vitro*. Les valeurs en D.O. présentées sont les moyennes \pm SEM (n=4).

Un test de comparaison de moyennes donne une différence hautement significative entre les valeurs obtenues pour les grands et les petits follicules ($p < 0.99$). Le nombre de récepteurs à la GH suite à un traitement à la GH *in vitro* est donc plus élevé dans les petits follicules.

2.B. Les récepteurs à la LH

Deux hormones interviennent principalement dans la maturation du follicule et l'ovulation. Ce sont la LH et la FSH. Dans le cadre de notre travail nous avons dès lors voulu étudier l'effet de divers facteurs sur les récepteurs à la LH et à la FSH. Ces facteurs sont la saison et un traitement à la GH *in vivo* et *in vitro*. Les résultats ne portent que sur les grands follicules.

Le premier essai a été réalisé pour montrer l'effet de la saison et d'un traitement à la GH *in vivo* sur le nombre de récepteurs à la LH dans les grands follicules.

Les valeurs de densité optique sont présentées dans le tableau IV.10 et à la figure IV.8 (moyenne \pm SEM, n=3) :

	témoin	GH in vivo
anoestrus	0,103 ± 0,053	0,045 ± 0,013
milieu de saison	0,162 ± 0,020	0,086 ± 0,004

Tableau IV.10 : Influence de la saison et du traitement sur le nombre des récepteurs à la LH sur les grands follicules. Les valeurs en D.O. présentées sont les moyennes ± SEM (n=3)

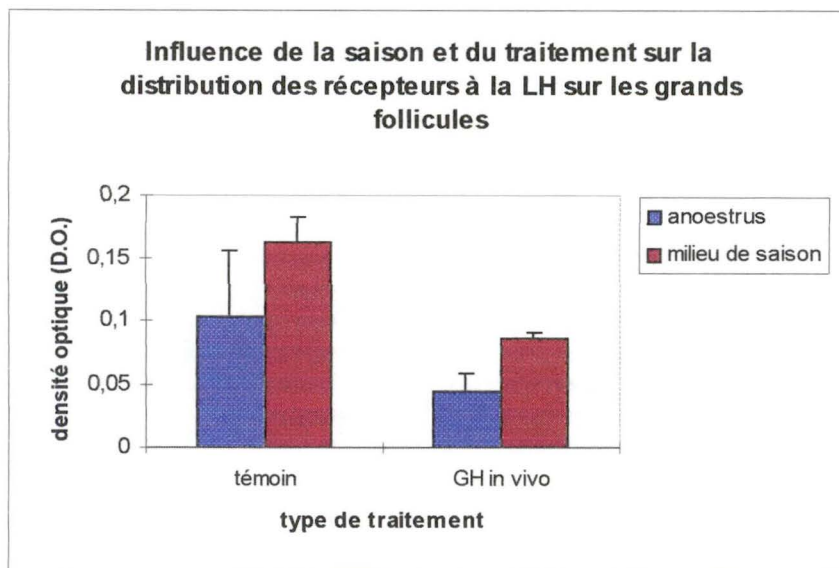


Fig.IV. 8 : Influence de la saison et du traitement à la GH in vivo sur le nombre de récepteurs à la LH au niveau des grands follicules. Les valeurs de D.O. présentées sont les moyennes ± SEM (n= 3).

L'analyse statistique ne permet pas de montrer une différence significative entre les valeurs obtenues pour les saisons et les traitements. Le nombre de récepteurs à la LH ne varierait donc pas au cours de la saison, ni suite à un traitement à la GH *in vivo*.

L'essai suivant a été réalisé pour déterminer l'effet de la saison sur le nombre de récepteurs à la LH lors d'un traitement GH *in vitro*. Les valeurs de densité optique sont présentées dans le tableau IV.11 et à la figure IV.9 (moyenne ± SEM, n=3).

anoestrus	milieu de saison
0,062 ± 0,006	0,108 ± 0,001

Tableau IV.11 : Effet de la saison sur le nombre de récepteurs à la LH lors d'un traitement GH in vitro. Les valeurs de D.O. présentées sont les moyennes ± SEM (n=3).

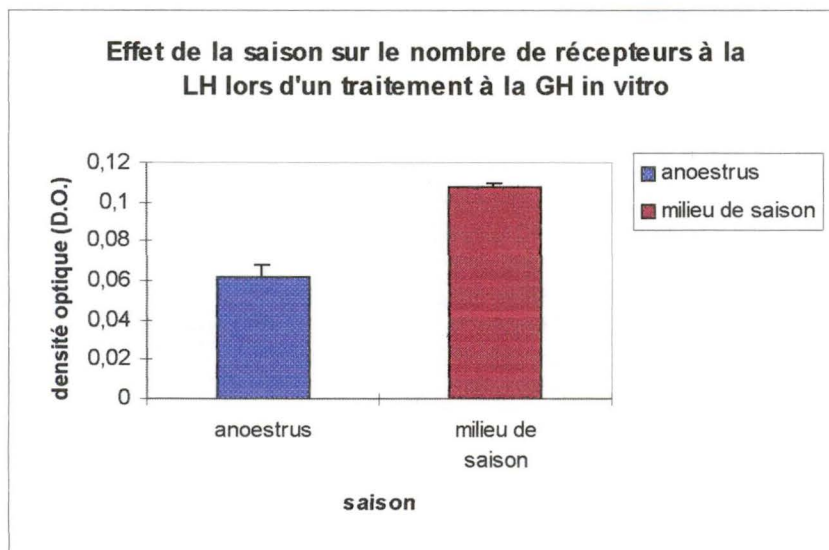


Fig.IV.9 : Effet de la saison sur le nombre de récepteurs à la LH lors d'un traitement à la GH *in vitro*. Les valeurs de D.O. présentées sont les moyennes \pm SEM (n=3).

L'analyse statistique permet de montrer un effet hautement significatif ($p < 0.99$) de la saison sur le nombre de récepteurs à la LH lorsqu'on traite les grands follicules à la GH *in vitro*. On remarque qu'un traitement à la GH *in vivo* n'influencerait pas le nombre de récepteurs à la LH mais bien un traitement *in vitro*.

2.C. Les récepteurs à la FSH

Comme pour la LH, nous avons étudié dans le cadre de notre travail l'influence de la saison et d'un traitement à la GH *in vivo* et *in vitro* sur le nombre de récepteurs à la FSH. Les résultats ne portent que sur les grands follicules.

Le premier essai a été réalisé pour déterminer la quantité des récepteurs à la FSH dans les grands follicules en fonction de la saison et d'un traitement à la GH *in vivo*.

Les résultats de densité optique sont présentés dans le tableau IV.12 et sur la figure IV.10 :

	témoin	GH in vivo
anoestrus	3,263 ± 0,103	0,148 ± 0,033
milieu de saison	0,443 ± 0,007	0,213 ± 0,048

Tableau IV.12 : Influence de la saison et du traitement sur le nombre des récepteurs à la FSH sur les grands follicules. Les valeurs de D.O. présentées sont les moyennes ± SEM (n=3)

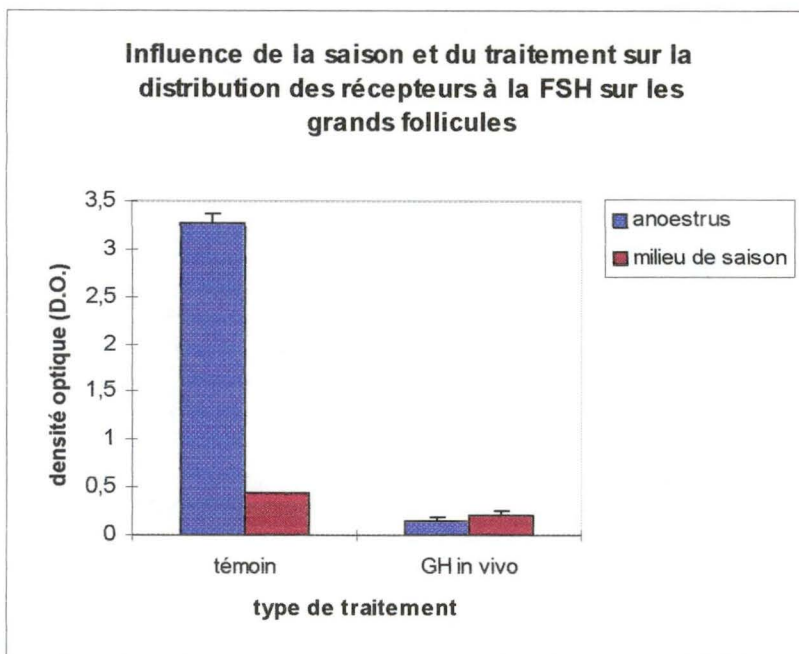


Fig.IV.10 : Influence de la saison et d'un traitement à la GH in vivo sur le nombre de récepteurs à la FSH pour les grands follicules. Les valeurs de D.O. présentées sont les moyennes ± SEM (n= 3).

L'analyse statistique permet de montrer un effet hautement significatif ($p < 0.99$) de la saison et du traitement ($p < 0.99$) sur la quantité de récepteurs à la FSH dans les grands follicules. L'interaction est également positive, ce qui veut dire que l'effet du traitement ne sera pas le même suivant la saison durant laquelle on traite les animaux ($p < 0.99$).

Un autre essai a été effectué pour étudier l'effet de la saison sur le nombre de récepteurs à la FSH lors d'un traitement à la GH *in vitro*. Les valeurs de densité optique sont présentées dans le tableau IV.13 et à la figure IV.11 (moyenne ± SEM, n=3).

anoestrus	milieu de saison
0,113 ± 0,037	0,237 ± 0,002

Tableau IV.13 : Effet de la saison sur le nombre de récepteurs à la FSH lors d'un traitement à la GH in vitro et ceci pour les grands follicules. Les valeurs présentées sont les moyennes ± SEM (en D.O.) (n=3).

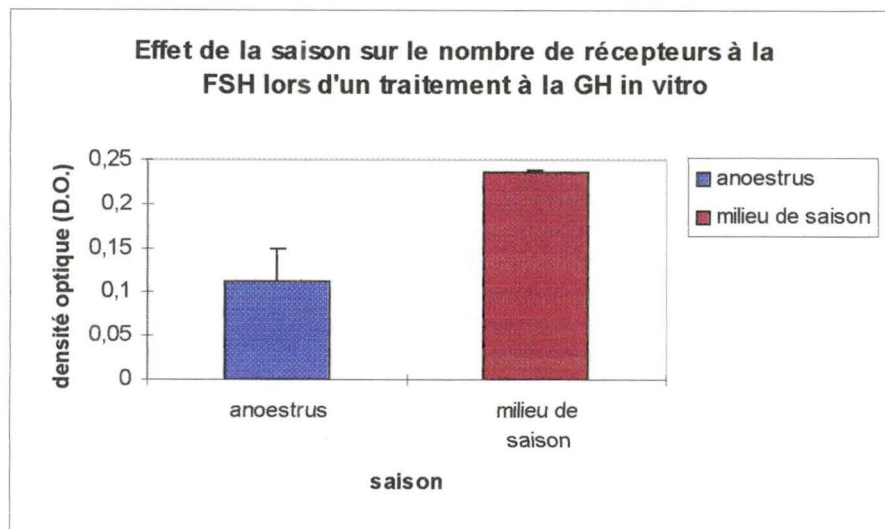


Fig.IV.11: Effet de la saison sur le nombre de récepteurs à la FSH pour les grands follicules lors d'un traitement à GH *in vitro*. Les valeurs de D.O. présentées sont les moyennes \pm SEM (n=3).

La différence entre les deux moyennes est hautement significative ($p < 0.99$). On en conclut qu'en milieu de saison, le nombre de récepteurs à la FSH est plus élevé lors d'un traitement *in vitro* à la GH.

2.D. Conclusions

Le tableau IV.14 résume les résultats obtenus lors des différents essais. On constate donc qu'un traitement à la GH *in vivo* influence le nombre de récepteurs à la FSH mais pas le nombre de récepteurs à la LH. Par contre, la saison, lors d'un traitement à la GH *in vitro* influence le nombre de récepteurs des deux hormones, LH et FSH. D'autre part, lors d'un traitement à la GH *in vitro* la saison n'influence pas le nombre de récepteurs à la GH. La taille et la saison influencent le nombre de récepteurs à la GH mais pas un traitement à la GH *in vivo*.

II.1. Les récepteurs à la GH

	saison	traitement à la GH <i>in vivo</i>	interaction
pour les grands follicules	++	-	++

	saison
lors d'un traitement à la GH <i>in vitro</i> pour les grands follicules	-

	taille	traitement à la GH <i>in vivo</i>	interaction
en milieu de saison	++	-	+

	taille
lors d'un traitement <i>in vitro</i> en milieu de saison	++

II.2. Les récepteurs à la LH

	saison	traitement à la GH <i>in vivo</i>	interaction
pour les grands follicules	-	-	-

	saison
lors d'un traitement à la GH <i>in vitro</i> pour les grands follicules	++

II.3. Les récepteurs à la FSH

	saison	traitement	interaction
pour les grands follicules	++	++	++

	saison
lors d'un traitement <i>in vitro</i> pour les grands follicules	++

+ significatif
 ++ hautement significatif

Tableau IV.14 : Tableau récapitulatif de l'analyse statistique des résultats obtenus par autoradiographie. Le signe + représente un effet significatif du facteur étudié. ++ représente un effet hautement significatif du facteur étudié. Le signe - signifie que l'expérience ne permet pas de montrer un effet significatif du facteur en question.

Chapitre V : Discussion

La discussion sera divisée en deux parties : la première sera une critique plus explicite des techniques du Ligand Binding en suspension cellulaire et une courte interrogation sur la technique de l'autoradiographie. La deuxième partie consistera en une discussion plus générale des résultats obtenus par ces deux techniques.

Première partie : Discussion des techniques utilisées

1. La technique du Ligand Binding en suspension cellulaire

La technique du Ligand Binding en suspension cellulaire, comme elle a été réalisée au cours de nos travaux, présente quelques faiblesses. Nous allons les passer en revue et discuter certains points de façon plus détaillée. Le premier point examiné est une critique plus générale des procédures de mesure de la liaison spécifique et totale. Ensuite nous allons nous attarder à la préparation des suspensions cellulaires (Fig.V.1) (1), à l'hormone marquée (2), à la température d'incubation (3) et enfin à l'utilisation du PEG (Polyéthylène glycol) (4).

Pour caractériser la fixation d'un ligand à son récepteur, on peut calculer le K_d (constante d'équilibre de dissociation) et le B_{max} (Concentration totale des récepteurs). Ces deux valeurs peuvent être déterminées par un 'plot de Scatchard'. En effet, le plot de Scatchard est un des moyens permettant de déterminer la *liaison de haute affinité* (donc la liaison spécifique) et la *liaison de basse affinité* (la liaison non spécifique). Dans le cas le plus simple, on obtient une droite. Cependant, on observe fréquemment des graphiques curvilinéaires. Ces incurvations peuvent être orientées vers le haut ou vers le bas (Fig.V.2). Les valeurs pour la courbe obtenue par nos résultats sur la figure V.2 se trouvent dans le tableau V.1. Les équations pour le calcul de K_d et B_{max} sont explicitées dans le tableau V.2 (Paul McGonigle et Molinoff, 1989). $[L]$ est la concentration du radioligand, $[R]$ la concentration du récepteur. $[RL]$ représente la concentration du complexe récepteur-radioligand et est également appelé $[B]$ pour 'bound' ou 'lié'. La constante cinétique du taux d'association est appelée k_{+1} et la constante cinétique de dissociation est notée k_{-1} .

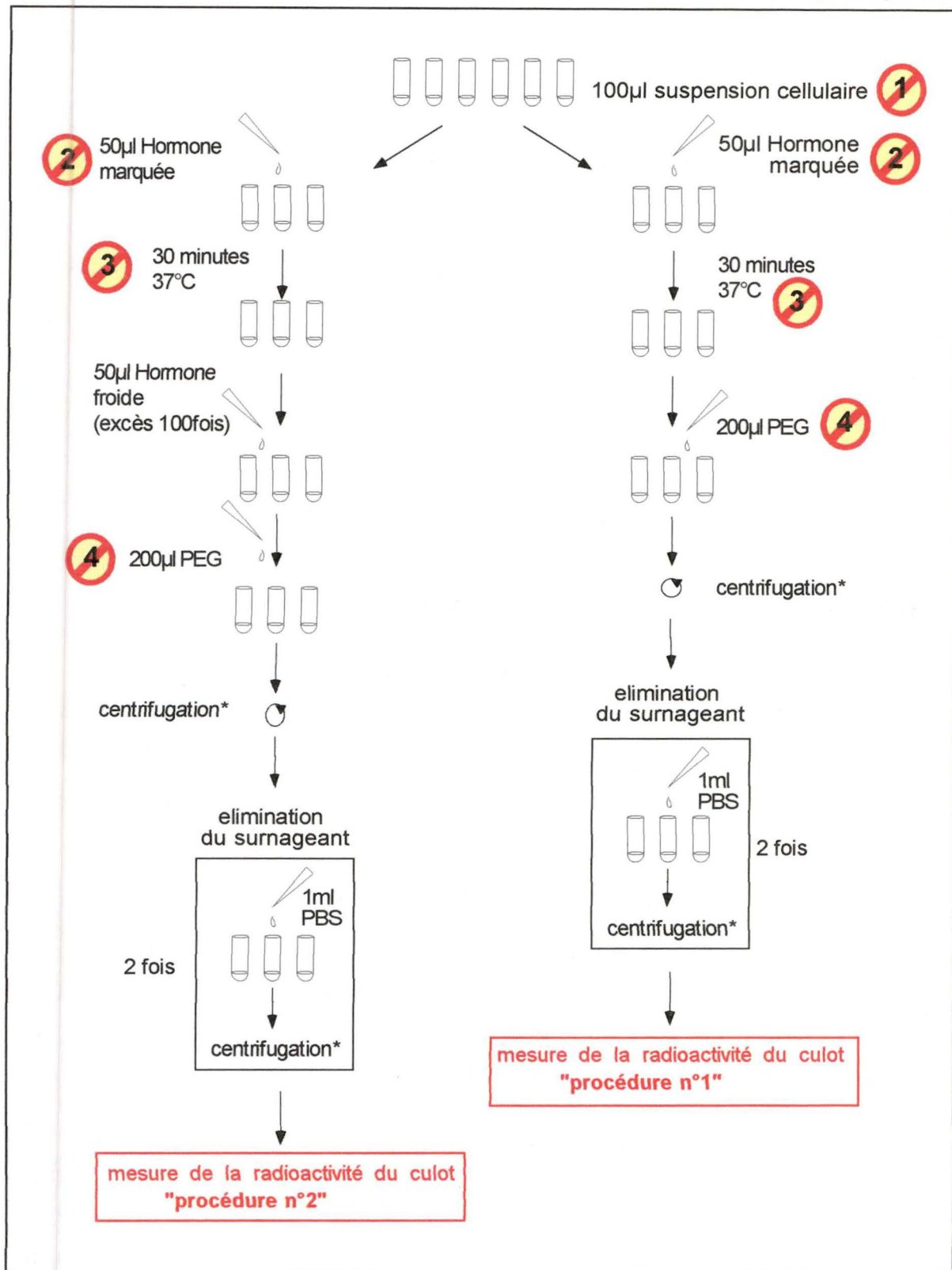


Fig.V.1: Ligand binding en suspension cellulaire. Les deux procédures utilisées. La procédure n°1 vise à mesurer la fixation totale d'hormone marquée à son récepteur. La procédure n°2 à mesurer la fixation spécifique. Les étapes discutées lors de la discussion des techniques sont indiquées par des numéros en couleur.

* centrifugation à 1200rpm, pendant 5 minutes à température ambiante

radioactivité	lié	libre	lié/libre
129915	411	129504	0,0031736
136370	474	135896	0,003488
344983	1539	343444	0,0044811
508794	2731	506063	0,0053966
616434	3998	612436	0,006528
744868	4912	739956	0,0066382

Tableau V.1 : Essai d'un plot de Scatchard avec les valeurs obtenues pour la fixation totale (lié). Les valeurs présentées sont des moyennes (en cpm) (n=3).

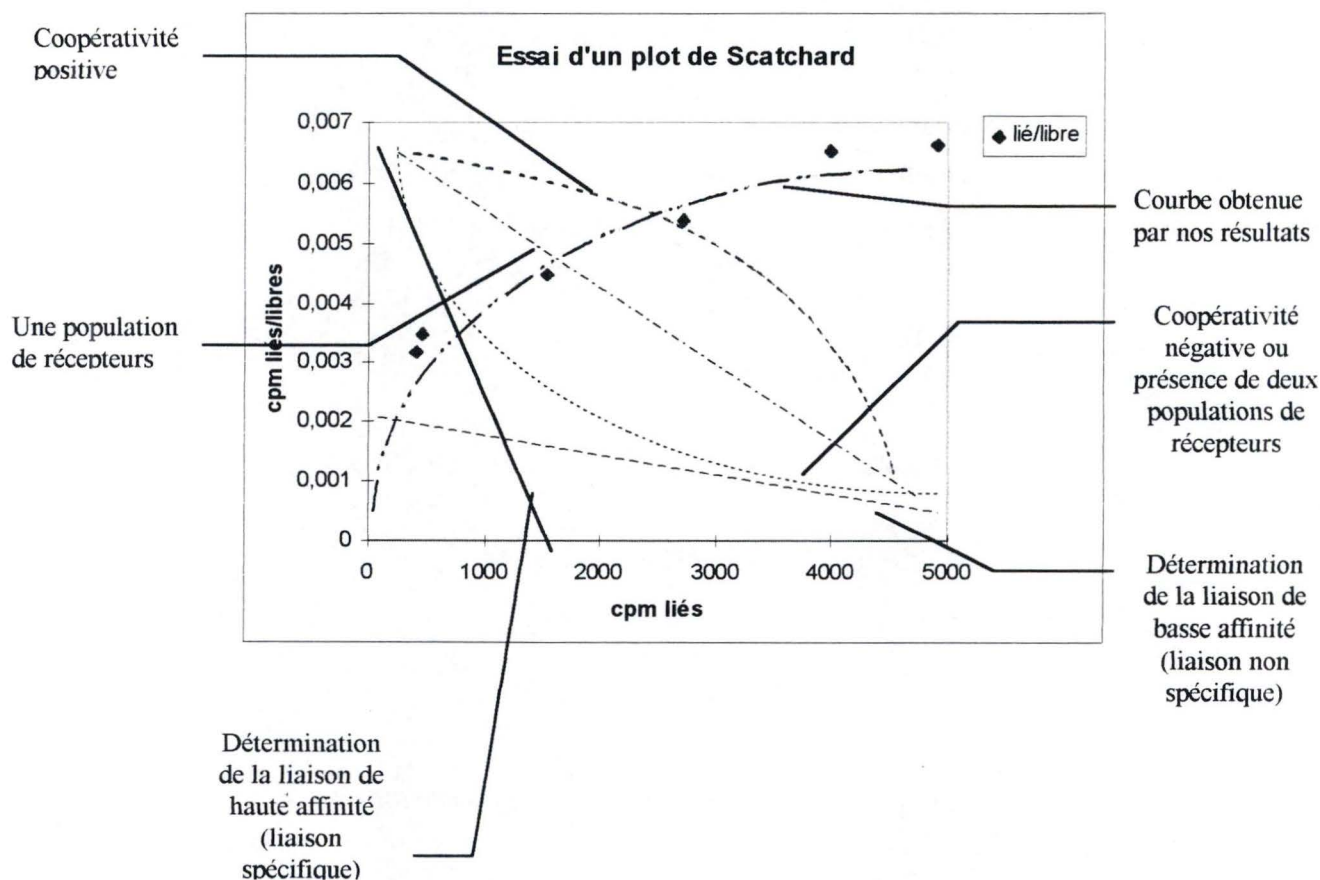
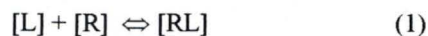


Fig. V.2 : Essai d'un plot de Scatchard. Lorsqu'on porte les valeurs du rapport des fractions liées/libres en fonction de la fraction liée, on obtient, dans le cas le plus simple, une droite. Cependant, il arrive fréquemment que le graphique obtenu soit curvilinéaire vers le bas soit vers le haut. Ces incurvations peuvent avoir deux origines. Prenons le cas d'une curvilinéarité vers le bas. Deux interprétations sont possibles : 1. Soit nous avons à faire à deux populations de récepteurs. 2. Soit nous avons un phénomène de coopérativité négative. Une curvilinéarité vers le haut peut indiquer l'existence d'une coopérativité positive. (Flamion et Mertens-Strijthagen, 1996)

LE SCATCHARD PLOT

L'interaction entre un ligand et un récepteur peut se décrire de la façon suivante :



La concentration du complexe radioligand-récepteur [RL] est souvent appelé la quantité fixée [B]

Selon la loi de l'action des masses, à l'équilibre on obtient :

$$K_d = [RL]/[B] \quad (2)$$

où K_d est la constante d'équilibre de dissociation.

Il est important de distinguer la concentration totale de ligand L dans une expérience et la concentration libre de ligand en solution à l'équilibre [L] - [B]. Les constantes de cinétique, k_{+1} et k_{-1} , et la constante de dissociation à l'équilibre, K_d , sont reliés de la façon suivante :

$$K_d = k_{-1}/k_{+1} \quad (3)$$

Comme le nombre total de récepteurs $[B_{\max}] = [R] + [B]$, la substitution de [R] dans l'équation (2) donne :

qui peut être réarrangé de telle manière :

$$[B] = [B_{\max}] [L] / [L] + K_d \quad (5)$$

Dans une expérience de « saturation » typique, des quantités croissantes d'un radioligand sont ajoutés pour une concentration fixe de récepteur, [B], est mesuré comme une fonction de la concentration du radioligand.

La concentration du radioligand est augmentée jusqu'à ce que tous les récepteurs sont virtuellement occupés par le ligand (Fig.xx).

Tableau V.2 : Les équations du plot de Scatchard. Calcul de K_d et B_{\max} . (McGonigle et Molinoff, 1989)

Tout d'abord, pour faire un plot de Scatchard, certaines conditions doivent être remplies. Premièrement, les sites de liaison doivent être *saturables*. C'est le *critère de saturabilité*. Ce critère peut être vérifié en incubant une préparation contenant un nombre fixe de récepteurs avec une quantité croissante en hormone marquée. Si les sites de liaison sont saturables, la courbe atteindra un plateau (Fig.V.3) (Paul McGonigle et Molinoff, 1989). Au niveau de ce plateau, tous les sites de liaison sont saturés et l'hormone excédentaire ne se fixe plus. Deuxièmement, la liaison doit être *réversible*. Ce *critère de réversibilité* peut être vérifié en réalisant une expérience de dilution croissante avec de l'hormone froide. La quantité d'hormone marquée contenue dans le surnageant est mesurée pour chaque dilution. Si la liaison est réversible, la quantité d'hormone marquée dans le surnageant augmente avec la dilution (Fig.V.4). L'affinité du récepteur K_a (constante d'équilibre d'association) pour la GH chez le lapin et chez l'homme a été mesurée par Leung *et al.*, (1987). Ils trouvent une valeur de $K_a = 10 \cdot 10^{-9} M^{-1}$. Cette valeur permet de calculer l'énergie de la liaison entre l'hormone de croissance et son récepteur. En effet,

$$\Delta G_o = - RT \ln K_a$$

où $R = 1.98 \text{ cal/mole} \cdot ^\circ\text{C}$ et $T = 273 + 37^\circ\text{C} = 310^\circ\text{C}$

Nous trouvons une valeur de $\Delta G_o = 8.389 \text{ Kcal /mole}$

Les liaisons de Van de Waals sont caractérisées par une énergie de 1Kcal/mole, les liaisons par ponts d'Hydrogène par une énergie de 2 à 5 Kcal/mole, les liaisons ioniques par une énergie de 5 Kcal/mole. Les liaisons covalentes d'énergie plus élevées sont caractérisées par un ΔG_o de 40 à 140 Kcal/mole (Gies,1993). La liaison de la GH est donc supérieure en énergie à la liaison ionique. Le fait que l'énergie de liaison de la GH à son récepteur est élevée peut suggérer que la GH se dissocierait difficilement de son récepteur, une fois qu'elle est fixée. Ceci suscite une question se rapportant à l'internalisation du complexe hormone-récepteur. Nous discuterons cette question plus tard.

Lorsque les interactions récepteur-ligand sont étudiées, une mauvaise définition de ce qui est liaison 'spécifique' et 'totale' pose souvent problème dans l'interprétation des résultats. En effet, une estimation incorrecte de la composante *non spécifique* est une source d'erreur commune résultant en une surestimation de la densité des récepteurs et dans quelques cas mène à la conclusion que des multiples classes de récepteurs coexistent dans un tissu donné.

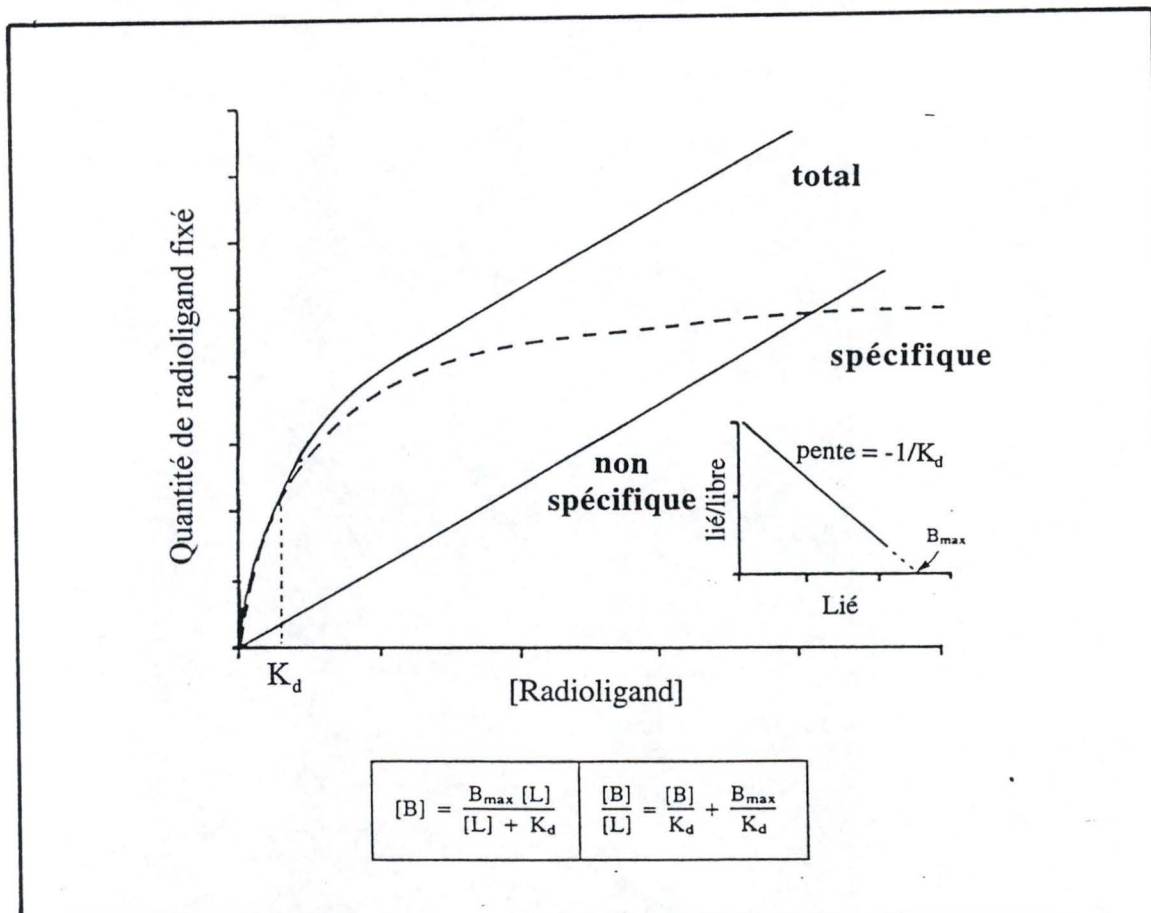


Fig.V.3 : Analyse d'une expérience de saturation. La quantité de radioligand fixé de façon spécifique à son récepteur est déterminé en soustrayant la quantité de radioligand fixé de façon non spécifique de la quantité totale fixée. L'équation à gauche décrit la relation entre [B] (quantité fixée de façon spécifique) et la concentration en radioligand [L] entre le nombre total de récepteurs B_{max} et la constante de dissociation K_d . A l'intérieur du graphe se trouve la transformation de l'équation de saturation par la méthode de Scatchard. Elle décrit la relation linéaire entre le rapport fixé/libre et libre (bound/free et free). La pente de la droite est $-1/K_d$ et l'interception avec l'axe des abscisses donne B_{max} . (McGonigle et Molinoff, 1989)

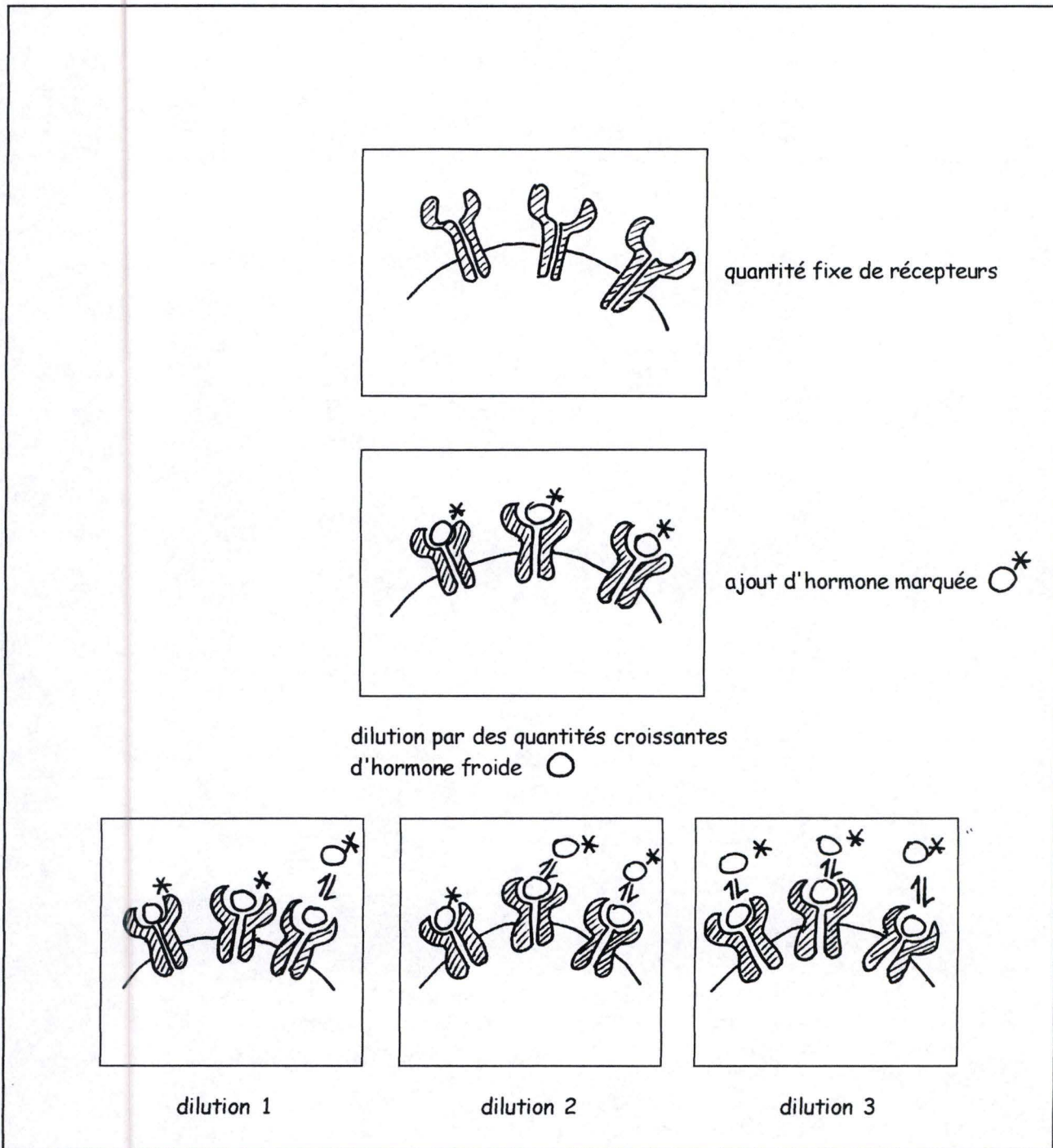


Fig.V.4 : Expérience de dilution. Une quantité fixe de récepteurs est incubé avec de l'hormone marquée. Ensuite on ajoute des quantités croissantes d'hormone non marquée. Si la fixation est réversible, l'hormone non marquée va occuper la place de l'hormone marquée. La quantité d'hormone marquée dans le surnageant augmentera avec les dilutions croissantes. Les dilutions 1, 2 et 3 représentent les quantités croissantes en hormone non marquée.

La liaison non spécifique peut être quantifiée en ajoutant des concentrations élevées d'un ligand compétitif non marqué qui est spécifique pour le récepteur en question. *La quantité de radioligand (ou hormone marquée) qui reste fixée en présence du ligand non marqué est définie comme la liaison non spécifique.* Dans une expérience dite de saturation, la composante de fixation non spécifique à chaque concentration en radioligand est soustraite de la quantité totale de radioligand fixé pour obtenir la quantité de radioligand fixée spécifiquement au récepteur (Fig.V.3). En général, les meilleurs résultats sont obtenus quand la substance utilisée pour mesurer la liaison spécifique est d'une classe chimique différente que celle du radioligand et quand la concentration en ligand compétitif est à peu près 100 fois supérieure à la valeur du K_d du ligand. Des concentrations plus élevées en ligand peuvent inhiber la fixation spécifique aussi bien que la fixation non spécifique (Landry et Gies, 1993).

Après ces considérations générales, nous allons maintenant examiner de plus près quelques observations faites lors de nos expériences. Premièrement, nous avons tenté de réaliser une courbe de saturation. L'expérience a été réalisée avec les deux procédures présentées à la figure V.1. Nous y reviendrons au point 1.b quand nous discuterons les différences entre ces deux procédures. Les valeurs de cpm de la procédure n°1 sont présentées dans le tableau V.3 et à la figure V.5 (moyennes \pm SEM, $n = 3$).

Les conditions de travail sont celles présentées dans la procédure n°1 (Fig.V.1). La courbe théorique est présentée en trait plein sur la figure V.5. Nous sommes frappée par le fait que la saturation, même en présence d'une radioactivité très forte (700 000 cpm) n'est apparemment pas atteinte. 700 000 cpm en GH radioactive correspond à une concentration de 14 ng/100 μ l environ. Channing et Ledwitz-Rigby (1975) travaillent avec des cellules granulosales à des concentrations de 0.1 μ g/100 μ l de LH radioactive. Peut-être nous trouvons nous effectivement en dessous du seuil de la saturation. L'établissement d'une courbe de saturation correcte pour la GH semble indispensable. Néanmoins, une question persiste : pourquoi si peu d'hormone radioactive se lie-t-elle sur les cellules ? Nous avons calculé le pourcentage d'hormone radioactive liée (mesurée par la procédure n°1) par rapport à la quantité totale d'hormone marquée. Cette mesure a été faite pour l'hormone de croissance sur les hépatocytes. La courbe semble atteindre un plateau à 800 000 cpm (Fig.V.6). La liaison serait donc *saturable* : cela signifierait que la proportion d'hormone fixée par rapport à la quantité d'hormone totale n'augmenterait plus pour des quantités d'hormone radioactive plus

radioactivité totale (cpm)	'fixation totale' (cpm) (procédure n°1)
129915	474 ± 11
136370	411 ± 11
344983	1569 ± 134
508794	2731 ± 78
616434	3998 ± 111
744868	4912 ± 381

Tableau V.3 :Essai d'une expérience de saturation. Les valeurs présentées sont les moyennes ± SEM, n=3.

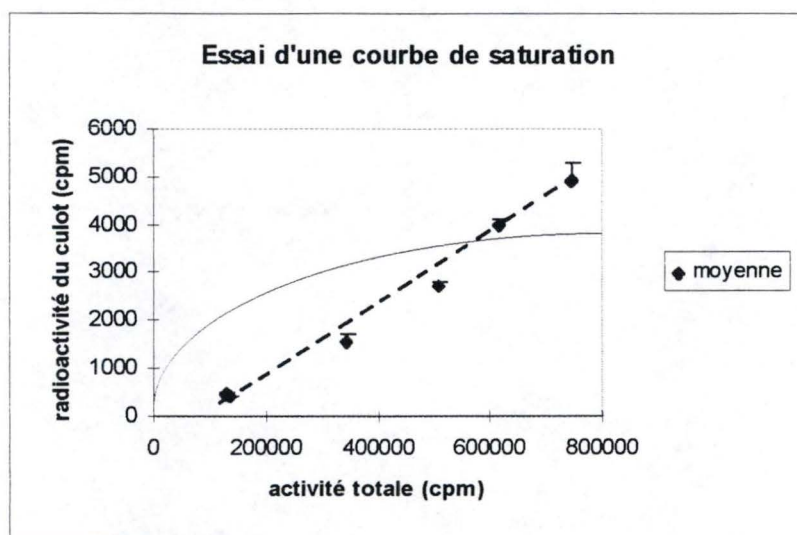


Fig.V.5 : Essai d'une expérience de saturation. Les valeurs en cpm présentées sont les moyennes ± SEM (n=3)

fixé	radioactivité totale (quantité totale en hormone marquée)	fixé/radioactivité totale	lié/radioactivité totale en %
411	129915	0.003	0.316
474	136370	0.003	0.348
1539	344983	0.004	0.446
2731	508794	0.005	0.537
3998	616434	0.006	0.649
4912	744868	0.007	0.659

Tableau V.4: Calcul du pourcentage d'hormone fixée par rapport à la quantité totale d'hormone marquée. La radioactivité totale correspond à la quantité d'hormone marquée totale. Toutes les valeurs sont des moyennes de fixation totale exprimées en cpm (n=3)

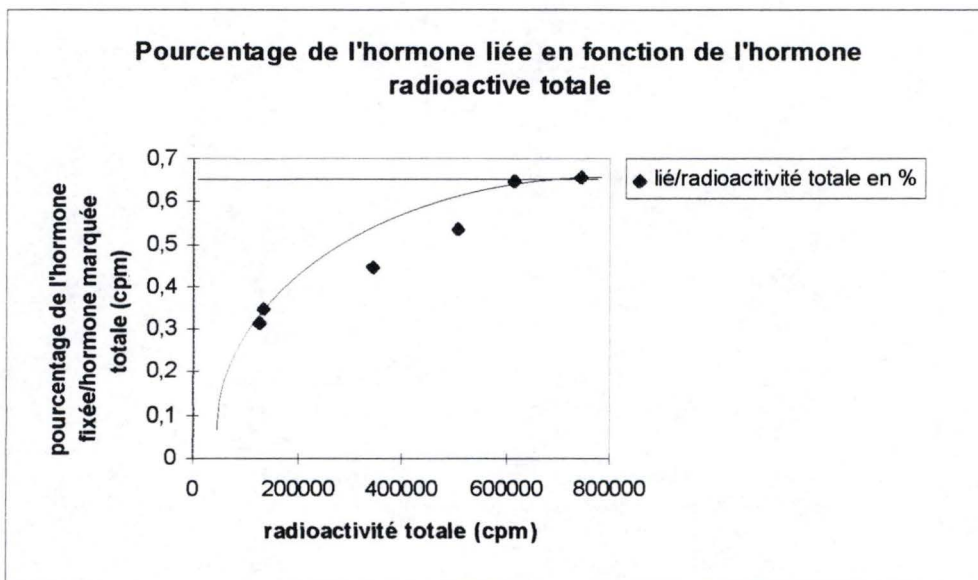


Fig. V.6 : Représentation graphique du pourcentage d'hormone fixée par rapport à la quantité totale d'hormone de croissance radioactive. Les valeurs présentées sont des moyennes en cpm (n=3).

élevées. Or, lors de l'essai de l'expérience de saturation la courbe ne semble pas atteindre la saturation (Fig.V.5). D'autres paramètres, inconnus jusqu'à présent joueraient-ils un rôle, de sorte que nos résultats soient biaisés ? Peut-être que notre méthode de mesure fausse les résultats. Nous y reviendrons au moment de la critique de la procédure.

En traçant la tangente au plateau, nous trouvons un pourcentage de 0.65% environ (Fig.V.6). Pourtant, les hépatocytes semblent posséder une grande densité en récepteurs à la GH (Le Cam et Legraverend, 1993) et on s'attendrait à obtenir une valeur plus élevée.

Après ces réflexions sur la nature de la liaison de l'hormone de croissance radioactive aux hépatocytes, penchons-nous sur la procédure par laquelle nous avons obtenu ces résultats. La figure V.1 indique les points faibles que nous allons discuter de façon plus détaillée .

a) La suspension cellulaire (1)

Etant donné qu'une séparation des différents types cellulaires et une caractérisation des cellules n'a pas été faite, la suspension cellulaire de travail est certainement hétérogène et contient donc d'autres types cellulaires non identifiés. Il faut tenir compte de la variation liée au fait que chaque aliquot est obtenu à partir d'animaux différents. Les cellules hépatiques isolées proviennent donc d'organes dont l'état physiologique n'est pas connu et d'animaux dont l'état de santé n'a pas été répertorié. En conclusion, la suspension cellulaire, comme elle a été utilisée ici n'a pas été suffisamment caractérisée.

b) L'hormone marquée (2)

Comme déjà annoncé, une expérience dite de saturation pour la GH s'impose. Cette expérience devrait être réalisée pour les hépatocytes, les cellules granulosales de petits et de grands follicules. A partir du moment où la concentration de saturation pour les trois hormones et pour les trois types cellulaires est déterminée, les liaisons spécifique et non spécifique devraient pouvoir être déterminées. Pour ce faire, l'expérience devrait comporter les étapes suivantes. D'abord, déterminer la *liaison totale*. Elle se mesure en incubant un nombre fixe de récepteurs avec une quantité croissante en hormone marquée. Cette étape se rapproche de notre 'procédure n°1'. La deuxième étape consiste à incuber une quantité fixe de récepteurs avec de l'hormone marquée surchargée en hormone froide (un excès de 100 fois environ) pour déterminer la *liaison non spécifique*. Notre procédure n°2 poursuit ce but. Elle est basée sur les travaux de Channing et Ledwitz-Rigby (1975). La troisième étape consiste à

radioactivité totale	procédure n°2	procédure n°1
129915	513 ± 76	411 ± 11
136370	490 ± 63	474 ± 11
344983	1506 ± 1539	1539 ± 134
508794	3416 ± 2731	2731 ± 78
616434	4083 ± 3998	3998 ± 111
744868	5237 ± 4912	4912 ± 381

Tableau V.5 : Résultats obtenus par les procédures n°1 et n°2 (Fig.V.1) pour l'essai de saturation. Les valeurs présentées sont les moyennes ± SEM (en cpm) (n=3).

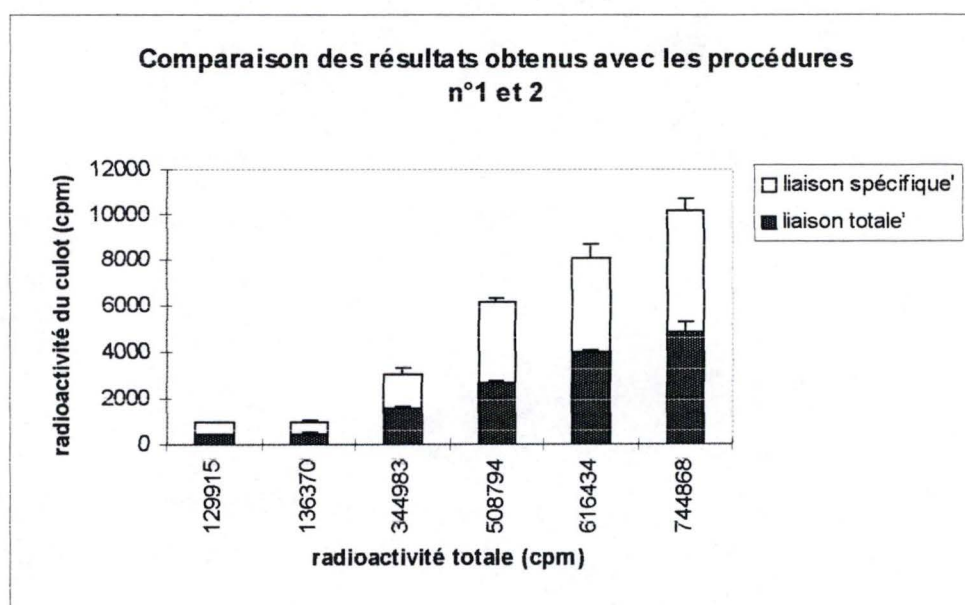


Fig.V.7 : Comparaison des résultats obtenus par les deux procédures n°1 et 2 (Fig.V.1) pour l'essai de saturation. Les valeurs présentées sont des moyennes ± SEM (en cpm) (n=3)

séparer la fraction d'hormone liée de son récepteur. Ceci peut être fait par centrifugation ou filtration dont les détails ne sont pas explicités ici. La radioactivité du culot et du surnageant est mesurée. La *liaison spécifique* s'obtient en soustrayant la liaison non spécifique de la liaison totale.

Nous présentons maintenant les résultats obtenus par les deux procédures 1 et 2. La procédure n°1 établit la 'liaison totale', la procédure n°2 devait servir à mesurer la 'liaison spécifique'. Les valeurs en cpm sont présentées dans le tableau V.5 et à la figure V.7 (moyenne \pm SEM, n=3).

La division des valeurs de la procédure n°1 par celles de la procédure n°2 donne en moyenne une valeur de 0.92 ± 0.039 . La mesure obtenue par la procédure n°1 est donc constamment inférieure à la mesure obtenue par la procédure n°2. De plus, l'écart entre les deux mesures s'accroît au fur et à mesure que la quantité en hormone marquée augmente (Fig.V.7).

Afin de donner un élément d'explication à cet écart entre les résultats obtenus avec les deux procédures, examinons de près les conditions d'incubation, à savoir la température et le temps d'incubation.

c) Le temps et la température d'incubation (3)

Le choix du temps et la température pour réaliser les incubations des cellules avec l'hormone marquée se base sur les travaux de Channing et Ledwitz-Rigby (1972). En effet, ce groupe de chercheurs étudie l'effet de la LH sur les cellules granulosales et la production d'AMPc par ces dernières. Or, la GH est internalisée lorsqu'elle se lie à son récepteur (Lobie, 1994). Cette internalisation a lieu au dessus d'une température de 10°C. D'après Lobie, l'hormone de croissance apparaît à la surface membranaire, puis dans les lysosomes et dans les 'multivesicular bodies' et /ou à la membrane nucléaire avant la translocation finale dans la matrice nucléaire. Lobie conclut aussi que l'internalisation de la GH est dépendante de son récepteur. Un cycle d'internalisation et de recyclage du récepteur dure environ 20 minutes et la translocation maximale aurait lieu après 30 minutes (Lobie, 1994). Nous avons réalisé une expérience avec les hépatocytes pour vérifier cette internalisation de la GH. Pour cela, nous avons incubé des hépatocytes pendant 60 minutes avec de l'hormone marquée (200 000 cpm/100µl). Une série de tubes a été incubée à une température de 4°C, l'autre à 37°C. Après l'incubation, les noyaux ont été isolés selon une procédure explicitée dans la partie 'annexe' et

4°C	37°C
1100 ± 635	3800 ± 2194

Tableau V.6 : Radioactivité intranucléaire après incubation à 4°C et à 37°C pendant 60 minutes. Les valeurs présentées sont les moyennes ± SEM (en cpm) (n=3).

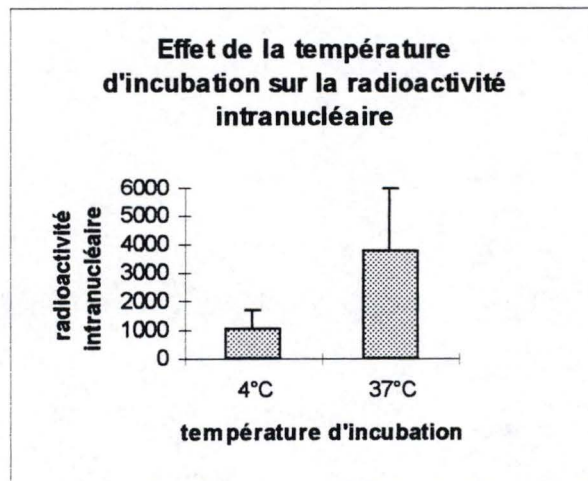


Fig.V.8 : Effet de la température d'incubation sur la radioactivité intranucléaire. Les valeurs en cpm présentées graphiquement sont les moyennes ± SEM (n=3)

leur radioactivité a été mesurée. Les valeurs en cpm de la procédure n°1 sont présentées dans le tableau V.6 et à la figure V.8 (moyennes \pm SEM, n=3).

Le graphe montre clairement qu'à 37°C la radioactivité intranucléaire est plus élevée qu'à 4°C. Notre expérience confirmerait donc l'hypothèse de Lobie (1994), selon laquelle la GH est internalisée dans le noyau. Si cette hypothèse est vraie, on pourrait expliquer la valeur relativement élevée du ΔG_0 calculé (8.389 Kcal/mole). Pour cette même raison d'internalisation nous pourrions expliquer, du moins en partie, le fait que les résultats obtenus par la procédure n°2 sont toujours plus élevés que ceux de la procédure n°1 (Fig.V.7). En effet, lors de la procédure n°2, les cellules restent au total pendant 60 minutes en contact avec l'hormone marquée. Lors de la procédure n°1, ce temps n'est que de 30 minutes. Comme la température d'incubation est de 37°C, les récepteurs sont susceptibles de s'internaliser. La quantité de radioactivité accumulée dans les cellules sera donc plus élevée dans la procédure n°2.

Le fait qu'il y aurait internalisation du complexe récepteur-ligand pourrait être une des raisons pour lesquelles notre courbe de saturation et l'essai du plot de Scatchard présentent une allure tout à fait inhabituelle. En effet, si en plus l'hormone radioactive complexée à son récepteur on mesure aussi la radioactivité *intracellulaire* et *intranucléaire* il n'est pas étonnant d'obtenir des résultats aberrants. Pour remédier à ce problème les expériences d'incubation devraient être réalisées à 4°C. Ainsi, l'internalisation bloquée, une mesure de la radioactivité en surface exclusivement et donc des récepteurs sera possible.

d) Le PEG (Polyéthylène glycol)(4)

Le dernier élément examiné est l'ajout du PEG. En effet, l'ajout du PEG pourrait faire partie des raisons pour lesquelles les valeurs obtenues par la procédure n°2 sont toujours plus élevées que les valeurs obtenues par la procédure n°1. Le polyéthylène glycol est ajouté pour assurer une bonne cohésion du culot cellulaire. Or, lors de la procédure n°2, la quantité de protéines augmente considérablement. Ainsi, l'hormone marquée et froide est diluée dans du milieu de culture M199 contenant 2% de BSA. Les protéines se caractérisent par le fait qu'elles peuvent s'adsorber sur des surfaces en polystyrène par des liaisons de faible énergie (liaisons de Van der Waals, liaisons hydrophobes etc.). Comme nous réalisons nos incubations dans les tubes en polystyrène, il se peut que les protéines (hormones marquées, hormones froides, BSA) s'adsorbent sur les parois des tubes. En plus, par les mêmes liaisons faibles, les

hormones peuvent former des amalgames protéiniques qui seraient retenus dans les tubes, d'autant plus que le PEG les retiendrait dans le culot. Ces amalgames se composeraient d'hormone froide, d'hormone marquée libre, d'hormone marquée fixée et de BSA. Pour vérifier si le contenu dans le culot de la procédure n°2 est effectivement plus élevé après lavage et au moment de la mesure de la radioactivité, il suffirait de réaliser un dosage des protéines du culot dans les deux procédures, par exemple par la méthode de Lowry.

Conclusion pour la technique du Ligand Binding en suspension cellulaire

Avant de passer à une brève critique de l'autoradiographie (qui est aussi une technique de Ligand Binding), résumons en quelques lignes la critique de la technique du Ligand Binding en suspension cellulaire. Les critères de la saturabilité et de la réversibilité doivent être vérifiés pour pouvoir faire un plot de Scatchard. Le plot de Scatchard nous permettrait de caractériser la fixation de l'hormone de croissance à son récepteur et donc de déterminer la constante de dissociation (K_d) et la densité des récepteurs (B_{max}). Or, une internalisation du complexe récepteur-ligand est observée. Un moyen d'éviter cette internalisation serait de travailler à 4°C, température à laquelle l'internalisation devrait être bloquée. Une autre constatation frappante est qu'apparemment uniquement 0.65% de l'hormone de croissance marquée se lierait aux cellules hépatiques. Ceci paraît étonnant car les hépatocytes sont avec les adipocytes les cellules qui présentent le nombre de récepteurs à la GH le plus élevé (Le Cam et Legraverend, 1993). Il se pourrait que la GH soit abîmée lors de l'iodination. En effet, celle-ci se fait par oxydation de la protéine et une partie plus ou moins importante de la structure tertiaire pourrait être perdue. Les sites de contact entre la GH et son récepteur sont bien déterminés. Si les sites de liaison au niveau de la GH sont altérés, il se peut que la GH ne puisse plus se fixer sur son récepteur avec la même efficacité. Comme l'activité de l'hormone de croissance marquée n'a pas été vérifiée, l'iodination pourrait avoir altéré les capacités de fixation de l'hormone. Le fait que la procédure n°2 donne toujours des valeurs plus élevées que celles obtenues par la procédure n°1 peut être dû soit à la façon de préparer les suspensions cellulaires, soit au fait qu'une internalisation de l'hormone radioactive aurait lieu. Enfin, le PEG pourrait constituer un facteur pouvant augmenter les valeurs de la procédure n°2 en formant un réseau qui enchasserait des amalgames de protéines contenant de l'hormone libre marquée.

2. La technique de l'autoradiographie

La technique de l'autoradiographie partage deux faiblesses avec la technique du Ligand Binding en suspension cellulaire : celle de la mesure incorrecte de la liaison totale, spécifique et non spécifique et celle de l'hormone radioactive qui a peut-être une faculté moindre de se fixer à son récepteur. Dans la technique du Ligand Binding on observe que la liaison 'totale' est inférieure à celle mesurée après incubation avec de l'hormone froide. Dans la technique de l'autoradiographie, on observe le contraire : souvent les coupes incubées avec de l'hormone marquée puis avec de l'hormone froide (Fig.III.3) donnent de si faibles valeurs de D.O. que le logiciel d'analyse d'image ne parvient pas à mesurer leur valeur.

Comme dans la technique du Ligand Binding en suspension cellulaire, l'hormone de croissance utilisée a été iodinée par oxydation, donc à la chloramine T, et il se peut que l'hormone voit sa faculté de fixation à son récepteur diminuée. Pour vérifier ce paramètre, des hormones radioactives fabriquées par différents processus d'iodination et l'activité de l'hormone marquée devraient être testées.

La qualité des coupes autoradiographiées n'est pas toujours très bonne et des taches noires (peut-être du BSA ayant fixé de l'hormone marquée ?) sont souvent observées sur les coupes. Par manque de temps la qualité des coupes n'a pu être améliorée.

Dans la technique du Ligand Binding en suspension cellulaire, on rencontre le problème de la contamination par d'autres types cellulaires car les cellules n'ont pas été purifiées. En autoradiographie, des coupes de follicules entiers sont réalisées et incubées avec de l'hormone marquée. Or, un follicule est constitué d'une granulosa et d'une thèque et une limite visible entre ces deux couches n'existe pas. Nous sommes donc incapables de dire si la densité optique mesurée sur les coupes de follicules provient de la liaison de l'hormone marquée aux récepteurs de la granulosa ou de la thèque ou des deux. Les conclusions tirées ne pourront donc jamais porter que sur l'entièreté du follicule.

L'analyse informatisée des coupes d'autoradiographie présente un avantage important. En effet, un comptage des grains d'argent (les spots) à l'oeil nu n'est pas possible car la distribution des spots sur le tissu n'est pas homogène. Il existe des zones de grande densité à côté de zones de faibles densités de spots. De plus, l'intensité du spot n'est pas toujours la même. L'avantage du logiciel d'analyse d'image SUN est une mesure de la D.O.

du tissu entier: Tous les spots ayant une intensité inférieure à un certain seuil (déterminé par l'expérimentateur) n'entreront pas dans la D.O. mais font partie de la valeur 'background'. Ce 'background' est soustrait de la valeur totale de D.O.. Un autre avantage de l'utilisation d'un logiciel d'analyse d'image est qu'une erreur éventuelle sera toujours la même pour toutes les lectures de D.O.. Un comptage à l'oeil nu est tout à fait subjectif et faussera les mesures. Dans le cadre de notre travail la droite d'étalonnage a été établie pour le tissu hépatique. Elle devrait également être établie pour les coupes de follicules autoradiographiées.

Conclusion pour l'autoradiographie

En autoradiographie, nous rencontrons donc les mêmes problèmes que pour la technique du Ligand Binding en suspension, à savoir la définition correcte de la liaison totale, spécifique et non spécifique. La qualité de la GH radioactive est à vérifier par l'utilisation d'hormones marquées par différentes procédures. La qualité des hormones marquées au laboratoire pourrait éventuellement être comparée à des hormones commerciales.

La densité optique mesurée sur les coupes d'autoradiographie peut provenir d'un marquage radioactif de la granulosa, de la thèque ou des deux ; cela complique l'interprétation d'un effet des différents paramètres (saison, traitement à la GH etc.). Il se peut par exemple qu'un traitement à la GH augmente le nombre de récepteurs à la LH de la thèque par rapport à un témoin. Or, si ce même traitement diminue le nombre de récepteurs à la LH sur la granulosa, la D.O. mesurée ne va pas varier sensiblement. On en déduira que le traitement à la GH en question n'influence pas le nombre de récepteurs à la LH dans le follicule. Il se peut pourtant que la physiologie de la thèque et de la granulosa ait complètement changé : notre expérience ne permettrait pas de le détecter.

Enfin, afin de pouvoir déduire le nombre de spots obtenus par autoradiographie à partir de la D.O., il serait plus prudent d'améliorer d'abord la qualité des coupes d'autoradiographie et d'établir la droite d'étalonnage pour les petits et grands follicules.

Deuxième partie : Discussion générale des résultats obtenus

1. Les résultats obtenus par la technique du Ligand Binding en suspension

Beaucoup de chercheurs ont essayé de déterminer la localisation du récepteur à la GH au niveau des différents sites de l'ovaire en utilisant les techniques les plus diversifiées. Les résultats sont loin d'être concordants et les avis sont très partagés. Ainsi, Lucy *et al.*, (1993) ont étudié la distribution du récepteur à la GH dans l'ovaire de la vache. Ils observent que la plupart des follicules sont négatifs, ainsi que le stroma, le tissu conjonctif et l'endothélium vasculaire. Les seules cellules exprimant le récepteur à la GH seraient les grandes cellules lutéales du corps jaune. Shahara et Nieman (1994) trouvent que les cellules granulosales humaines de follicules dominants expriment le récepteur à la GH, ainsi que le corps jaune, le corpus albicans et l'endothélium vasculaire. Par contre, les follicules préantraux, la thèque interne, les ovocytes et le stroma n'exprimeraient pas le récepteur. Selon Carlsson *et al.* (1993), les follicules et les corps jaunes du rat possèdent des récepteurs à la GH.

Nos résultats obtenus par la technique du Ligand Binding en suspension cellulaire ne nous permettent pas de tirer des conclusions concernant l'abondance relative des récepteurs à la GH, à la LH et à la FSH sur les différents types cellulaires car la liaison spécifique n'est pas connue. La composante non spécifique peut varier d'un type d'hormone et de cellule à l'autre de telle façon qu'une comparaison fiable est impossible. Néanmoins, nous pouvons estimer quelques tendances. Les hépatocytes présentent un grand nombre de récepteurs à la GH et à la LH. Une deuxième tendance est le nombre assez élevé de récepteurs à la FSH et un nombre moyen de récepteurs à la LH sur les cellules granulosales des petits follicules. Sur les cellules granulosales des grands follicules, on ne détecte qu'une faible quantité de récepteurs à la GH (Fig.IV.2, p.53).

La grande abondance des récepteurs à la GH sur les hépatocytes nous semble normale. Ce qui est plus étonnant est d'observer un nombre si élevé de récepteurs à la LH sur les hépatocytes. Les nombres moyens de récepteurs à la FSH et à la LH sur les petits follicules se recouvrent avec les observations de Driancourt *et al.* (1991) qui postulent que la FSH maintient l'intégrité cellulaire de la granulosa, stimule le métabolisme cellulaire et induit les récepteurs à la LH au niveau des follicules préantraux. Les récepteurs de la LH sur les cellules granulosales aspirées de gros follicules sont moins nombreux que sur les cellules

granulosales des petits follicules. Ceci est normal car la LH est connue pour avoir un effet sur le début de la stéroïdogénèse, production de progestérone et d'androstènedione et cette synthèse a lieu dans les cellules thécales. Une autre hypothèse serait que l'obtention d'une suspension de cellules granulosales de petits follicules pure est plus difficile ; les tissus étant plus compacts, la suspension cellulaire contiendrait une proportion plus importante de cellules thécales.

Par contre, il est difficile d'expliquer le faible nombre de récepteurs à la FSH au niveau des gros follicules puisque ceux-ci sont responsables de la plus grande partie de la sécrétion d'oestradiol, dont la production est soumise à la stimulation FSH sur les cellules granulosales.

2. Les résultats obtenus par l'autoradiographie

- les récepteurs à la GH

En période de reproduction, le nombre de récepteurs à la GH dans les grands follicules est plus élevé qu'en anoestrus. D'autre part, des expériences antérieures faites au laboratoire montrent que le taux plasmatique de GH est plus élevé en milieu de saison qu'en anoestrus (Fig. IV.4, p. 54). La question est de savoir si une concentration plus élevée en GH entraîne nécessairement une augmentation du nombre de ses récepteurs. Il semblerait que la GH induit l'expression de son propre récepteur (Nilsson *et al.*, 1990). Mais la GHBP ou GH Binding Protein pourrait moduler cet effet et il se pourrait que l'effet ne soit pas le même pour tous les tissus.

Même si l'effet n'est pas significatif, on observe que le traitement à la GH *in vivo* augmenterait le nombre de récepteurs à la GH en anoestrus, à l'inverse de ce qui est observé en milieu de saison (Fig. IV.4, p.54). La GH augmente la quantité des transcrits de son récepteur dans les chondrocytes en culture (Nilsson *et al.*, 1990). Si la GH induit son propre récepteur, cette observation s'explique ; en effet, en milieu de saison le taux de GH est plus élevé qu'en anoestrus. Donc, comme la GH induit son propre récepteur, le nombre de récepteurs en milieu de saison est plus élevé qu'en anoestrus. Si on se trouve en anoestrus, le taux de GH est bas et par conséquent le nombre de récepteurs à la GH est bas également. Si par un traitement à la GH *in vivo* on augmente le taux de GH circulant, le nombre de

récepteurs à la GH va augmenter. De plus, les oestrogènes, sécrétés à un taux normal en milieu de saison, favorisent l'expression de la GH.

La prolactine et la GH favorisent l'expression des récepteurs aux gonadotropines (Hsueh, 1982) et la GH augmente la sensibilité des cellules ovariennes à une stimulation par des gonadotropines (Jia *et al.*, 1986). Nos expériences montrent que le nombre de récepteurs à la GH est toujours plus élevé dans les grands que dans les petits follicules (Fig.IV.6, p. 56). Or, les petits follicules sont surtout sensibles à la FSH. Si la GH induit des récepteurs à la FSH sur les petits follicules, par quel mécanisme le fait-elle ? Les récepteurs à la LH sont induits par la FSH et la GH. Les grands follicules montrent une croissance exponentielle lors des derniers stades d'évolution et la GH, favorisant le métabolisme cellulaire et l'activité mitotique, pourrait influencer la croissance folliculaire terminale. En effet, l'homme et le mouton montrent des taux de GH plus élevés en phase terminale de croissance folliculaire (Genazzi *et al.*, 1975). Comme le nombre de récepteurs à la GH est plus élevé dans les grands follicules et comme la GH induirait l'expression des récepteurs aux gonadotropines, elle pourrait induire les récepteurs à la LH au niveau de la thèque. De plus, les coupes d'autoradiographie sont surtout noires en périphérie du tissu, ce qui serait en faveur de cette hypothèse. Des études antérieures du laboratoire ont montré qu'il existe une localisation préférentielle des récepteurs à la FSH dans les cellules de la granulosa par rapport à la thèque, quelle que soit la taille du follicule (Boonen, 1994). Nos résultats ne permettent pas de confirmer cette observation.

Nous avons pu faire une observation intéressante pour le traitement à la GH *in vitro* des petits et grands follicules. En effet, l'expérience du traitement à la GH *in vivo* par rapport à un témoin montre que le nombre de récepteurs à la GH est toujours plus élevé dans les grands que dans les petits follicules. Lors du traitement à la GH *in vitro*, nous observons que le nombre de récepteurs à la GH est significativement plus élevé dans les petits que dans les grands follicules (Fig.IV.7, p. 57) ! Comment expliquer cette situation inversée ? Quand la GH est administrée *in vivo*, d'autres facteurs physiologiques, ni connus, ni maîtrisés, interviennent dans la régulation de l'expression des récepteurs. La GHBP pourrait intervenir pour expliquer ce phénomène ; elle se complexe avec la GH. Certains auteurs (Kelly *et al.*, 1994) suggèrent un rôle de 'réservoir' de cette protéine ; au moment des pics de GH, elle capterait la GH pour la relâcher au moment où la concentration en GH diminue. La GHBP complexerait la GH pour diminuer sa dégradation et sa clearance (Herington *et al.*, 1994). D'autres postulent qu'elle empêcherait la GH de se lier à son récepteur (Blumernfeld et Amit,

1994). Peut être joue-t-elle un rôle inconnu jusqu'à présent dans la régulation du nombre de récepteurs à la GH *in vivo*. En effet, quand on traite les follicules avec de la GH *in vitro*, la GHBP n'est pas présente et ne pourrait donc pas interférer avec les mécanismes de régulation d'expression au sein du follicule.

- les récepteurs à la LH

L'analyse statistique des expériences concernant la LH ne nous permet pas de tirer des conclusions significatives. Notons cependant la tendance selon laquelle le nombre de récepteurs à la LH serait plus élevé en milieu de saison qu'en anoestrus. En effet, le taux de GH plus élevé en milieu de saison induirait les récepteurs aux gonadotropines, dont les récepteurs à la LH. Par contre, il est difficile d'expliquer pourquoi le traitement à la GH *in vivo* diminuerait le nombre de récepteurs à la LH (Fig.IV.8, p.58). En effet, nous venons d'affirmer que la GH endogène induit les récepteurs aux gonadotropines. Pourquoi la GH exogène aurait-elle un effet tout à fait opposé ?

- les récepteurs à la FSH

Les résultats de notre dernière expérience sont assez difficiles à expliquer ; nous observons un nombre beaucoup plus élevé de récepteurs à la FSH en anoestrus qu'en milieu de saison (Fig.IV.10, p.60). Le traitement à la GH *in vivo* diminue le nombre de récepteurs à la FSH comme il l'a fait pour les récepteurs à la LH et à la GH en saison. Or, la GH est sensée d'augmenter le nombre de récepteurs aux gonadotropines. Les informations concernant les taux plasmatiques de la FSH pendant l'anoestrus sont divergentes. Certains rapportent des niveaux similaires (Haresign *et al.*, 1984) et des fluctuations (Bister et Paquay, 1983) identiques à ceux observés en phase lutéale, alors que d'autres notent des variations saisonnières (McNatty *et al.*, 1984). L'augmentation du nombre des récepteurs à la FSH en anoestrus est difficile à interpréter. Le traitement à la GH *in vitro* inverse la situation ; le nombre de récepteurs à la FSH est plus élevé en milieu de saison qu'en anoestrus (Fig.IV.11, p.61). Comme annoncé plus haut, la GHBP pourrait jouer des rôles régulateurs différents pour les récepteurs à la GH, à la LH et à la FSH. Comme elle n'a pas été étudiée en relation avec nos travaux, il est difficile de se prononcer sur ce problème.

Chapitre VI : Conclusions générales et perspectives

La technique du Ligand Binding en suspension cellulaire est une technique qui nécessite une mise au point précise pour pouvoir profiter de tous ses avantages : étude de différents types cellulaires, possibilité d'étudier des cellules mises en culture, étude de mécanismes intracellulaires (cascades de transmissions du signal, etc.). Afin de pouvoir tirer des conclusions fiables, quelques points de cette technique doivent être améliorés : l'isolement des cellules, la mesure de la liaison totale et spécifique, la température et le temps d'incubation.

L'autoradiographie permet de confirmer (bien qu'avec prudence car les analyses portent sur les 'liaisons totales') quelques observations faites auparavant par d'autres chercheurs.

- *le nombre de récepteurs à la GH est plus élevé en milieu de saison qu'en anoestrus.*

Cela semble plausible car le taux circulant de GH est plus élevé en milieu de saison qu'en anoestrus. Cette constatation suggère entre autres que la GH induirait l'expression de son propre récepteur. Mais cette hypothèse n'est pas confirmée de manière statistiquement significative lors d'un traitement GH *in vivo* en anoestrus et les résultats sont même inversés en saison.

- *la taille du follicule influence de façon hautement significative le nombre de récepteurs à la GH.* Cela signifie que le nombre de récepteurs à la GH est toujours plus élevé dans les grands que dans les petits follicules. La croissance du follicule à la fin de son évolution est exponentielle. La GH, favorisant le métabolisme cellulaire et l'activité mitotique pourrait ainsi favoriser la croissance du follicule jusqu'à l'ovulation.

- *le traitement des follicules à la GH in vitro inverse cependant cette situation et on observe un nombre de récepteurs à la GH plus élevé dans les petits que dans les grands follicules.* Pour expliquer ceci, nous nous référons à une autre protéine souvent citée en relation avec la GH : la *GH Binding Protein* (GHBP). Elle pourrait interférer avec les mécanismes d'expression du récepteur à la GH d'une façon non élucidée jusqu'à présent.

- *les récepteurs à la LH ont tendance à être plus nombreux en milieu de saison qu'en anoestrus.* Ce sont probablement les cellules de la thèque qui captent la LH émise en période de reproduction. Ceci paraît d'autant plus probable que la FSH induit les récepteurs à la LH

sur la thèse et que la GH, plus abondante en milieu de saison qu'en anoestrus, favorise l'expression des récepteurs aux gonadotropines.

• l'abondance des récepteurs à la FSH en anoestrus est très difficile à expliquer. En effet, les sécrétions de FSH sont identiques en saison et en contre-saison de même que la croissance folliculaire. La seule différence réside dans l'absence d'ovulation. D'autre part les traitements à la GH diminuent le nombre de récepteurs FSH, ce qui est peut-être en relation avec la diminution des taux plasmatiques de FSH induits par le traitement à la GH *in vivo*. Pourquoi observe-t-on donc cette abondance de récepteurs à la FSH en anoestrus ? Le traitement à la GH *in vivo* ou *in vitro* semble pourtant inverser la situation ; le nombre de récepteurs à la FSH en milieu de saison est plus élevé qu'en anoestrus, ce qui semble plus plausible.

La GH et son récepteur méritent certainement une étude plus approfondie. Lors de nos travaux beaucoup de questions se sont soulevées quant à la nature de la fixation de l'hormone à son récepteur, la distribution du récepteur au niveau de l'ovaire, les interactions paracrines au niveau de ce dernier. Quel rôle joue la GHBP ? Ne faudrait-il pas l'inclure dans les expériences de Ligand Binding ? Quel rôle joue-t-elle au niveau de l'expression des récepteurs ? Puisqu'il y a internalisation, que devient le complexe GH/GHBP dans le noyau ? Ces questions et d'autres seraient un sujet d'étude intéressant !

*Nous aimerions également comparer nos résultats avec d'autres techniques comme des hybridations *in situ* ou les techniques de PCR.*

Annexe

I. Isolement des noyaux cellulaires

Après incubation des hépatocytes avec l'hormone de croissance radioactive (1 million de cellules/100 μ l), les noyaux sont extraits par addition de 1ml de **tampon saccharose 0.25M**. Le tout est centrifugé à 4°C durant 150 secondes à 1700 rpm. Le surnageant est éliminé et 1 ml de tampon saccharose est rajouté au culot. La suspension est placée dans un petit **broyeur** prévu pour l'isolation des noyaux (Vel) et 4 à 5 mouvements avec le piston sont effectués afin de déchirer les cellules. La suspension obtenue est centrifugée à 1700 rpm à 4°C pendant 150 secondes pour éliminer le surnageant. La radioactivité du culot est ensuite mesurée. (De Duve *et al.*, 1955)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Altman P.L. Biology data book, 2nd edition, vol 2.
- Amit T., Hartmann K., Shoshany G., Baruch T., Youdin M.B.H., & Hochberg Z. (1993). The turnover of growth hormone (GH)-binding protein and Gh receptor in rabbit and rat. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 94, 149-154
- Bahr J., Gardner R., Schenk P. & Shahabi N. (1980). Follicular steroidogenesis : effects of reproductive condition. *Biology of reproduction*, 22, 817-826
- Barreca A., Minuto F., Volpe A., Cecchelli E., Cella F., Del Monte P., Artini P. and 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.
- Baumann G. Shaw M.A. (1990) A second lower affinity growth hormone binding protein in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 70 : 680-686
- Bingham B., Oldham E. R. and Baumbach W. R. (1994). Regulation of Growth Hormone Receptor and Binding Protein Expression in Domestic Species. *Society for Experimental Biology and Medicine*, 195-199.
- Bister J-L. (1989). Cours de Physiologie spéciale, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix Namur.
- Bister J-L. (1991). Cours de 1^{ère} licence en Biologie : Physiologie Animale. FUNDP, Namur.
- Bister J-L. and 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.
- Bister J.L., Perrad B., Noël B., Lagache F. & Paquay, (1994) Exogenous GH administrations stimulate the ovarian activity in ewes during the anoestrus. *Journal of Reproduction and Fertility* , 49, p.18-19
- Bister J.L. & Paquay R. (1983). Fluctuations in the levels of the Follicle-Stimulating-Hormone during anoestrus, gestation and lactation in the ewe : evidence for an endogenous rhythm of FSH release. *Theriogenology* 25, 53-70
- Bister J.L. (1991). Physiologie spéciale, tome 2 FUNDP Namur.
- Blumenfeld Z. and Amit T. (1994). The Role of Growth Hormone in Ovulation Induction. *Annals of Medicine* 26, 249-254.
- Boonen F. (1994) Mise en évidence de récepteurs hormonaux par autographie sur les follicules ovariens de brebis. Influence de la taille folliculaire et de traitements réalisés "in vitro" par des facteurs de croissance sur l'évolution de ces récepteurs. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de licencié en Sciences biologiques., FUNDP, Namur.
- Brameld J.M., Weller P.A., Saunders J.C., Buttery P.J. & Gilmour R.S. (1995). Hormonal control of insulin-like growth factor-I and Growth hormone receptor mRNA expression by porcine hepatocytes in culture. *Journal of Endocrinology* ,146, 239-245

- Carlsson B., Bergh C., Bentham J., Olsson J-H., Norman M.R., Billig H., Roos P. and Hillensjö T.** (1992). Expression of functional growth hormone receptors in human granulosa cells. *Human Reproduction* vol 7 n° 9, 1205-1209.
- Carlsson B., Nilsson A., Isaksson O.G.P. and Billig H.** (1993). Growth hormone-receptor messenger RNA in the rat ovary : regulation and localization. *Molecular and Cellular Endocrinology* 95, 59-66.
- Catt K.J. and Dufau M.L.** (1991). Gonadotropic hormones : biosynthesis, receptors and action. In : Yen S.S.C. and Jaffe R.B. (Eds) "Reproductive Endocrinology" W.B. Sanders Company, 105-155.
- Channing C. P. and Ledwitz-Rigby F.** (1975). Methods for Assessing Hormone-Mediated Differentiation of Ovarian Cells in Culture and Short-Term Incubations. *Methods in Enzymology* 39, 183. Academic Press.
- Christman G.M. and Halme J.K.** (1992). Growth hormone : revisited. *Fertility and Sterility* 1(57), 12-14.
- Darnell J., Lodish H. & Baltimore D.** (1993). Biologie moléculaire de la cellule. *Scientific American Books Inc.* Distr. W.H. Freeman. Edition De Bœck-Wesmæl. 2^e édition.
- Darnell, Lodish and Baltimore** (1988). La Cellule. *Biologie Moléculaire*. Edition Vigot.
- Davis S.R., Smith J.F. and Gluckman P.D.** (1990). Effects of growth hormone injections on ovulation rate in ewes. *Reprod. Fertil. Dev.* 2, 173-178.
- Davoren J.B., Kasson B.G., Li C.H. and Hsueh A.J.W.** (1986). Specific insulin-like growth factor (IGF) I- and II-binding sites on rat granulosa cells : relation to IGF action. *Endocrinology*, 119, 2155-2162
- De Duve C.** (1984). La cellule vivante. *De Boeck Université*.
- De Duve, C., Pressman, B.C., Giannetto, R., and Appelmans, F** (1955). Tissue fractionation studies.6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem.J.*, 60, 607-617
- Delvolder A., Renaville R., Sneyers M., Callebaut I., Massart S., Goffinet A., Burny A. & Portelle D.** (1993). Presence of growth hormone-binding protein in cattle plasma and milk. *Journal of Endocrinology*, 138, 91-98
- Demuyneck F.** (1990). Mise au point d'une technique de culture *in vitro* de folliculesovariens de brebis. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de licencié en Sciences Biologiques. FUNDP, Namur.
- Derivaux J. and Ectors F.** (1986). Reproduction chez les animaux domestiques. CABAY, Louvain-la-Neuve, 55-71 et 131-175.
- Devolder A., Renaville R., Sneyers M., Callebaut I., Massart S., Goffinet A., Burny A. and Portetelle D.** (1992). Presence of growth hormone-binding proteins in cattle plasma and milk. *Journal of Endocrinology* 138, 91-98.
- Di Zerega G.H. & Hodgen G.D.** (1981). Folliculogenesis in the primate ovarian cycle. *Endocr. Rev.* 2, 27-49
- Driancourt M.A., Fry R.C., Clarke I.J. and 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., 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., Goujeon A., Royère D. and Thibault C.** (1991). La fonction ovarienne. Dans Thibault C. & Levasseur M.C. (Eds) "La reproduction chez les mammifères et l'homme". INRA Ellipses. 273-298.
- Flamion B. et Mertens-Strijthagen J.** (1996) Pharmacologie générale
- Genazzi, A.R., Lemarchand-Beraud ; T., Aubert, M.L. and Felber, J.P.** (1975) *J. Clin.Endocrinol. Metab.* **14**, 3111-3115
- Gerhard B., Lowman H.B., Mercado M. & Wells J.A.** (1994). The Stoichiometry of Growth hormone-binding protein complexes in Humans plasma : comparaison with cell surface receptors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol 78, N°5.
- Gies J-P et Landry Y.** (1993) Pharmacologie moléculaire, chapitre 2 et 3, 2^{ième} édition
- Gong J.G., Bramley T.A. & Webb R.** (1991). 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. and 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., Wilmut Y. and 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.
- Gospodarowicz D. and Gospodarowicz F.,** (1972). *Endocrinology* **90**, 1427.
- Haresign W., McLeod G.J., Webster G.M. and Worthy k.** (1984). Endocrine basis of seasonal ancestrus in sheep (Eds.) Ellendorf & Elsaesser.
- Herington A.C.** (1993). Growth Hormone Receptor and Binding Protein : Distribution and Function. *Journal of Pediatric Endocrinology*, 235-240.
- Herington A.C., Ymer S.I., Stevenson J.L. and Roupas P.** (1994). Growth Hormone Receptor/Binding Protein : Physiology and Function. *Society for Experimental Biology and Medecine*, Vol 206, 238-242.
- Hillensjö T.** (1992). Expression of functional growth hormone receptors in human granulosa cells. *Human Reproduction* **vol.7 n°9**, 1205-1209.
- Hochberg Z., Bick T. and Amit T.** (1994). Stoichiometry of the Pulsating Growth Hormone (GH) Binding to the GH-Binding Protein and the Turnover GH-Receptor. *Society for Experimental Biology and Medecine*, 249-253.
- Hsueh, A.J.W.** (1982). Direct Effects of Gonadotropin Releasing Hormone on Testicular Leydig Cell Functions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **383** :249-69
- Ireland J.J. and Roche J.F.** (1987). Hypothesis regarding development dominant follicles during a bovine estrus cycle. In Follicular growth and ovulation rate in farm animals, 1-18 (Eds) J.F. Roche & D. O'Callagan. Martinus Nijhoff, The Hague.
- Jacques E.** (1989). Contrôle de la croissance terminel et de la maturation des follicules ovariens de la brebis. Thèse présenté en vue de l'obtention de grade de Docteur en Sciences, FUNDP, Namur.

- Jia, X-C., Kalmijn J., and Hsueh, A.J. (1986). Growth Hormone enhances follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, **118**, 1401 - 1438
- Juengel JL., Nett T.M., Tandeski T.R., Eckery D.C., Sawyer H.R. & Niswender G.D. (1994). Effects of the 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. & Kelley R.O. (1989). Basic histology. A Publishing Division of Prentice Hall. Edition Appleton & Lange. Sixth edition.
- Junqueira L.C., Carneiro J. & Long J.A. (1986). Basic Histology. 3rd edition. Piccin Nuova Libreria. S.p.A.. Italie.
- Karsh F.J. Dahl G.E., Evans N.P., Maning 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 feedbackaction estradiol. *Biol. Reprod.* **49**, 1377-1383
- Kelly P.A., Ali S., Rosakis M., Goujon I, 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
- Kelly P.A., Goujon L., Sotiropoulos A., Dinerstein H., Esposito N., Edery M., Finidori J. and Postel-Vinay M.C. (1994). The GH Receptor and Signal Transduction. *Horm. Res.* **42**, 133-139.
- 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
- Laburthe M., Breant B. & Rouyer-Fessard C. (1984). Molecular identification of receptor for vasoactive intestinal peptide in rat intestina epithelium by covalent cross-linking. Evidence for two classes of binding sites different structural and functional properties. *Eur. j. Biochem.*, **139**, 181-187
- Lagache F. (1994). Effets d'un traitement de GH administrée 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.
- Landefeld, T.D. and Suttie, J.M. (1989) *Endocrinologie* **125**, 1474-1478
- Le Cam A. & Legraverend C. (1993). Mode d'action de l'hormones de croissance. *Médecine/Sciences* **9**, 1352-61
- Leung DW, Spencer SA, Cachianes G et al. (1987) Growth hormone receptor and serum binding protein : purification, cloning and expression. *Nature*, **330** : 537-43.
- Lippe B.M. & Nakamoto J.M. (1993). Conventional and nonconventional uses of growth hormone. *Recent progress in hormone research.* **48**, 179-235
- Lobie P. E., Mertani H., Morel G., Morales-Bustos O., Norstedt G. and Waters M. J. (1994). Receptor-mediated Nuclear Translocation of Growth Hormone. *The Journal of Biological Chemistry* vol.49 n° 33, 21330-21339.
- Lucy M.C., Collier R.J., Kitchell, M.L., Dibner J.J., Hauser S.D. and Krivi G.G. (1993). Immunohistochemical and Nucleic Acid Analysis of Somatotropin Receptor Populations in the Bovine Ovary. *Biology of Reproduction* **48**, 1219-1227.

- Maes M., Maiter D., Massa G. and Ketelslegers J-M.** (1995). Récepteur et protéine de liaison de l'hormone de croissance : rôles dans la réceptivité cellulaire à l'hormone de croissance. *Annales d'Endocrinologie* **56**, 253-257.
- 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.
- Martin C. R.** (1985). *Endocrine Physiology*. Oxford University Press ISBN -0-19-503359-0.
- Mason H.D., Martikainen H., Beard R.W., Anyaoku V. and Franks S.** (1990). direct gonadotropic effect of growth hormone on oestradiol production by human granulosa cells *in vitro*.
- McGonigle et Perry B. Molinoff** (1989) Basic Neurochemistry, chapter 9, 4th edition
- McNatty K.P., Heath D.A., Henderson K.M., Lun S., Hurst P.R., Ellis L.M., Montgomery G.W., Morrison L. & Thurley D.C.** (1984). Some aspects of thecal and granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary. *J.Reprod.Fert.* **72**, 39.
- McNeilly a.s., Jonassen J.A. & Fraser H.M.** (1986). Suppression of follicular developpement after chronic LHRH administration in the ewe. *J.Reprod.Fert.* **76**, 481-490
- 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, caracterisation, and quantification of insulin-like growth factor-I-binding sites in the ewe ovary. *Endocrinology*, **125**, 2486-2493
- Mustafa A., Nyberg F., Bogdanovic N., Islam A., Roos P. & Adem A.** (1994). Somatogenic and lactogenic binding in rat brain and liver : quantitative autoradiographic localization. *Neuroscience Research* **20**, 257-263
- Nilsson, A., Carlsson, B., Matthews, L. and Isaksson, O.G.P.** (1990) Growth Hormone regulation of the growth hormon-receptor mRNA in cultured rat epiphyseal chondrocytes. *Mol.Cell. Endocrinol.* **70**, 237-246
- Noël B.**(1994). Contrôle et maîtrise de la stéroïdogenèse et de la croissance folliculaire terminale chez la brebis Suffolk. Thèse présentée en vue de l'obtention d'un grade de Docteur en Sciences. FUNDP Namur.
- Noël B., Bister J.L., Botspoel N. et Paquay R.** (1995) Effects of growth factors (IGF-1, EGF and TGF- β) on steroidogenesis of entire dominant follicles in an *in vitro* perfusion system.
- Paladini A.J., Pena C. and Poskus E.** (1983). Molecular biology of growth hormone. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* **1** (15), 25-56.
- Palmer E., Langlois P.,** (1978) Insémination artificielle dans l'espèce équine, CEROA, 4^o Journées d'Etudes, 48-69.
- Park L.I.S., Friend D., Gilis S., & Urdal D.L.** (1986). Characterization of the cell surface receptor for multi-lineage colony-stimulating factor (CSF-2 α). *The journal of Biological Chemistry*. Vol. 261, N^o1, 205-210.
- Perrad B., F. Lagache, B.Noël, J.L.Bister, R. Paquay** (1994). Modification of ovarian follicular populations by exogenous growth hormone in ewes at different periods of the year.

- Pirson S. (1993). Contrôle de qualité des cellules CHO utilisées pour la bio-production. Apport de l'électrophorèse en deux dimensions.
- Postel-Vinay M.C., Finidori J., Sotiropoulos A., Dinerstein H., Martini J-F. and Kelly P.A. (1995). Le récepteur de l'hormone de croissance. *Annales d'Endocrinologie* **56**, 209-212.
- Qewet B. (1994). Effets de la saison sur l'évolution du nombre de récepteurs à la LH et à la FSH sur les cellules de la granulosa chez la brebis Suffolk. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Licencié en Sciences Biologiques; FUNDP, Namur.
- Ronin C. (1988). 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.
- Scaramuzzi R.J. and Baird D.T. (1977). Pulsatile release of luteinizing hormone and secretion of ovarian steroids in sheep during anoestrus. *Endocrinology* **101**, 1801-1806
- Schrick F.N., Surface R.A., Pritchard J.Y., Dailey R.A., Townsend E.C. and Inskoo E.K. (1993). Ovarian structures during the estrus cycle and early pregnancy in ewes. *Biol. Reprod.* **49**, 1133-1140.
- Sharara Fady I., and Lynnette K. Nieman (1994). Identification and cellular localization of growth hormone receptor gene expression in the human ovary. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **vol.9** n°2, 670-672.
- Talamantes F. (1994). The Structure and Regulation of Expression of the Mouse Growth Hormone Receptor and Binding Protein. *Society for Experimental Biology and Medicine*, 254-256.
- Terqui M., Berthelot F. & Driancourt M.A. (1988). Morphological and fonctional features of ovine follicles in perfusion with pulsatile hormone delivery. *Reprod. Ntr. Dévelop.*, **28**, 1093-1104
- 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
- Waters M. J., Rowlinson S. W., Clarkson R. W., Chen C.-M., Lobie P. E., Norstedt G., Mertani H., Morel G., Brinkworth R., Wells C. A., Bastiras S., Robins A. R., Muscat G. E. and Barnard R. T. (1994). Signal Transduction by the Growth Hormone Receptor. *Society for Experimental Biology and Medicine*, 216-220.
- Weather, Burkitt and Daniels (1987). *Histologie Fonctionnelle 2nd edition*. Ed. Medsi / Mc Graw Hill.
- 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
- Whitehead S.A. (1990). A gonadotropin surge attenuating factor *J. Endocrinol.* **126**, 1-4
- 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