Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Effets de l'hormone de croissance sur les performances de reproduction in vivo et in vitro chez la brebis

Hulet, Raphaël

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.

Download date: 02. May. 2026

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX NAMUR

Faculté des Sciences

EFFETS DE L'HORMONE DE CROISSANCE SUR LES PERFORMANCES DE REPRODUCTION *IN VIVO* ET *IN VITRO* CHEZ LA BREBIS

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

HULET Raphaël

Aout 1997

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

EFFETS DE L'HORMONE DE CROISSANCE SUR LES PERFORMANCES DE REPRODUCTION *IN VIVO* ET *IN VITRO* CHEZ LA BREBIS.

HULET Raphaël

Résumé

Afin de déterminer l'influence de l'hormone de croissance (GH) sur l'activité ovarienne chez la brebis, deux expériences ont été effectuées. La première expérience est consacrée à la détermination des conséquences de l'administration de GH *in vivo* sur les performances de reproduction des brebis en début et milieu de saison de reproduction. La seconde expérience détermine les conséquences d'un apport *in vitro* de GH sur la maturation, la fécondation ovocytaire, ainsi que sur le clivage embryonnaire.

Quelle que soit la saison de reproduction, la GH influence la fertilité de manière positive lorsqu'elle est administrée *in vivo* durant le cycle précédant l'ovulation. Par contre, lorsqu'elle est administrée en début de gestation (réalisé en milieu de saison uniquement), elle diminue le taux de fertilité. En début et milieu de saison, le taux d'ovulation et la prolificité ne sont pas influencés par le traitement.

L'administration de GH *in vitro* a pour effet d'augmenter de façon significative les taux de maturations ovocytaires (maturation extra-ovocytaire et nucléaire). Ce même traitement influence favorablement (non significatif) les processus de fécondation ovocytaire et de clivage embryonnaire *in vitro*.

Mémoire de licence en Sciences biologiques
AOUT 1997
Promoteur: R Paquay
Co-promoteur: J.L. Bister

Remerciements

Au terme de ce travail au laboratoire de Physiologie, je désire adresser mes remerciements au Professeur R. Paquay pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je le remercie également pour ses conseils prodigués et son aide précieuse apportée au cours de ce travail.

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers J.L. Bister, qui a pris patience tout au long de cette année, et pour l'attention qu'il a porté a la réalisation de ce travail.

Mais je n'oublierai pas d'adresser mes plus vifs remerciements à Bernadette, qui tout au long de cette année m'a fait découvrir cette branche passionnante de la biologie, à savoir le domaine de la FIV. J'espère pour les autres étudiants qui me suivront qu'elle continuera à les encourager. Ses conseils et son soutient me furent bien nécessaire tout au long de cette année.

Que soient également remercié le personnel de Faulx-les-Tombes, ainsi que celui du laboratoire pour leur aide apportée, je ne l'oublierai pas.

Il ne m'aurait pas été possible non plus de terminer ce travail sans le soutient de ma famille et de celle de Mélanie (qui a su m'encourager tout au long de cette année)

BIBLIOGRAPHIE

CHAPITRE I: L'OVAIRE ET LES GAMETES FEMELLES 7

I.1. Introduction 7

I.2. Rappels anatomo-histologiques 7

I.3. Ovogenèse et folliculogénèse 7

I.3.1. Evolution morphologique 8

I.3.2. Evolution temporelle 9

I.3.3. Contrôle. 10

I.4. Maturation ovocytaire et formation de l'ovule fécondable 11

I.4.1. Croissance ovocytaire et maturation cytoplasmique 12

I.4.1.1. Accumulation des réserves cytoplasmiques 12

I.4.1.2. Evolution de l'organisation cellulaire 12

I.4.2 Maturation nucléaire ou reprise de la méïose 13

I.4.3. Maturation de la corona radiata 13

I. 4.4. Contrôle de la maturation ovocytaire 13

CHAPITRE II: LE TESTICULE ET LES GAMETES MALES 16

II.1. Introduction 16

II.2. Rappels anatomo-histologiques 16

II.3. Spermatogenèse. 17

II.4. Description de la cellule mature, le spermatozoïde 18

II.5. Régulation hormonale de la fonction testiculaire 19

II.5.1. Les hormones hypothalamo-hypophysaires 20

II.5.2. Les stéroïdes testiculaires 21

II.5.2.1. Les androgènes 21

II.5.2.2. Biosynthèse des oestrogènes 22

II.5.3. Les facteurs de croissance: IGF-1 22

II.5.3.1. Structure 22

II.5.3.2.Rôles 22

CHAPITRE III: LA FECONDATION 24

III.1. Introduction 24

III.2. Capacitation des spermatozoïdes 24

III.3. Pénétration du cumulus oophorus 26

III.4. Reconnaissance de la zone pellucide 26

III.5. Fixation du spermatozoïde 27

III.6. Réaction acrosomiale 28

III.7. Pénétration de la zone pellucide 29

III.8. Fusion des gamètes 29

III.9. Activation de l'ovocyte 30

III.9.1: Changements de potentiel transmembranaire et mobilisation du Ca^{++} intracellulaire 30

III.9.2. Augmentation du pH intracellulaire et synthèses dans l'œuf 31

III.9.3. Exocytose des granules corticaux 31

III.9.4. Achèvement de la seconde division méïotique de l'ovocyte 32

III.10. Formation, développement et migration des pronucléi 32

III.10.1. Décondensation du noyau des spermatozoïdes 32

III.10.2. Formation et développement des pronuclei 33

III.10.3. Migration des pronuclei au centre de l'oeuf 33

III.11. Etablissement du fuseau de première division 34

CHAPITRE VI: DEVELOPPEMENT PRECOCE DE L'EMBRYON 35

IV.1. Caractéristiques morphologiques du développement précoce de l'embryon 35

IV.2. Développement de l'œuf: aspects biochimiques et moléculaires 36

IV.2.1. Contribution des ARN_m maternels au début du développement 36

IV.2.2. Mise en route du génome embryonnaire 37

IV.2.3. Le métabolisme énergétique 37

IV.2.3.1. Les sucres 37

IV.2.3.2. Les lipides 38
IV.2.3.3. Les protéines 38
IV.2.4. Arrêt du développement embryonnaire in vitro 39
IV.2.5. Synthèse de composés spécifiques par l'embryon 40

CHAPITRE V: L'HORMONE DE CROISSANCE (GH) 42

V.1. Introduction 42

V.2. Localisation 42

V.3. Structure 42

V.4. Modes d'action 43
V.4.1. Récepteur 43
V.4.2. Complexe hormone-récepteur 44
V.4.3. Voies de signalisation 44
V.4.4. Régulation des récepteurs de la GH 45
V.4.5. Régulation de l'expression génique par la GH 45

V.5. Contrôle de la sécrétion 45

V.6. Protéines de liaison 47

V.7. Effets 48

OBJECTIFS ET METHODES

CHAPITRE I: OBJECTIFS POURSUIVIS 51

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES 52

II.1. Première expérience : effets de la rbgh administrée *in vivo* sur les performances de reproduction des brebis 52
II.1.1. Objectifs 52
II.1.2. Conditions expérimentales 52
II.1.3. Protocoles expérimentaux 53
II.1.4. Méthodes 54

II.1.4.1. Synchronisation des cycles 54
II.1.4.2. Traitement à la rbGH 54
II.1.4.3. Endoscopie 54
II.1.4.4. Echographie 55
II.1.4.5. Relevé des performances 55

II.2. Seconde expérience: effets de la gh administrée *in vitro* sur les processus de maturation, de fécondation et de clivage embryonnaire 56
II.2.1. Objectifs 56
II.2.2. Conditions expérimentales 56
II.2.3. Récolte des ovaires et de la semence 56
II.2.4. Plans expérimentaux 57
II.2.4.1. Premier essai 57
II.2.4.2. Deuxième essai 58
II.2.4.3. Troisième essai 58
II.2.5. Milieux utilisés 58
II.2.5.1. Milieux de récolte, de lavage et de maturation des ovocytes 58
II.2.5.2. Milieux de capacitation et de fécondation 59
II.2.5.3. Milieu de clivage embryonnaire 60
II.2.5.4. Percoll 61
II.2.6. Récolte du matériel animal 61
II.2.6.1. Ovocytes 61
II.2.6.2. Spermatozoïdes 61
II.2.6.3. Fluide folliculaire 62
II.2.6.4. Sérum de brebis en chaleur 62
II.2.7. Maturation in vitro des ovocytes (MIV) 62
II.2.8. Capacitation des spermatozoïdes. 63
II.2.9. Fécondation in vitro (FIV) 63
II.2.10. Culture embryonnaire 64
II.2.11. Techniques de coloration et observation des ovocytes et des oeufs fécondés 64
II.2.11.1. Observation en fluorescence (Hoechst 33342) 65
II.2.11.2. Coloration acide acétique/éthanol 65

RESULTATS

CHAPITRE I: EFFETS DE LA GH ADMINISTREE *IN VIVO* SUR LES PERFORMANCES DE REPRODUCTION OVINE 66

I.1. Rappel des objectifs 66

I.2. Resultats obtenus en debut de saison de reproduction (tableau 3.2) **66**

I.2.1. Endoscopies 66

I.2.2. Echographies 66

I.2.3. Parturitions 67

I.3. Resultats obtenus en milieu de saison de reproduction (tableau 3.2) **67**

I.3.1. Résultats des échographies 67

I.3.2. Résultats des parturitions 67

CHAPITRE II : EFFETS DE LA GH ADMINISTREE *IN VITRO* SUR LA MATURATION ET LA FECONDATION OVOCYTAIRE 69

II.1. Rappel des objectifs 69

II.2. ponction ovocytaire 69

II.3. Conditionnement des spermatozoides avant FIV 70

II.3.1. Technique de lavage et incubation des spermatozoïdes 70

II.3.1.1. Description de la technique 70

II.3.1.2. Résultats 71

II.3.2. Le Swim-Up 71

II.3.2.1. Description de la technique 71

II.3.2.2. Résultats 72

II.3.3. Le gradient de Percoll biphasique 72

II.3.3.1. Description de la technique 72

II.3.3.2. Résultats 72

II.4. Effets de la GH sur la maturation (MIV), la fecondation ovocytaire (FIV) et le clivage embryonnaire 73

II.4.1. Effets de la GH sur la maturation ovocytaire 73

II.4.1.1. Taux de maturations extra-ovocytaires (TME; tableau 3.4) 74

II.4.1.2. Résumé comparatif des résultats de TME 75

II.4.1.3. Taux de maturations nucléaires (TMN; tableau 3.5) 75

II.4.1.4. Résumé comparatif des TMN 76

II.4.1.5. Comparaison des TME et TMN 76

II.4.1.6. Conclusion 77
II.4.2. Effets de la GH sur la fécondation ovocytaire 77
II.4.2.1. Estimation des TF après coloration des ovocytes 77
II.4.2.3. Estimation des TF et de la qualité du clivage embryonnaire 78
A) Le taux de fécondation 78
B) La qualité du clivage embryonnaire 79
II.4.2.4. Conclusions 79

DISCUSSION

LISTE DES ABBREVIATIONS

ABP: Androgen Binding Protein;

BP: Binding Protein;

C.I.S.O.: Centre d'Insémination et de Sélection Ovine;

COC: Complexe Ovocyte - Cumulus;

C.R.O.: Centre de Recherches Ovines;

DAG: Diacylglycerol;

DM-H: Defined Medium tamponné avec de l'HEPES;

E_2: Oestradiol 17-β;

EGF: Epidermal Growth Factor;

FF: Fluide Folliculaire;

FIV: Fécondation *in vitro*;

FSH: Follicle Stimulating Hormone

GH: Growth Hormone;

GnRH: Gonadotropin Releasing Hormone;

GRH: Growth Hormone Releasing Hormone;

Groupe T^+: Groupe témoin positif;

Groupe T^-: Groupe témoin négatif;

IGF: Insulin-like Growth Factor;

INH: Inhibine;

LH: Luteinizing Hormone;

MII: Métaphase II;

MIV: Maturation *in vitro*;

MPF: Maturation Promoting Factor;

MTOC: Microtubule Organizing Center;

OMI: Oocyte Maturation Inhibitor;

$P\text{-}450_{ssc}$: Cytochrome P_{450} spécifique;

P_4: Progestérone;

PDGF: Platelet Derived Growth Factor;

PL: Placental Lactogen;

PLC: Phospholipase C;

PN: Pronucléi;

rbGH: Recombinant Bovine Growth Hormone;

SBC: Sérum de Brebis en Chaleur;
SOF: Synthetic Oviduct Fluid;
spz: Spermatozoïde;
SS: Somatostatine;
TF: Taux de Fécondation;
TGF: Transforming Growth Factor
TM: Taux de Maturation;
TME: Taux de Maturation Extra-ovocytaire;
TMN: Taux de Maturation Nucléaire;
TO: Taux d'Ovulation.
ZP: Zone Pellucide;

PREMIERE PARTIE:

INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIQUE

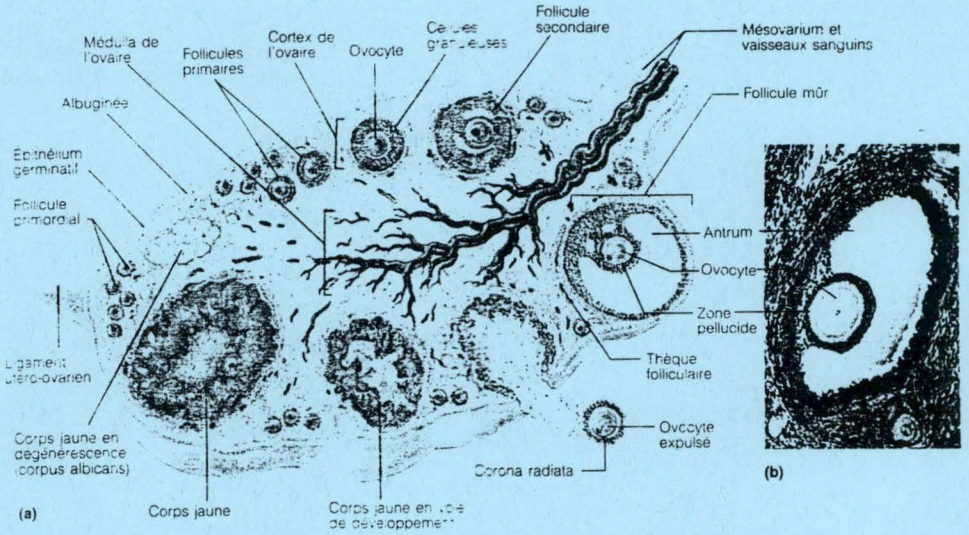


Figure 1.1: (a) Structure d'un ovaire; (b) Photomicrographie d'un follicule mûr (*250).

CHAPITRE I: L'OVAIRE ET LES GAMETES FEMELLES

I.1. INTRODUCTION

L'ovaire est un organe dont la fonction est double : il assure la production, le stockage et l'émission des gamètes femelles et sécrète de nombreuses hormones peptidiques, protéiques et stéroidiennes (Driancourt *et al.*, 1991). L'ovaire est donc le lieu de stockage des ovocytes formés lors de la vie embryonnaire. En son sein se déroule la croissance des follicules dont seul quelques-uns arriveront à l'ovulation, libérant ainsi un ou plusieurs ovocytes avant de se transformer en corps jaune.

L'ovaire participe, par ses sécrétions hormonales, au contrôle du développement et de l'activité utérine et à sa propre régulation via l'hypothalamus, l'hypophyse et l'utérus.

I.2. RAPPELS ANATOMO-HISTOLOGIQUES

L'ovaire est un organe de forme ovoïde ou en forme de haricot. Sa dimension varie, chez la brebis, de 1 à 3 centimètres pour un poids allant de 3 à 15 grammes.

Schématiquement, cet organe est composé d'une région médullaire et d'une région corticale. La médulla est constituée d'une zone parenchymateuse faite de tissu conjonctif et d'une zone hilaire fibreuse où pénètrent l'innervation et la vascularisation sanguine et lymphatique (figure 1.1).

Le cortex est le siège de l'activité folliculaire et éventuellement lutéale.Il comporte, outre les structures de soutien et de remplissage, des follicules à différents stades de développement, plus de cent mille à la naissance, et parfois un ou plusieurs corps jaunes.

Il est également possible d'y trouver des fibres musculaires lisses, principalement dans les zones périfolliculaire, innervées par un système nerveux cholinergique.

La "tunica albuginea" enveloppe l'ovaire; elle est constituée d'un tissu conjonctif recouvert d'un épithélium superficiel.

I.3. OVOGENESE ET FOLLICULOGENESE (Driancourt *et al.*, 1991; Leclercq, 1994)

Chez les mammifères femelles, la gamétogénèse se passe, après la naissance, uniquement au sein de l'ovaire. Celle-ci comporte deux phases: l'ovogénèse durant laquelle se constitue le stock de cellules germinales et donc de follicules primordiaux et la folliculogénèse qui est la succession des différentes étapes du développement du follicule depuis le moment où

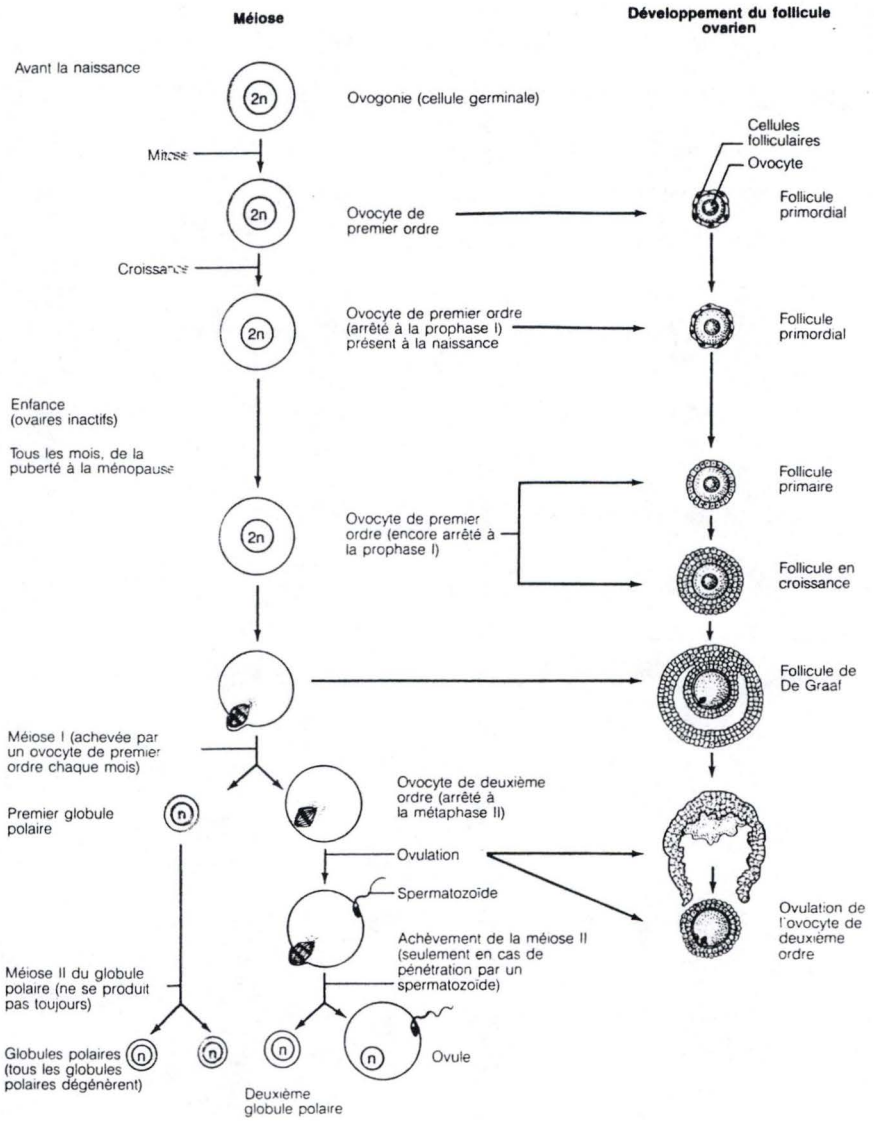


Figure 28.16 Ovogenèse. À gauche, schéma de la méiose. À droite, corrélation avec le développement du follicule et ovulation.

Figure 1.2: Ovogenèse; *à gauche*: schéma de la méïose; *à droite:* correlation avec le développement du follicule et ovulation.

il sort de sa réserve constituée durant l'ovogénèse, jusqu'à son involution ou sa rupture au moment de l'ovulation.

I.3.1. Evolution morphologique

Au cours de leur évolution, les follicules se classent généralement sous 5 types: les primordiaux, primaires, secondaires, tertiaires et antraux (figure 1.2). Ces étapes du développement d'un follicule sont basées principalement sur l'évolution des cellules de la granulosa, mais l'ovocyte et le stroma entourant les follicules connaissent également des changements progressifs.

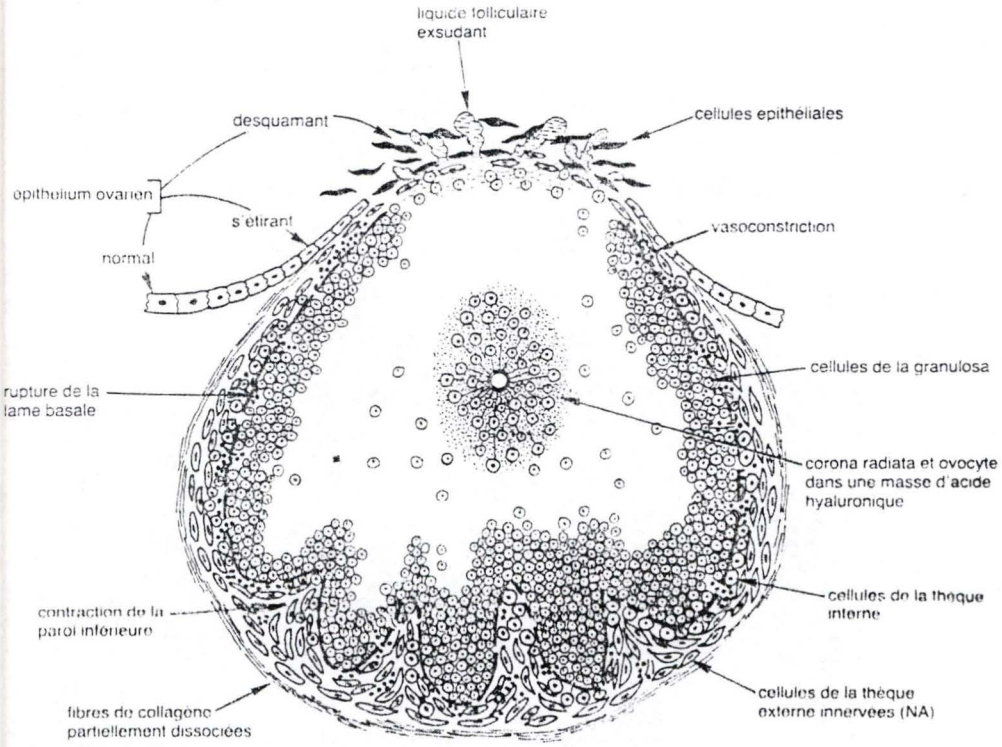
Les **follicules primordiaux,** d'un diamètre d'environ 30 µm, contiennent un ovocyte primaire dépourvu de zone pellucide et entouré par une seule assise de cellules prégranulosales aplaties. Ce complexe ovocyte-cellules granulosales est isolé du stroma ovarien par une lame basale. Les follicules primordiaux se situent principalement dans la région externe du cortex ovarien.

Les **follicules primaires** constituent le premier stade de developpement du follicule. Ils présentent une à quelques couches de cellules granulosales cubiques ou cylindriques autour de leur ovocyte. L'ovocyte augmente nettement de volume et atteint 80 à 90 µm de diamètre. Les ovocytes et cellules folliculaires synthétisent et sécrètent des glycoprotéines formant la zone pellucide entourant l'ovocyte et le séparant des cellules granulosales. La membrane de Slaviansky, ou membrane basale, sépare l'ovocyte du stroma environnant. C'est à ce stade que s'établissent les communications entre les cellules prégranulosales et entre ces cellules et l'ovocyte.

Les **follicules secondaires** se caractérisent par la prolifération des cellules granulosaires en un épithélium pluristratifié. Les cellules, régulières, présentent un pronoyau irrégulier avec un nucléole volumineux; leur cytoplasme contient de grandes quantités de mitochondries et de ribosomes libres; le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi sont bien développés. La zone pellucide est traversée par de longs prolongements cellulaires qui unissent l'ovocyte à la granulosa.

Les follicules tertiaires ou (ou pré-antraux) correspondent à la phase finale de la croissance ovocytaire. L'ovocyte atteignant une taille moyenne de 130 µm de diamètre. On voit apparaître une aggrégation concentrique des cellules du stroma entourant la lame basale. Elles vont former la thèque folliculaire qui va se différentier pour former la thèque interne et la thèque externe.

Les **follicules antraux** se distinguent par l'apparition d'espaces irréguliers remplis de liquide clair, le liquide folliculaire sécrété par les cellules granulosales. Ces cellules forment autour de l'ovocyte un épaississement faisant saillie dans la cavité centrale: le cumulus oophorus. L'ovocyte a ici atteint une taille définitive de 125 à 150 µm, et sa croissance se



Le schéma montre les changements morphologiques et histologiques qui se sont produits et qui permettent la rupture du follicule et l'expulsion de l'ovocyte.

Figure 1.3: Etat d'un follicule peu avant l'ovulation.

ralentit fortement. Ces follicules forment le stock d'où émergeront les follicules ovulatoires, les autres étant voués à l'atrésie. Le **follicule préovulatoire** ou follicule de De Graaf est le stade ultime de la croissance folliculaire (figure 1.3).

L'antrum bien développé est rempli de liquide folliculaire, de composition similaire à celle du plasma, et sécrété par les cellules folliculaires différentiées.

L'atrésie folliculaire est un phénomène d'involution vouant les follicules à la disparition avant l'ovulation. Le follicule dégénère suite à l'arrêt des mitoses des cellules granulosales et à la destruction de l'ovocyte (Fortune, 1994). L'ovocyte et les cellules granulosales meurent et sont remplacés par du tissu fibreux. Les cellules thèquale externes à la membrane basale, se dédifférencient et iront rejoindre le pool de cellules constituant le stroma (Yen et Jaffe, 1991).

Cette atrésie est le devenir de plus de 99% des follicules et s'observe pour tous les stades de développement folliculaire.

I.3.2. Evolution temporelle

Chez la brebis, le stock de follicules primordiaux se constitue durant la vie embryonnaire. Les précurseurs ovocytaires (ovogonies) proviennent de l'endoblaste de la vésicule ombilicale. Après une phase de migration et de multiplication au sein de l'ébauche gonadique (entre le trentième et nonentième jour de gestation), ces cellules entament leurs processus de division méiotique qui restera bloquée au stade diplotène de la prophase I. Les ovocytes induisent alors la différentiation de cellules somatiques environnantes en une couche de cellules granulosales cuboïdales ou aplaties et forment la réserve de follicules primordiaux. Ce stock de follicules commence à diminuer dès la vie fœtale; une grande partie d'entre eux dégénère, tandis que d'autres démarrent leur croissance.

Dès le centième jour de la vie fœtale, un certain nombre de follicules primordiaux peuvent sortir de leur réserve et entamer un développement. A l'âge adulte, le développement complet dure chez la brebis plus ou moins 6 mois, mais la grande majorité des follicules connaît un arrêt de développement et s'atrésie. Seuls, à chaque cycle de reproduction, un ou quelques follicules poursuivront leur croissance sans interruption jusqu'à l'ovulation.

Le développement folliculaire, se déroule en trois phases bien distinctes tant du point de vue fonctionnel que du point de vue de leur contrôle: la croissance basale, le développement terminal puis la maturation et l'ovulation.

Le développement basal, qui dure 5 à 6 mois, permet le passage des follicules du stade primaire au stade antral jusqu'à un diamètre de 1 à 2 mm.

Ayant atteint ce stade, le follicule acquiert une dépendance stricte vis-à-vis des hormones gonadotropes et sa croissance s'accélère brutalement. Il peut atteindre un stade préovulatoire et un diamètre de 6 à 10 mm en 4 à 6 jours.

Deux processus distincts dirigent la croissance folliculaire terminale : le recrutement et la sélection.

Le recrutement est le choix d'un ou plusieurs follicules antraux qui vont à un moment donné entamer le processus de croissance terminale. Seuls quelques-uns des follicules recrutés atteindront la taille préovulatoire; les autres subiront l'atrésie. C'est le phénomène de sélection, qui implique le tri final des follicules préovulatoires. Ni la sélection, ni le recrutement ne garantissent l'ovulation.

Suite à la sélection, un ou quelques follicules vont entamer un processus de maturation. Ils sont alors appelés "follicules dominants"; ils ont un diamètre d'au moins 4mm et leurs chances d'évoluer vers l'atrésie diminue fortement (Fortune,1994). Le follicule alors mené à l'ovulation est appelé "follicule ovulatoire": il est caractérisé par une reprise de la méiose de l'ovocyte. Celui-ci se différencie en ovule. Le complexe ovocyte-cumulus (COC) se détache de la granulosa, s'entoure de mucus et flotte dans le liquide folliculaire. Au moment de l'ovulation, le liquide folliculaire se répand dans la cavité péritonéale et l'ovule est capté par le pavillon de l'oviducte. Le follicule rompu se transforme ensuite en une glande endocrine appelée "corps jaune", qui secrète principalement de la P_4 (progestérone).

Chez la brebis, il a été clairement démontré que le cycle ovulatoire comporte trois périodes successives de croissances folliculaires terminales. Des vagues de 6 jours environ conduisent chaque fois quelques follicules jusqu'au stade dominant; cependant les deux premières se déroulent en phase lutéale du cycle, ce qui empêche la décharge préovulatoire des hormones hypophysaires et ne permet pas à ces follicules dominants d'atteindre l'ovulation. Seule la troisième vague voit un ou quelques follicules arriver à maturation et ovuler.

I.3.3. Contrôle.

Les facteurs initiateurs de la folliculogénèse basale sont à l'heure actuelle encore très mal connus. Selon l'opinion actuellement la plus répandue les gonadotropines ne seraient pas impliquées dans le contrôle du développement basal des follicules (Driancourt *et al.*, 1987, Fry *et al.*,1987; Cognié 1988). Cependant, selon des études récentes, (Driancourt *et al.*, 1991), l'indépendance stricte de la folliculogénèse basale envers l'axe hypotalamo-hypophysaire ne serait pas encore démontrée. En effet, Scaramuzzi *et al.* (1993) ont montré que les follicules préantraux possèdent des récepteurs à la LH sur les cellules de la thèque et des récepteurs à la FSH sur les cellules de la granulosa. Si les gonadotropines ne sont que peu ou pas impliquées dans la croissance de ces follicules préantraux, il est supposé que la régulation du développement folliculaire basal est principalement paracrine.

D'une part, des interactions entre les différents tissus, notamment entre les différents follicules, pourraient conduire à des inhibitions réciproques plus ou mois importantes, comme cela est montré au niveau des follicules antraux. D'autre part, il est probable que les niveaux d'hormones plasmatiques autres que la LH ou FSH influencent les sécrétions paracrines.

Il a en effet été montré que la GH pouvait augmenter le nombre de follicules de 1 mm de diamètre à la surface de l'ovaire, ce qui ne peut s'expliquer que par une stimulation du développement folliculaire basal (Perrad *et al.*, 1996).

Le contrôle de la croissance folliculaire terminale est soumis principalement aux rétroactions entre les sécrétions ovariennes et les sécrétions hypophysaires. La régulation fine au sein de l'ovaire est assurée par les facteurs de croissance.

Comme son nom l'indique, la FSH stimule la croissance folliculaire. Ses augmentations de concentration plasmatique coïncident avec les vagues de recrutement des follicules, que ce soit lors du cycle, ou dans d'autres états physiologiques (Jacques et al., 1994).

La rétroaction de l'ovaire sur la sécrétion de FSH se fait en circuit long par les sécrétions folliculaires d'E_2 et d'inhibine (INH) via l'hypothalamus et en circuit plus court par l'inhibition qui freine les sécrétions hypophysaires des hormones gonadotropes, surtout de la FSH, par une action directe au niveau de l'hypophyse due principalement aux peptidesovariens, notamment l'INH.

La LH possède également une action stimulatrice sur la croissance folliculaire. Elle stimule la synthèse des précurseurs de l'oestradiol au sein du follicule, principalement par son action au niveau des cellules de la thèque interne.

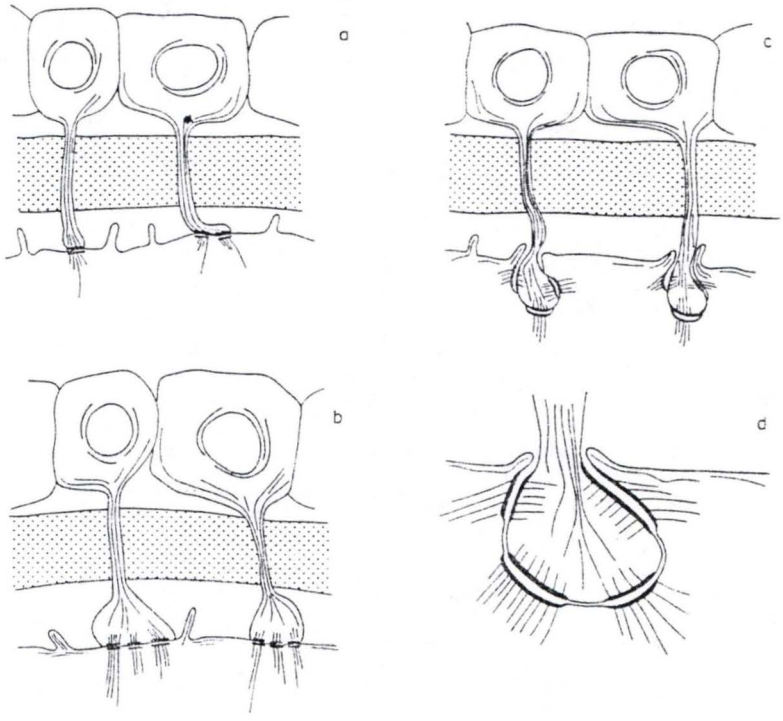
La GH joue un rôle important sur l'activité ovarienne. Les expériences réalisées précédemment au niveau du laboratoire de Physiologie Animale ont montré que la teneur plasmatique de GH augmente en période préovulatoire. D'autres part, des injections de GH *in vivo* au cours du cycle augmentent le taux d'ovulation en modifiant les paramètres de la croissance folliculaire (Perrad *et al.*, 1996).

Les essais sur la réactivité *in vitro* des follicules isolés et périfusés montrent que les follicules disséqués des ovaires de brebis préalablement traitées à la GH *in vivo* possèdent une capacité accrue de sécrétion d'oestradiol pour un même stimulus LH/FSH. Mais les follicules isolés prétraités *in vivo* avec de la GH ne présentent pas cet accroissement de potentiel sécrétoire. La GH agit donc à long terme, ou plus probablement par l'intermédiaire d'autres sécrétions. Les stimulations *in vitro* du follicule avec de l'IGF-I reproduisent les augmentations du potentiel stéroïdogénique observé avec la GH *in vivo* et étaient cette théorie.

I.4. MATURATION OVOCYTAIRE ET FORMATION DE L'OVULE FECONDABLE

(Szoltoz, 1991)

La maturation de l'ovocyte est l'ensemble des changements subits par celui-ci, lui permettant d'acquérir l'aptitude à être reconnu et pénétré par un spermatozoïde, d'assurer la



a : souris ; b : lapine ; c : brebis ; d : détail de c.

Figure 1.4: Trois types de jonctions entre les pieds des cellules de la corona et la membrane plasmique de l'ovocyte.

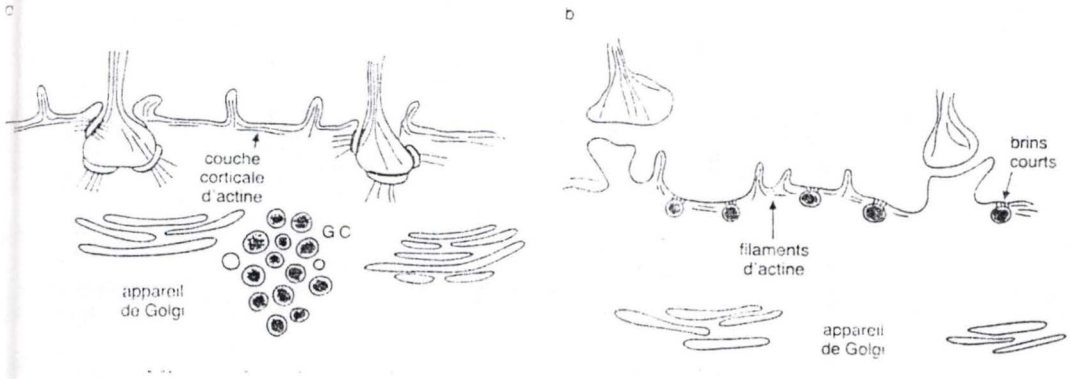


Figure 1.5: Mise en place des granules corticaux avant (a) et après la reprise de la méïose.

formation des pronucléi mâles et femelles et de permettre le développement normal de l'embryon (Plachot, 1988).

La maturation ovocytaire comporte deux étapes : la première est la croissance de l'ovocyte et la seconde est la maturation méïotique.

Cette maturation va de paire avec celle des cellules du cumulus oophorus : on parle généralement de maturation du COC, qui mène au stade ovule fécondable.

I.4.1. Croissance ovocytaire et maturation cytoplasmique

I.4.1.1. Accumulation des réserves cytoplasmiques

Au début de sa croissance, l'ovocyte est de petite taille et incapable de poursuivre le processus méïotique. Le volume de l'ovocyte augmente lors de sa croissance, sans pour cela qu'il y ait accumulation de macromolécules provenant de sources extérieures.

Pendant la croissance, la plupart des ARN sont synthétisés sous forme polyadénylée, et sont stockés pour être utilisés ultérieurement. On parle des transcrits maternels.

Quand la fin de la croissance approche, la synthèse d'ARN tend à devenir nulle, et les formes polyadénylées sont réduites de 60%. La plupart des messagés stockés sont dégradés à partir de la fécondation et il n'y a plus d'expression de ces messages maternels dès le stade de 2 cellules.

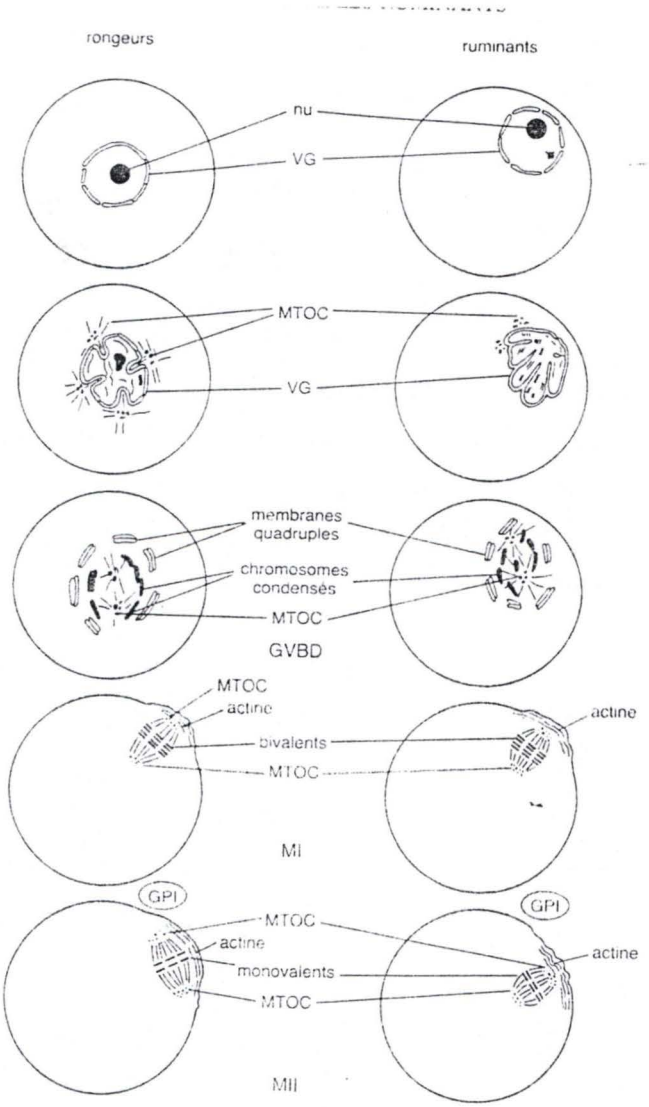
L'évolution des autres ARN est identique, c'est-à-dire intense en début de croissance ovocytaire, et faible lorsque l'ovocyte a atteint sa taille définitive. On peut aisément se rendre compte de cette activité en observant le nucléole. Celui-ci est composé d'un réseau fibrillo-granulaire contenant quelques granules péribosomaux lorsque la synthèse d'ARN est importante. Dès que son activité diminue, il y a formation de zones denses composées de fins filaments étroitement empaquetés et apparition d'une masse dense et unique en son sein.

I.4.1.2. Evolution de l'organisation cellulaire

Le cytoplasme de l'ovocyte ovin est caractérisé, avant la décharge de LH par un grand nombre de vésicules membranaires distribuées de manière régulière, ainsi que par des amas mitochondriaux et des granules corticaux.

Après la décharge de LH, l'espace périvitellin est élargi suite aux contractions du cytoplasme de l'ovocyte. Durant cette augmentation de taille de l'espace périvitellin, une proportion de jonctions entre les projections des cellules du cumulus et de l'ovocyte est brisée, la rupture totale de ces jonctions intervenant 9 à 12 heures après le pic de LH (figure 1.4).

Les mitochondries se réorganisent et passent d'une localisation périphérique à une localisation plus uniforme. Les vésicules qui étaient distribuées de façon uniforme au sein de l'ovocyte passent en position centrale. Les modifications de la localisation des mitochondries indiquent , que lors des phases initiales de la maturation le métabolisme de l'ovocyte est concentré dans la zone corticale (jonctions). La modification de la distribution des



VG : vésicule germinative ; GVBD : rupture de la VG ; nu : nucléole ; MTOC : centre organisateur des microtubules ; M I : métaphase de première division méiotique ; M II métaphase de seconde division ; GP1 : premier globule polaire.

Figure 1.6: Changements nucléaires et formation de la première division méiotique chez les rongeurs et les ruminants.

mitochondries après la rupture des contacts entre les cellules du cumulus et l'ovocyte indique une modification spatiale du métabolisme de l'ovocyte.

Les granules corticaux subissent également une évolution spatiale (figure 1.5). Formés dans le golgi et intimement associés au réticulum endosplasmique lisse, ils se dispersent pour former une ligne le long du cytoplasme. Ces granules jouent un rôle dans la prévention de la polyspermie en libérant leur contenu dans l'espace périvitellin dès que le spermatozoïde a pénétré l'ovocyte, entraînant un durcissement de la pellucide qui devient alors imperméable aux spermatozoïdes.

I.4.2 Maturation nucléaire ou reprise de la méïose

Lorsque la reprise de la méïose devient possible, l'ovocyte est dit "compétent". On peut induire la compétence expérimentalement plus ou moins longtemps avant que l'ovocyte ait atteint sa taille ovulatoire, mais chez la brebis les ovocytes provenant de petits follicules antraux ne sont compétents que s'ils ont atteints 80% de leur taille de fin de croissance.

La reprise de la méïose nécessite croissance du cytoplasme, synthèse des messagers et disparition des centrioles. Ces derniers disparaissent au profit du matériel péricentriolaire qui forme une masse filamenteuse appelée "microtubule organizing center" possédant rôle particulier dans la formation des fuseaux méiotiques (figure 1.6). On pense que ces centrioles disparaissent pour permettre à l'ovocyte de se maintenir en métaphase II.

I.4.3. Maturation de la corona radiata

La majorité des cellules du cumulus qui sont fixées sur la lame basale, s'en détachent sous l'action de la collagénase, perdent leur arrangement en colonne et cessent de se diviser. Les jonctions perméables qui les unissaient disparaissent, mais leur dissociation n'est pas complète probablement par suite de la production locale d'inhibiteurs de la collagénase. Les cellules du cumulus plus extérieures subissent les mêmes transformations mais, comme elles sécrètent abondamment de l'acide hyaluronique, leur dissociation est, au contraire, totale. L'ensemble des cellules du cumulus ainsi fortement expensé, reliées entre elles par un réseau lâche de collagène et d'acide hyaluronique forme la corona radiata.

I. 4.4. Contrôle de la maturation ovocytaire

L'inhibition de la méïose qui bloquait l'ovocyte en prophase I jusqu'à la décharge gonadotrope ovulante et le fait que les ovocytes compétents reprennent leur méïose quand ils sont cultivés hors de leur follicule ont amené à penser qu'il existait des facteurs inhibiteurs empêchant la reprise de la méiose, synthétisés par un ou plusieurs tissus folliculaires. On les a appelés OMI (oocyte maturation inhibitors). Quelques-uns ont été isolés à ce jour.

Des expériences montrent que les molécules identifiées actuellement seraient impliquées dans ce contrôle mais ne semblent pas directement liées à la décharge préovulatoire de LH et FSH. En effet, leur concentration ne diminue pas dans le liquide folliculaire après la décharge ovulante, mais diminue progressivement au cours de la croissance terminale du follicule et brusquement avant la décharge ovulante. On pense donc que ces OMI empêchent la reprise de la méïose par inhibition de la phoshodiesthérase et maintiennent ainsi un niveau suffisant d'AMPc dans l'ovocyte.

Le niveau d'AMPc de l'ovocyte joue en effet un rôle prépondérant. Il a été possible de le démontrer de façon expérimentale par l'utilisation de produits augmentant le niveau d'AMPc dans l'ovocyte (Forskoline, isobutylméthyl-xanthine) qui maintiennent l'inhibition. Inversément, l'injection de la protéine kinase dans l'ovocyte permet la reprise de la méiose. Ces expériences confirment donc que la réduction du niveau d'AMPc, et de l'activité de la protéine kinase associée, est la condition pour que la méiose puisse reprendre.

L'AMPc et les OMI proviennent majoritairement des cellules périfolliculaires, passent d'une cellule à l'autre pour se concentrer au niveau du COC puis de l'ovocyte.

In vivo, quand l'ovocyte est compétent, la décharge gonadotrope induit les changements morphologiques et métaboliques du follicule dominant.

La rupture des jonctions perméables entre la granulosa et le cumulus précède la reprise de la méiose (identifiée par la rupture de l'enveloppe nucléaire ->GVBD). Mais il faut aussi signaler que toutes les jonctions perméables ne sont pas détruites puisqu'il est encore possible d'observer le passage de molécules de taille inférieure à 1 kD...

Si le complexe ovocyte-cumulus est incubé en présence de gonadotropines, d'oestradiol et de sérum, il est possible d'observer la disparition "naturelle" de ces jonctions.

Ces jonctions peuvent aussi être détruites *in vitro* par l'addition de cytochalasine D et on observe alors que le pourcentage d'ovocytes reprenant leur méiose passe de 40 à 90%. La cytochalasine agit sur les composants mineurs du cytosquelette (actine, talline...), mais n'entraîne pas la libération d'acide hyaluronique entre les cellules du cumulus, ni la dispersion de ces mêmes cellules.

Ces expériences démontrent que la rupture des jonctions entre cumulus, corona et ovocyte facilite la reprise de la méiose et permet le déroulement complet *in vitro* de la maturation des ovocytes provenant des follicules pré-ovulatoires.

Ces changements morphologiques expliquent probablement la disparition de l'effet inhibiteur de la granulosa (OMI) et la réduction de concentration intraovulaire de l'AMPc

L'évolution de la concentration de l'AMPc au cours de la maturation du COC permet de penser que le contrôle intra ovocytaire de la méïose se fait grâce à un blocage dû à une (ou plusieurs) protéine(s) dont la synthèse est contrôlée par des enzymes R-C (AMPc dépendants).

Le fait que différentes bases puriques (adénine, guanine, hypoxanthine et adénosine) jouent un rôle inhibiteur renforce cette idée; ces bases seraient nécessaires aux cellules de la corona radiata pour la synthèse de substances qui sont ensuite transmises dans l'ovocyte.

Inversément, il a été montré que la FSH et l'IGF sont capables de stimuler la reprise de la méiose; leur action passe par les cellules périovocytaires obligatoirement et a comme effet la synthèse d'un ou plusieurs MPF (maturation promoting factors). Un de ces MPF a été identifié et on a montré qu'il apparaît parfois déjà assez tôt avant la reprise de la méïose et augmente progressivement.

La maturation nucléaire est donc le résultat d'une balance entre un système inhibiteur et un système stimulateur.

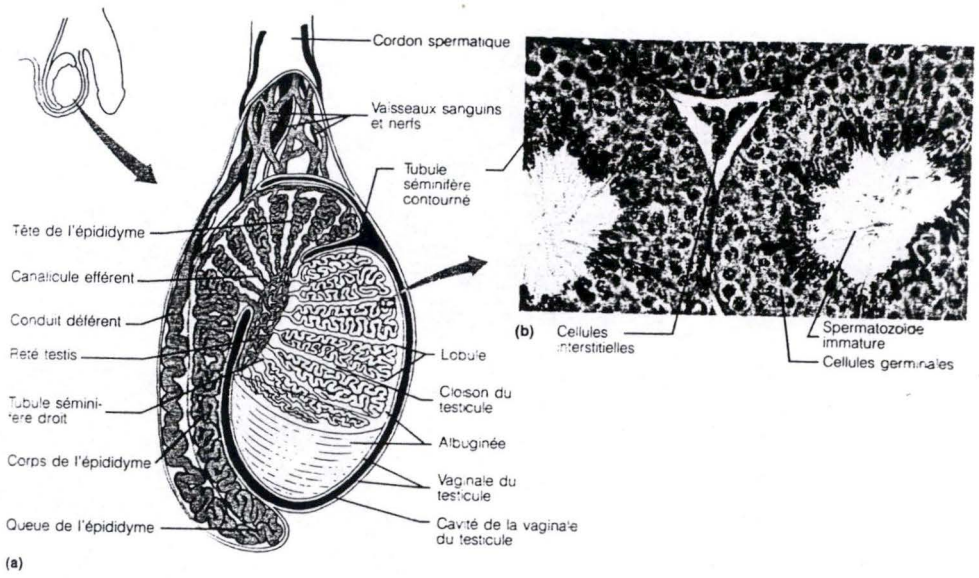


Figure 1.7: Structure interne du testicule. (a) Coupe sagitale du testicule et de l'épididyme. (b) Coupe transversale de portions de tubes séminifères contournés montrant les cellules germinales qui composent l'épithélium de la paroi des tubules et illustrant la localisation des cellules interstitielles dans le tissu conjonctif lâche situé entre ces tubules.

CHAPITRE II: LE TESTICULE ET LES GAMETES MALES

II.1. INTRODUCTION

Le testicule est un organe à double rôle; sa première fonction est de réaliser la gamétogenèse, la seconde d'assurer la sécrétion d'hormones. La gamétogenèse, plus particulièrement ici la spermatogénèse, est assimilable à une fonction exocrine et est due aux les tubes séminifères qui dès la puberté sont engagés dans le processus de production des spermatozoïdes.

Les cellules de Leydig, assurant une part importante de la fonction endocrine du testicule, sont regroupées dans le compartiment intertubulaire. Elles forment la glande interstitielle responsable de la sécrétion des androgènes (Dadoune et Demoulin, 1993).

II.2. RAPPELS ANATOMO-HISTOLOGIQUES

Les testicules ont la forme d'olive et mesurent chez l'homme environ 4 cm de long sur 2,5 cm de diamètre. Chez le bélier, on observe que le rapport poids du testicule sur poids du corps est plus élevé (1/200) que chez l'homme (1/500), le diamètre testiculaire variant de 7 à 9 cm selon les races et la saison. Les testicules sont logés dans le scrotum, organe en forme de sac situé à l'extérieur de la cavité abdomino-pelvienne dont la température est de 3° à 5° inférieure à celle du corps. En effet, la spermatogénèse ne peut se dérouler complètement qu'à cette température, l'optimum se situant entre 32 et 34°C.

Les testicules sont recouverts de deux tuniques. La superficielle est la vaginale, formée de deux feuillets et dérivée du péritoine. La deuxième est l'albuginée qui forme une capsule de tissu conjonctif fibreux. Des projections de l'albuginée forment les cloisons du testicule et divisent celui-ci en 200 à 300 compartiments appelés lobules. Chaque lobule renferme de un à quatre tubules séminifères contournés, siège de la spermatogenèse. L'albuginée s'enfonce également dans la profondeur du testicule et forme le corps de Highmore perforé par les vaisseaux et le Rete Testis (Marieb, 1993; figure 1.7).

Les tubules séminifères sont très fluctueux et forment des anses qui s'ouvrent à leurs deux extrémités dans les tubes droits. Leur diamètre est de 200 à 250 µm chez le bélier, mais varie de 300 à 400 µm pour l'homme. La paroi du tube est formée de dedans en dehors par la membrane basale, une ou plusieurs assises de cellules myoïdes et une couche de fibrilles de

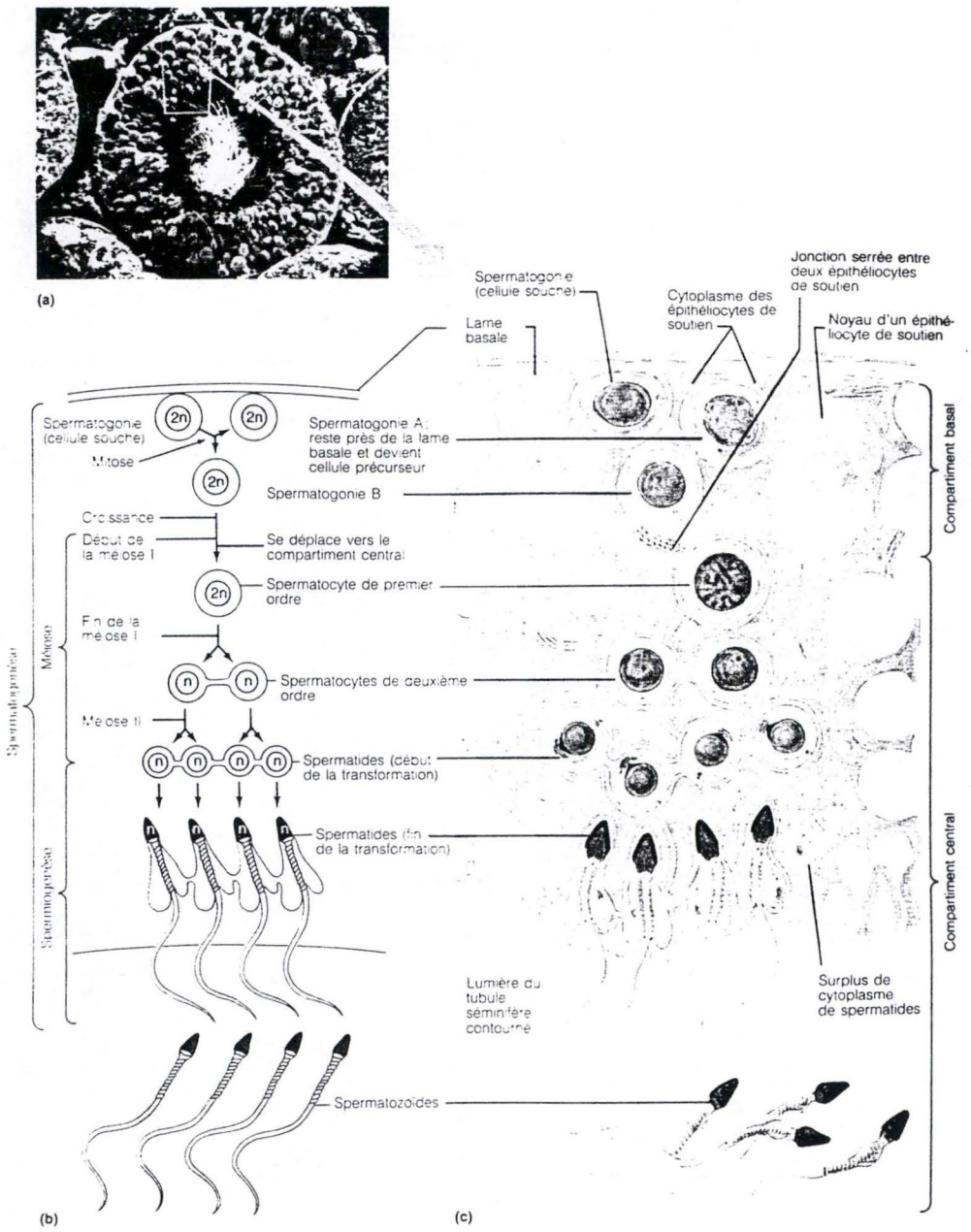


Figure 1.8: (a) Micrographie au microscope électronique à balayage d'un tubule séminifère contourné (*225). (b) Diagramme du déroulement de la spermatogenèse montrant la position relative des cellules germinales dans la paroi du tubule séminifère contourné. (c) Agrandissement d'une partie de la paroi du tubule séminifère contourné montrant les cellules germinales.

collagène revêtue par l'assise de cellules endothéliales qui délimite les capillaires lymphatiques du tissus interstitiel. Les cellules myoïdes, en se contactant environs toutes les minutes contribuent à l'évacuation des spermatozoïdes du tube séminifère (Dadoune et Démoulin, 1995).

Tout au long de la spermatogénèse, les cellules descendant d'une même spermatogonie demeurent jointes les unes aux autres par des ponts cytoplasmiques. Et sont en outre reliées par des cellules spécialisées appelées épithéliocytes de soutien ou cellules de Sertoli, qui s'étendent de la lame basale jusqu'à la lumière du tube séminifère contourné. Les épithéliocytes de soutien, unis par des jonctions serrées, forment un revêtement ininterrompu à l'intérieur des tubules et cloisonnent ceux-ci en deux compartiments, le compartiment basal situé entre la lame basale et les jonctions serrées renfermant les spermatogonies et le compartiment central comprenant les cellules se divisant par méïose ainsi que la lumière du tubule.

Les jonctions serrées qui unissent les cellules de Sertoli forment la barrière hémato-testiculaire. Cette barrière empêche les antigènes de la membrane plasmique des spermatozoïdes en voie de différenciation de traverser la lame basale pour passer dans la circulation sanguine et y provoquer une réaction auto-immune. Etant donné que les spermatozoïdes ne se forment pas avant la puberté, ils sont absents lorsque le système immunitaire apprend à reconnaître les tissus de l'individu. En outre, toutes les cellules formées en fin de méïose I ont un matériel génétique différent des cellules somatiques. Les anticorps qui se forment pourraient, si cette barrière n'existait pas, s'attaquer aux spermatozoïdes et conduire à la stérilité.

Les spermatogonies, identiques aux cellules somatiques sur le plan génétique et reconnues comme siennes par l'organisme, sont situées à l'extérieur de la barrière et peuvent ainsi répondre aux messagers chimiques circulant dans le sang et déclenchant la spermatogénèse.

Après une mitose des spermatogonies, les jonctions serrées des épithéliocytes de soutien s'ouvrent telle une écluse, afin de permettre aux spermatocytes de premier ordre de passer pour pénétrer dans le compartiment central, et donc vers la lumière des tubules séminifères.

II.3. SPERMATOGENESE.

La spermatogénèse est le processus de différenciation cellulaire qui, à partir des cellules souches, aboutit à la production des spermatozoïdes (figure 1.8). C'est un processus continu qui commence à la puberté et se poursuit ensuite sans interruption à partir de cellules épithéliales tapissant les tubes séminifères. Les cellules germinales passent par quatre phases lors de la spermatogénèse: spermatogonie, spermatocyte, spermatide et spermatozoïde.

Figure 1.9: Transformation d'une spermatide en spermatozoïde fonctionnel.

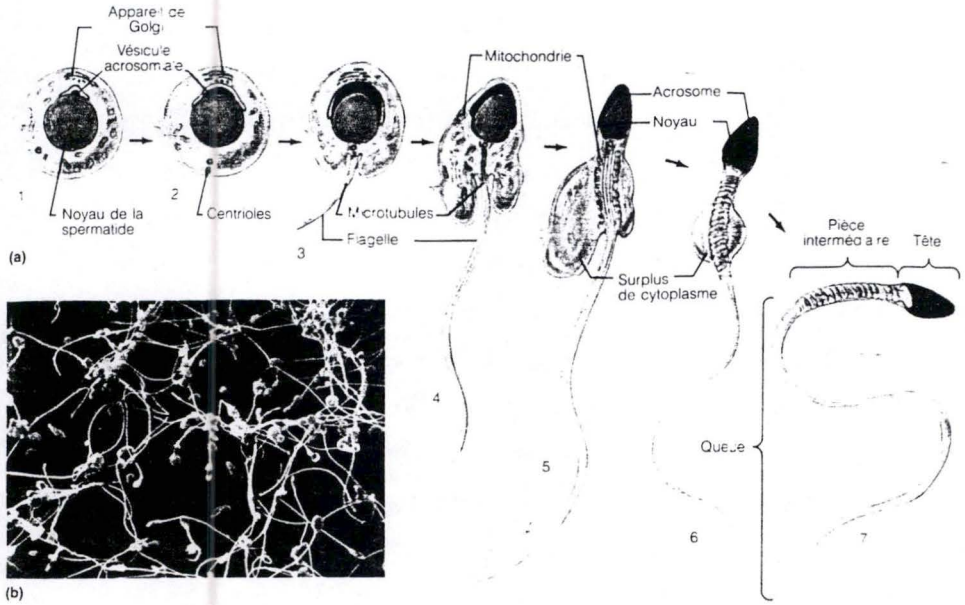
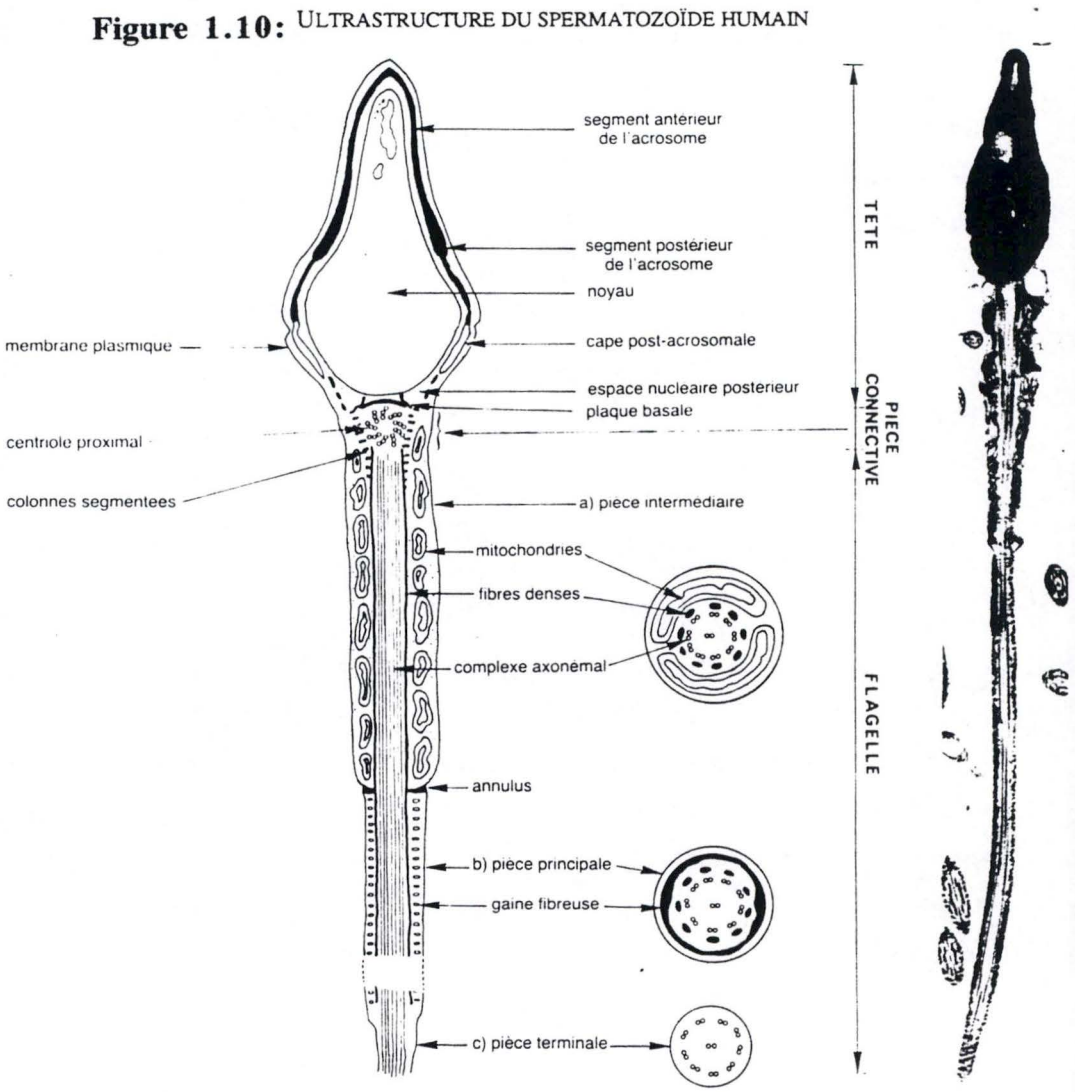


Figure 1.10: ULTRASTRUCTURE DU SPERMATOZOÏDE HUMAIN



Microscopie électronique d'une section longitudinale (x 3 600).
Schéma correspondant. Trois niveaux du flagelle sont représentés en coupe transversale.

Les spermatogonies, cellules germinales immatures, sont les cellules les plus externes et les moins différenciées des tubules séminifères contournés. Elles sont en contact direct avec la lame basale et reliées intimement aux cellules de Sertoli qui servent à leur maintien et à leur alimentation pendant leur différenciation. Les spermatogonies subissent des mitoses, de façon continue, et donneront jusqu'à la puberté de nouvelles spermatogonies. Au moment de la puberté, la spermatogénèse commence et chaque division mitotique d'une spermatogonie donne dès lors naissance à deux cellules filles différentes: la spermatogonie A pâle (Ap) qui reste près de la lame basale pour perpétuer la lignée de cellules germinales et la spermatogonie B poussée vers la lumière du tubule. Certaines de ces cellules cessent de se multiplier et se différencient en spermatocytes primaires.

Chaque spermatocyte primaire entre en première prophase méïotique. La division I de la méïose produit deux cellules haploïdes plus petites, appelées spermatocyte secondaires. Les spermatocytes 2^{aires}subissent rapidement la méïose II pour donner quatre spermatides haploïdes.

Les spermatides, petites cellules rondes avec un gros noyau sphérique, sont situées près de la lumière du tubule. Chaque spermatide possède le nombre de chromosomes adéquat pour la fécondation (n), mais n'est pas motile. Elle doit encore se métamorphoser et subir un processus de "profilage" appelé spermiogénèse qui lui fera perdre la majorité de son cytoplasme superflu, la dotera d'une queue et procédera à la mise en place de l'acrosome pour aboutir à la libération des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères (spermiation; figure 1.9).

II.4. DESCRIPTION DE LA CELLULE MATURE, LE SPERMATOZOÏDE

Le spermatozoïde est une des cellules les plus petites de l'organisme. Il est conçu pour la propagation des gènes qu'il porte et est profilé pour avoir une motilité maximale, lui conférant ainsi un maximum de chance dans la "course pour la fécondation".

Un spermatozoïde est constitué de trois parties bien distinctes : la tête, le col et la queue. Ces trois parties sont caractérisées par une fonction principale, respectivement génétique, métabolique et locomotrice (figure 1.10).

La tête présente chez les mammifères la forme d'une raquette à l'ovale plus ou moins régulier et à la surface plus ou moins bombée. Sa morphologie varie plus ou moins selon les espèces. Le noyau en occupe presque la totalité du volume alors que le cytoplasme y est en quantité très réduite. Le noyau contient une chromatine fortement condensée et très résistante aux agents susceptibles de la décondenser.

Le noyau est recouvert dans ces 2/3 antérieurs par l'acrosome. Celui-ci est formé de deux parties: *l'acrosome proprement dit* constitué d'une simple membrane provenant de la fusion des vésicules golgiennes et renfermant les enzymes hydrolytiques, notamment l'hyaluronidase et la proacrosine (Derivaux et Ectors, 1986) et le *perforatorium* fait d'actine et de myosine dont une brusque modification de l'organisation provoque une invagination au travers de l'acrosome proprement dit et libère ainsi le contenu de celui-ci.

Le col est la pièce connective entre la tête et la queue. Outre ce rôle de connexion, il possède également l'appareil centriolaire constitué d'un centriole proximal (parallèle à la base du noyau) et d'un centriole distal (qui lui est perpendiculaire), ainsi que de nombreuses mitochondries.

Le flagelle est la pièce responsable du mouvement du spermatozoïde. Il est constitué de trois parties présentant un diamètre décroissant vers la partie postérieure. Ces trois parties sont la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale.

La pièce intermédiaire constitue la partie la plus épaisse et serait considérée comme le moteur du mouvement. Elle s'étend du centriole distal à l'anneau centriolaire. L'axonème, ou filament axial est constitué de 9 paires de microtubules arrangées radiairement autour de deux microtubules centraux. Associés à ces cylindres de 0,18 mm de diamètre et les entourant, on retrouve neuf fibres denses ayant des propriétés élastiques et contractiles. Chaque cylindre fibrillaire est entouré d'une couche de protoplasme et d'une membrane cytoplasmique. Cette enveloppe est riche en lipides, et on peut y trouver le système cytochrome-oxydase des spermatozoïdes (Derivaux et Ectors, 1986).

La pièce principale est située postérieurement à l'annulus et représente le segment le plus long du spermatozoïde. Tout comme la pièce intermédiaire, elle est constituée de l'axonème et de ses fibres surnuméraires, mais le manchon mitochondrial a laissé place à une gaine fibreuse ayant pour rôle de conférer une stabilité à la queue. Cette gaine est caractérisée par deux épaississements longitudinaux s'étendant tout le long de la pièce et qui marqueraient la face ventrale et dorsale du spermatozoïde.

La pièce terminale n'est finalement plus constituée que de filaments axiaux et de la membrane plasmique.

II.5. REGULATION HORMONALE DE LA FONCTION TESTICULAIRE

La régulation hormonale de la spermatogénèse et de la production d'androgènes testiculaires fait intervenir des interactions entre l'hypotalamus, l'adénohypophyse et les testicules. Cet ensemble est parfois appelé axe cérébro-testiculaire, mais d'autres éléments du

système endocrinien participent également à ce fonctionnement: épiphyse, thyroïde, surrénales,...

II.5.1. Les hormones hypothalamo-hypophysaires

L'hypotalamus sécrète la **GnRH** (Gonadotropin Releasing Hormone) qui est un décapeptide identique pour tous les mammifères et dont le poids moléculaire est compris entre 1,2 et 1,4 kDa. Cette hormone a pour cible les cellules gonadotropes de l'hypophyse. Elle est catabolisée au niveau des reins avec un temps de demi-vie très court, de deux à quatre minutes (Derivaux et Ectors, 1986).

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

Le contrôle de la sécrétion du GnRH est assuré par le GnRH lui-même par "feed-back-négatif" très court assuré par les teneurs sanguines de l'hormone. D'autre part, les gonadotropines hypophysaires (LH et FSH) jouent également un rôle de "feed-back-négatif". Les autres hormones stéroïdiennes (testostérone, oestradiol) agissent par un mécanisme de "feed-back-négatif" long sur les sécrétions de l'hypothalamus, de même que l'androgen-binding-protein (ABP).

Sous l'influence stimulante du GnRH, l'adénohypophyse sécrète les hormones gonadotropes LH et FSH. La concentration de l'hypophyse en gonadotropines est variable suivant les espèces, et pour une même espèce suivant la race et l'individu.

La LH ou lutropine est une glycoprotéine dimérique d'un poids moléculaire de 30 kDa; son temps de demi-vie, chez le mouton, est de 12 à 20 minutes (Bister *et al.*, 1986). Chez le mâle, cette hormone est parfois appelée ISCH, Interstial Cell Stimulating Hormone.

Tout comme la LH, la FSH ou follitropine est également un dimère composé de deux sous-unités α et β dont les chaînes polypeptidiques sont liées de façon non-covalente (Ronir,1989). Son poids moléculaire est de 32 kDa et son temps de demi-vie de trois à quatre heures.

Les glycoprotéines hypophysaires circulent dans le sang sous forme libre. Les récepteurs cellulaires des hormones peptidiques sont situés au niveau de la paroi cellulaire, et la reconnaissance spécifique s'effectue principalement grâce à la sous-unité β. La liaison de l'hormone à son récepteur induit un changement de conformation et une activation du système membranaire (protéine G et adénylate cyclase) associé à ce site (Catt et Dufau, 1991).

La FSH stimule la spermatogénèse des testicules sans agir toutefois directement sur les cellules germinales. Elle agit en effet sur les épithéliocytes de soutien qui sécrètent alors l'ABP (androgen-binding-protein). L'ABP se lie à la testostérone et permet le maintien d'une

concentration élevée de cette hormone dans les tubules séminifères contournés. Le complexe ABP-Testostérone agit sur les cellules germinales et les spermatocytes de manière à favoriser la poursuite de la méïose et la spermatogénèse.

La LH se lie spécifiquement aux cellules interstitielles et les stimule pour qu'elles produisent de la testostérone, et des oestrogènes. La testostérone qui entre dans la circulation sanguine produit plusieurs effets dans d'autres régions de l'organisme.

Les sécrétions de LH et FSH sont assurées par le GnRH; cependant, *in vivo*, ces deux hormones n'étant pas sécrétées de façon synchrone, il semble évident que des régulations indépendantes interviennent, mais actuellement un consensus ne cite la présence que d'un seul polypeptide hypothalamique régulateur possédant des actions différentes sur les cellules hypophysaires.

L'hypothalamus et l'adénohypophyse peuvent subir l'action inhibitrice de certaines hormones présentes dans le sang. La testostérone inhibe la sécrétion de gonadolibérine (GnRH), et inhibe également les sécrétions de LH et FSH. L'inhibine (INH) et l'oestradiol (E_2) sécrétés par les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig exercent également un "feed-back-négatif" sur la sécrétion de FSH.

II.5.2. Les stéroïdes testiculaires

La cellule de Leydig synthétise et libère les androgènes, qui sont responsables de la différenciation embryonnaire des voies génitales, puis de l'apparition des caractères sexuels secondaires et du comportement mâle. La cellule est capable d'assurer une stéroïdogénèse complète à partir du cholestérol apporté sous la forme de lipoprotéines, et même à partir de l'acétate.

II.5.2.1. Les androgènes

Le cholestérol est, dans la cellule de Leydig, pris en charge par un important complexe enzymatique comportant un cytochrome P450 spécifique: ($P\text{-}450_{scc}$). La biosynthèse des androgènes est assurée par le cytochrome $450_{17\alpha}$ (17α hydroxylase /17 -> 20 lyase) qui réalise la conversion du prégnénolone et de la progestérone en leurs dérivés 17α-hydroxylés, et la coupure de la liaison C17-C20, pour donner la DHA et l'androstènedione, respectivement. Dans les gonades, cette 17α hydroxylation conduit aux stéroïdes sexuels. L'androstènedione est convertie en testostérone par l'action de l'enzyme 17β-HSD, qui transforme également la DHA en androst-5-ène-3β,17β-diol et l'oestrone en oestradiol.

II.5.2.2. Biosynthèse des oestrogènes

On a pu démontrer que chez le rat, 0,4 % de la testostérone est aromatisée en oestradiol, ce par la cellule de Sertoli. Cette aromatisation est assurée par le $P\text{-}450_{aro}$, situé dans le réticulum endoplasmique. Elle comporte deux hydroxylations du méthyl en C-19 et une hydroxylation sur le C-3, suivie de la perte du carbone 19 et du réarrangement phénolique du cycle A.

II.5.3. Les facteurs de croissance: IGF-1

Les facteurs de croissance ayant un rôle prépondérant dans le testicule sont ceux du système IGF. Ce système est en fait un ensemble de facteurs comprenant l'IGF-1, l'IGF-II, leurs protéïnes de liaisons et leurs récepteurs respectifs.

II.5.3.1. Structure

Les IGF se présentent sous deux formes: l'IGF-1, ou somatomédine, est un peptide monocaténaire alcalin de 7,649 Kda composé de 70 acides aminés et l'IGF-II ou Multiplication Stimulating Activity est un peptide monocaténaire de 7,471 KDa composé de 67 acides aminés.

L'homologie de séquence entre les deux IGF est de 62% et présente avec la pro-insuline 40% d'homologie, d'où l'idée généralement admise que ces composés dérivent vraisemblablement d'un gène ancestral commun (Sara et Hall, 1990).

II.5.3.2.Rôles

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

L'IGF-I stimule la prolifération des cellules fibroblastiques, des chondrocytes, des cellules nerveuses et des cellules de la granulosa. *In vitro*, l'IGF-I stimule la différenciation de très nombreux types cellulaires, dont les cellules nerveuses, les cellules musculaires, les cellules de Sertoli et les cellules de la granulosa. *In vivo*, l'IGF-I stimule la croissance des rats déficients en GH et de rats hypophysectomisés; cependant, l'IGF-I n'est pas suffisant pour reproduire l'ensemble des effets de la GH et conduit souvent à une croissance disproportionnée des tissus (Skottner *et al.*, 1989).

L'IGF-II stimule chez l'agneau la sécrétion d'ostéocalcine (Coxam *et al.*, 1992). L'étude de souris transgéniques déficientes en IGF-II prouve le rôle déterminant de l'IGF-II dans la croissance foetale (De Chiara *et al.*,1990).

Dans les fluides biologiques, les protéïnes porteuses spécifiques des IGF, IGFBP, jouent un rôle important dans le stockage des IGF en augmentant ainsi leur temps de demi-vie qui est chez la brebis, de 5 minutes pour l'IGF-I libre, de 30 minutes pour l'IFG-I présent dans

le "petit complexe" et de 9 heures si l'IGF-I se trouve au sein du "grand complexe" (Stuart *et al.*, 1991; cités par Monget, 1993).

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

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

CHAPITRE III: LA FECONDATION

III.1. INTRODUCTION

Chez les mammifères, la fécondation se déroule en plusieurs étapes:

- capacitation du spermatozoïde après éjaculation;
- pénétration du cumulus oophorus;
- reconnaissance du spermatozoïde et de la zone pellucide;
- fixation du spermatozoïde à la zone pellucide;
- induction de la réaction acrosomiale;
- pénétration de la zone pellucide;
- fusion des gamètes;
- activation de l'ovocyte, manifestée par l'exocytose de granules corticaux, et achèvement de la seconde division méïotique;
- formation des pronuclei mâle et femelle;
- développement et migration des pronuclei au centre de l'oeuf;
- association des chromosomes paternels et maternels sur le fuseau de 1ère division de segmentation.

III.2. CAPACITATION DES SPERMATOZOÏDES (ACQUISITION DE LA MOTILITE ET DE LA STABILITE DES MEMBRANES)

La capacitation est le phénomène qui permet au spermatozoïde d'acquérir son pouvoir fécondant. Elle consiste en la perte d'une série de facteurs stabilisants de membranes qui, d'une part, permet de démasquer les sites de reconnaissance spermatozoïde-ovocyte et d'autre part, permettra la fusion de membranes lors de la réaction acrosomiale puis la fusion avec l'ovocyte.

Les spermatozoïdes subissent une série de modifications dans l'épididyme, tube d'une longueur de 50 à 60 m (bélier), de diamètre croissant (de 70 à 500 µm) dans lequel ils séjournent environs 13 jours. Les changements concernent le noyau, l'acrosome, la membrane plasmique, l'acquisition de la mobilité et l'aptitude à se fixer à la zone pellucide.

Le noyau se condense par accroissement des ponts disulfures des nucléoprotéines. Ceci le stabilise et est considéré comme un mécanisme de protection du spermatozoïde.

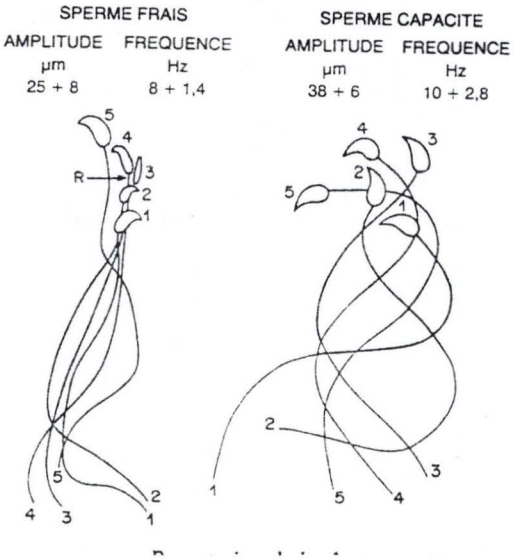
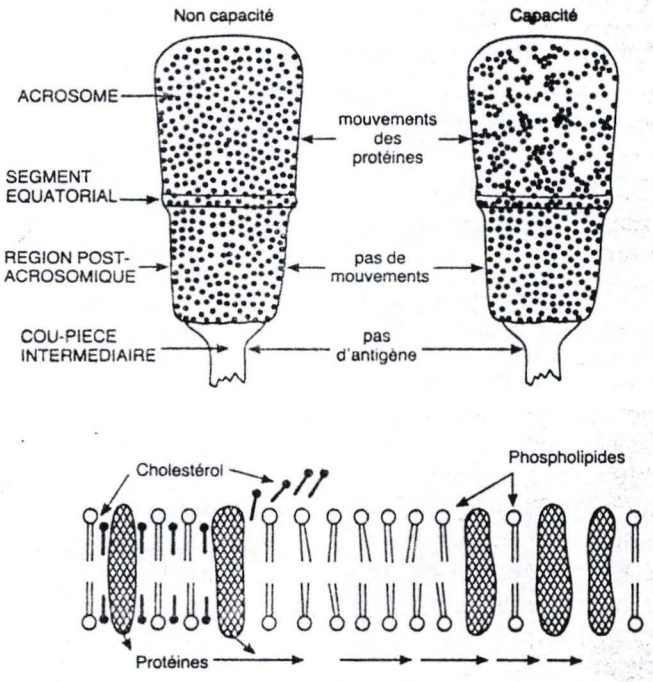


Figure 1.11: Changements dans le mouvement du spermatozoïde résultant de la capacitation.



Pendant la capacitation des protéines de la membrane plasmique migrent, créant des domaines sans protéines. C'est là que commencera la fusion de la membrane plasmique et de la membrane acrosomique externe. Les mouvements des protéines sont visualisés soit par cryo-décapage, soit par marquage par des anticorps monoclonaux c'est le cas de l'exemple rapporté ici (d'après Suzuki et al., 17).

Figure 1.12: Migration des protéïnes du spermatozoïde lors de la capacitation.

L'acrosome subit des changements de forme, sans rapport avec une maturation des enzymes contenus en son sein.

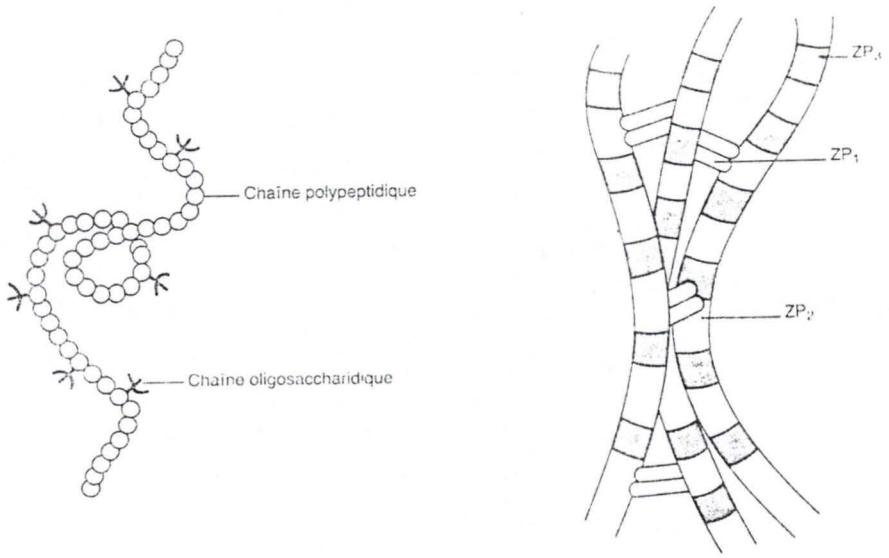
La membrane plasmique est l'objet de remaniements au niveau de sa composition lipidique pour favoriser sa stabilité : le rapport stérols/phospholipides s'élève de 0.26 à 0.44. Certaines protéines, présentes à la sortie du testicule sont éliminées ou perdent des épitopes; d'autres sécrétées par l'épididyme se fixent par liaison non covalente soit sur la tête, soit sur le flagelle. Les caractéristiques et la distribution des résidus glycosilés fixés aux protéines ou lipides changent : dans la tête de l'épididyme, les résidus mannose sont très abondants sur la membrane péri-acrosomique, alors que dans la région post-acrosomique, ils prédominent au niveau de la queue. Dans la tête de l'épididyme, le flagelle est animé d'un mouvement vibratile; des protéines dites de mobilité, sécrétées au niveau du tube épididymaire, induisent une mobilité linéaire du spermatozoïde (figure 1.11).

Les composants du plasma séminal ont un rôle stabilisateur sur la membrane plasmique du spermatozoïde et empêchent ainsi celui-ci d'effectuer une réaction acrosomiale prématurée. Il a été démontré la nécessité d'éliminer soigneusement ce plasma séminal pour que la capacitation puisse se faire; ceci est réalisé naturellement dans les voies génitales femelles après l'accouplement et peut être réalisé *in vitro* par centrifugation, migration ascendante ou dilution. Le contact avec du plasma séminal décapacite les spermatozoïdes capacités.

Les changements protéiniques de la membrane plasmique du spermatozoïde seront fonction de la nature de la liaison protéïne-membrane : les protéines intégrales voient leur structure modifiée par la perte ou le changement de résidus glycosilés, alors que les protéines superficielles liées à la membrane plasmique par des liaisons non covalentes sont relarguées au cours de la capacitation (Peknicova *et al.*, 1994). Les protéines peuvent également migrer sur des distances importantes formant ainsi des zones dépourvues de protéines permettant ainsi la fusion des membranes plasmique et acrosomique au cours de la réaction acrosomiale (figure 1.12).

Il est possible d'observer, lors de la capacitation, une augmentation de l'activité respiratoire du spermatozoïde, mais cette augmentation est liée à l'apport de substrats énergétiques par les milieux capacitants. Par contre, on peut noter l'élévation du pH interne résultant d'une activation des mouvements d'ions.

Tous ces changements contribuent à rendre le spermatozoïde fécondant et résistant (transport et survie). Ils lui permettront d'acquérir une hypermotilité et d'assurer la fixation spécifique à la zone pellucide et la fusion.



(d'après Wassarman. Scient. Amer., 1988).

Figure 1.13: Structure macromoléculaire de la ZP3 et assossiation des trois glycoprotéines majeures de la zone pellucide.

III.3. PENETRATION DU CUMULUS OOPHORUS

Chez la plupart des mammifères euthériens, l'ovule est composé d'un ovocyte entouré de la zone pellucide qui le sépare de la corona radiata; celle-ci est constituée de cellules provenant du cumulus oophorus et d'une matrice riche en acide hyaluronique. Chez la brebis, ainsi que d'autres espèces (vache, chèvre...), la corona radiata s'expanse rapidement après la décharge préovulatoire de LH, permettant ainsi aux spermatozoïdes d'entrer plus facilement en contact avec la zone pellucide de l'ovocyte. Cette décharge débute donc dès avant l'ovulation et est complète peu avant ou après celle-ci. La corona n'est traversée complètement que par les spermatozoïdes capacités mais n'ayant pas encore effectué leur réaction acrosomiale. En effet, il a été démontré *in vitro* que tous les spermatozoïdes arrivant en contact avec la zone pellucide possèdent un acrosome intact. Pourtant, l'hyaluronidase émise lors de la rupture de l'acrosome est sensée faciliter le passage du spermatozoïde au sein du cumulus. Il semble en effet qu'un grand nombre de spermatozoïdes doivent ainsi se "sacrifier" pour permettre à un autre d'atteindre la zone pellucide. La capacitation est en effet fréquemment suivie spontanément de la réaction acrosomiale. Les enzymes libérées dans le milieu entament la lyse de la matrice cellulaire et permettent ainsi progressivement l'approche de l'ovocyte par d'autres spermatozoïdes. C'est ce qui explique l'effet favorable des milieux de fécondation *in vitro* stimulant la réaction acrosomiale et la nécessité d'un nombre minimum et important de spermatozoïdes dans le milieu de fécondation.

Le cumulus sélectionne donc les spermatozoïdes capacités, mais est capable aussi de capaciter ceux qui ne le sont pas via une activité stéroïde sulfatase (Langlais et Robert, 1985; Cox *et al.*, 1993). Il interviendrait dans la création d'un milieu favorisant le contact entre le spermatozoïde et la zone pellucide.

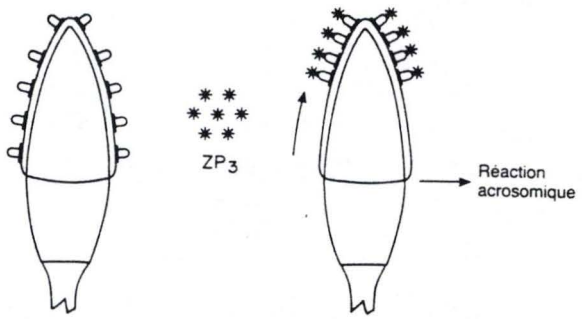
III.4. RECONNAISSANCE DE LA ZONE PELLUCIDE

Avant de pénétrer l'ovule, le spermatozoïde doit pouvoir se fixer à la surface de la zone pellucide pour y effectuer sa réaction acrosomiale.

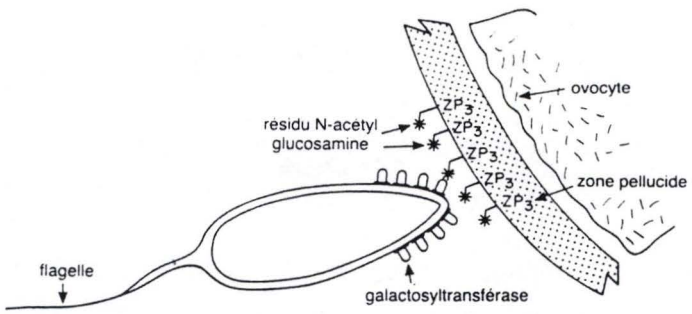
La zone pellucide est une enveloppe extracellulaire qui entoure l'œuf de mammifère. Elle est constituée d'une matrice lacunaire baignant un réseau de filaments glycoprotéiques dont plusieurs familles présentant de grandes analogies ont été identifiées chez différentes espèces. Ces glycoprotéines sont synthétisées et sécrétées durant la croissance de l'ovocyte.

Chez la souris, la zone pellucide contient 3 glycoprotéines majeures dénommées ZP1, ZP2 et ZP3. ZP2 et ZP3 sont associées pour former des filaments pontés par la ZP1, ce qui confère à la zone pellucide une structure tridimensionnelle (Wassarman, 1992; figure 1.13).

Figure 1.14: Récepteurs du spermatozoïde et réaction acrosomique.



La ZP3 provoque l'agrégation des récepteurs, ce qui a pour effet de déclencher la réaction acrosomique (d'après Leyton et Saling, 11).



Une galactosyltransférase membranaire du spermatozoïde assure le pontage avec des résidus N-acétylglucosamine de la ZP3 (d'après, Shur et Hall, 7).

Figure 1.15: Fixation primaire du spermatozoïde à la pellucide.

Les principales fonctions de la zone pellucide sont d'induire la réaction acrosomiale des spermatozoïdes, de prévenir la polyspermie après la fécondation et de protéger le nouvel embryon jusqu'à son implantation dans l'utérus (Wassarman, 1990).

III.5. FIXATION DU SPERMATOZOÏDE

L'interaction des gamètes est un phénomène spécifique (dans le sens propre à chaque espèce), qui implique des molécules complémentaires situées à la fois sur la membrane plasmique du spermatozoïde (protéines de liaison) et sur la zone pellucide (récepteur spermatique; figure 1.14).

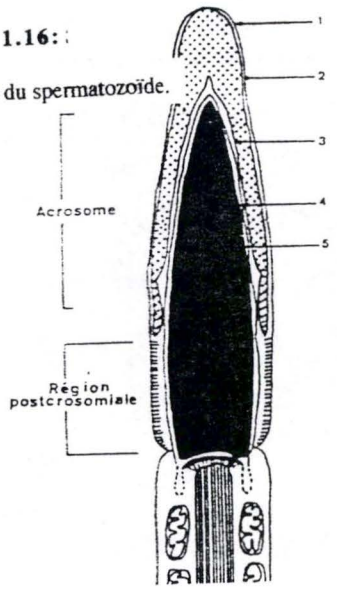
Dans un premier temps, les spermatozoïdes capacités se fixent sur la zone pellucide de manière lâche, réversible et non spécifique, mais il est probable que l'orientation des gamètes pendant la fixation influence le fait que la liaison évolue vers une fixation irréversible, solide et spécifique (Plachot, 1988; figure 1.15). Rappelons que cette fixation fait intervenir des molécules complémentaires.

Chez la souris, les sites de reconnaissance de la zone pellucide ont été clairement identifiés; il s'agit de protéines spécifiques, la ZP3 qui assure la fixation primaire de spermatozoïdes dont l'acrosome est intact et la ZP2 qui intervient après la réaction acrosomiale pour maintenir l'attachement du gamète mâle. La protéine sp56 spécifique de la paroi du spermatozoïde semble jouer le rôle complémentaire de reconnaissance et de liaison à l'ovocyte. Cette protéine sp56 a un poids moléculaire de 56.000 et ressemble très fort à une lectine; elle peut se lier aux chaînes oligosaccharidiques de la ZP3. Il est possible qu'il y ait au niveau du spermatozoïde plusieurs protéines de liaison interagissant avec la ZP3 et que ce serait la somme des interactions entre ces différents acteurs qui contribuerait à former un lien solide entre les deux gamètes.

Les spermatozoïdes ayant effectué leur réaction acrosomiale à la surface de la zone pellucide doivent par la suite rester liés à celle-ci afin de pouvoir la pénétrer. Le maintien du spermatozoïde à la zone pellucide est possible grâce à l'interaction entre la membrane acrosomiale externe et la ZP2, protéine de la zone pellucide. La ZP2 sert donc de récepteur spermatique. De plus, certaines observations suggèrent que la liaison du spermatozoïde ayant effectué sa réaction acrosomiale avec la ZP2 est favorisée par l'acrosine, une protéase trypsine-like associée à la membrane acrosomiale externe (Wassarman, 1990).

Figure 1.16:

Structure de la tête du spermatozoïde.



Représentation sagittale du spermatozoïde. (1) Membrane plasmique, (2) membra acrosomiales externe et (3) interne, (4) enveloppe nucléaire, et (5) noyau (Derivaux et Ectors, 1986).

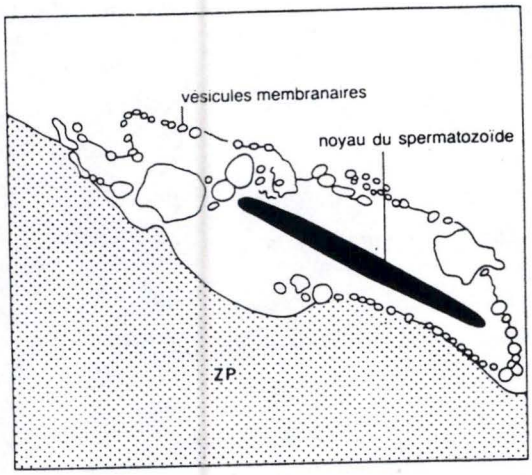
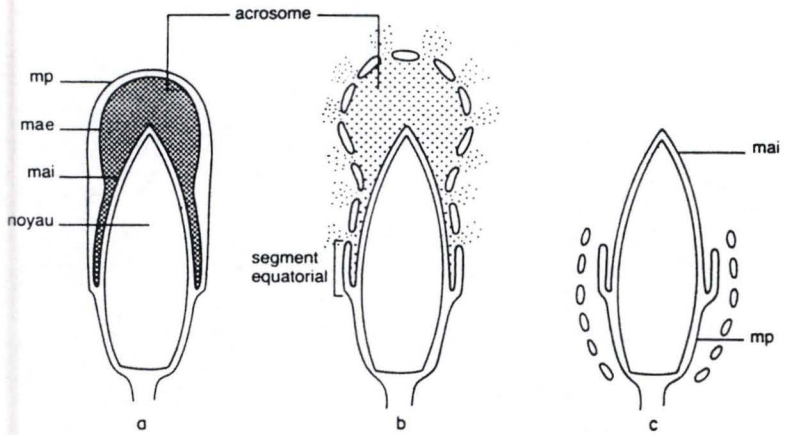


Figure 1.17: Spermatozoïde de bélier ayant effectué sa réaction acrosomique à la surface de la pellucide (ZP) d'un ovocyte de brebis.

Figure 1.18: Schéma de la réaction acrosomique.



(a) avant réaction, le spermatozoïde avec son acrosome intact ; mai : membrane acrosomique interne ; mae: membrane acrosomique externe ; mp: membrane plasmique recouvrant l'acrosome ; (b) au cours de la réaction, la fusion des membranes plasmique et acrosomique externe entraîne la formation de vésicules membranaires et de trous par lesquels le contenu de l'acrosome, hydrolysé par les enzymes acrosomiques, est libéré ; (c) lorsque la réaction acrosomique est achevée, le spermatozoïde abandonne les vésicules membranaires, sa membrane acrosomique interne se trouve exposée ; le segment équatorial reste intact (d'après Yanagimachi, 9).

III.6. REACTION ACROSOMIALE

Après de nombreuses controverses, il est maintenant établi que, chez la plupart des mammifères, la réaction acrosomiale se produit au contact de la zone pellucide de l'ovule. Cela a notamment été démontré chez le mouton.

L'acrosome est une structure propre aux spermatozoïdes. Il s'apparente aux lysosomes et coiffe les 2/3 antérieurs de la tête du spermatozoïde. Cette vésicule est entourée d'une membrane dont on distingue deux feuillets, l'un du côté de la membrane plasmique, l'autre du coté du noyau (figure 1.16). Lors de la réaction acrosomiale, ces membranes subissent des modifications et les membranes plasmique et acrosomiale externe fusionnent, de façon progressive, procédant ainsi à la mise à nu de la membrane acrosomiale interne (figure 1.17).

Cinq étapes du processus sont généralement prises en considération, et ce de façon arbitraire (figure 1.18).

- *acrosome intact:* la membrane plasmique et la membrane acrosomiale externe sont intactes, la matrice est quant à elle compacte et homogène;
- *gonflement de la membrane acrosomiale externe:* les membranes sont toujours intactes, mais la matrice apparaît morphologiquement gonflée et diffuse;
- *invagination de la membrane acrosomiale externe:* cette étape est caractérisée par la présence de vésicules à l'intérieur de l'acrosome. Ces vésicules paraissent être formées par invagination de la membrane acrosomiale externe seule. Une autre particularité de ce stade est le plissement en de nombreux endroits des membranes plasmique et acrosomiale externe;
- *fusion des deux membranes:* on remarque la fusion des membranes plasmique et acrosomiale externe en de nombreux endroits, avec pour résultat la formation de petites vésicules mixtes puis d'une "fenestration" grâce à laquelle une partie de l'acrosome (acrosine, hyaluronidase...) est libérée. Les vésicules membranaires sont ensuite abandonnées en surface de la zone pellucide, lorsque le spermatozoïde pénètre celle-ci;
- *exposition de la membrane acrosomiale interne:* la membrane acrosomiale interne peut enfin entrer en contact direct avec la zone pellucide de l'ovocyte.

La réaction acrosomiale est un processus rapide, c'est-à-dire se déroulant, pour les rongeurs, 10 à 15 minutes après l'attachement du spermatozoïde à la zone pellucide. Il faut savoir que la chronologie des événements chez les mammifères est bien moins connue que chez les invertébrés marins.

La réaction acrosomiale est dépendante du Ca^{++}. Selon un modèle proposé récemment pour le hamster, l'entrée du Ca^{++} dans la cellule inactiverait des ATPases membranaires. Le rôle de ces ATPases consiste à maintenir des concentrations intracellulaires faibles en Na^{+} et Ca^{++}, et

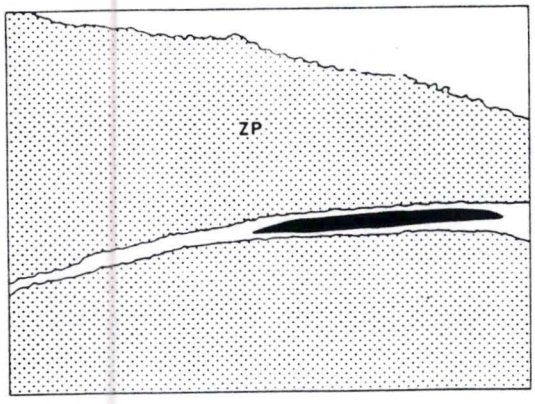


Figure 1.19: Pénétration d'un spermatozoïde dans la zone pellucide (ZP) d'un ovocyte de brebis (d'après cliché de microscopie électronique).

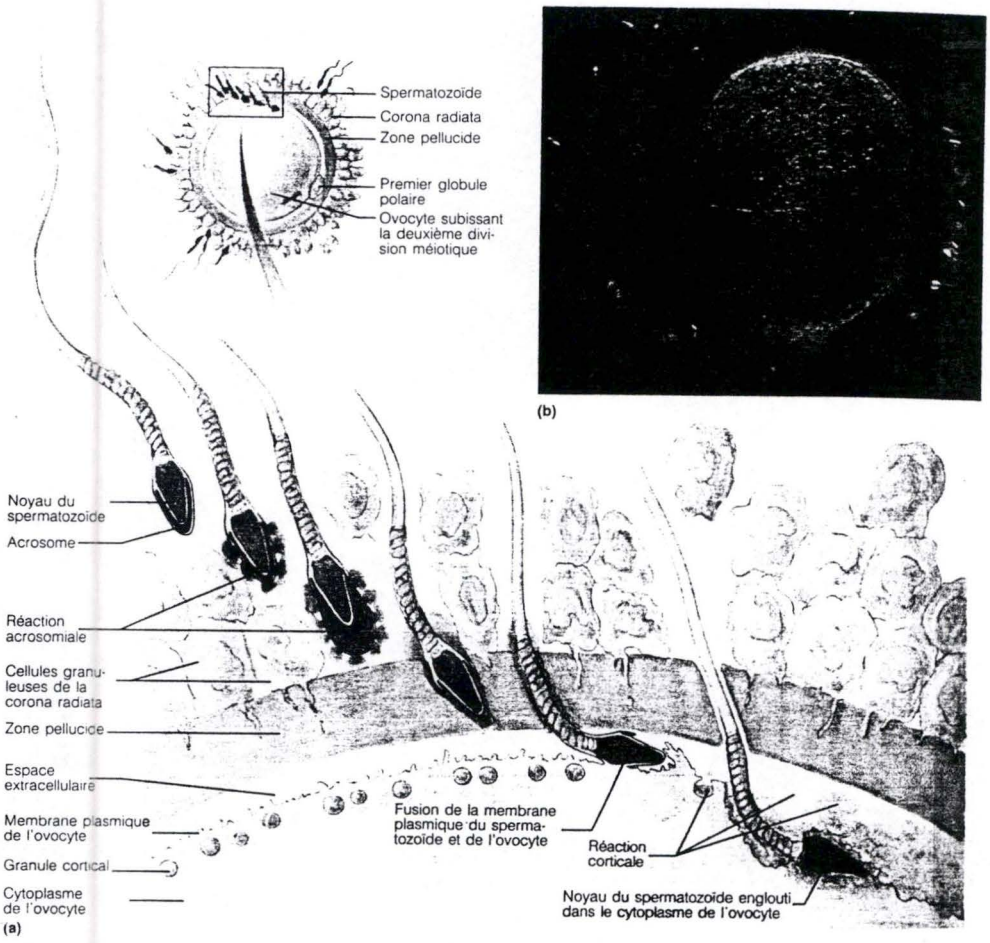


Figure 1.20: Pénétration du spermatozoïde et mise en place de la réaction corticale.

élevées en K^+ afin d'empêcher toute réaction acrosomiale prématurée qui surviendrait avant l'adhésion des deux gamètes. L'inactivation des ATPases au moment de la réaction acrosomique entraîne une augmentation de la concentration en Na^+ qui à son tour provoque une sortie de protons par l'intermédiaire d'un antiport Na^+/H^+. Cette perte d'ions H^+ s'accompagne d'une augmentation du pH intracellulaire qui active des enzymes acrosomiaux avec la transformation, par exemple, de la proacrosine en acrosine. Les enzymes ainsi activés participent à la dispersion de la matrice acrosomique.

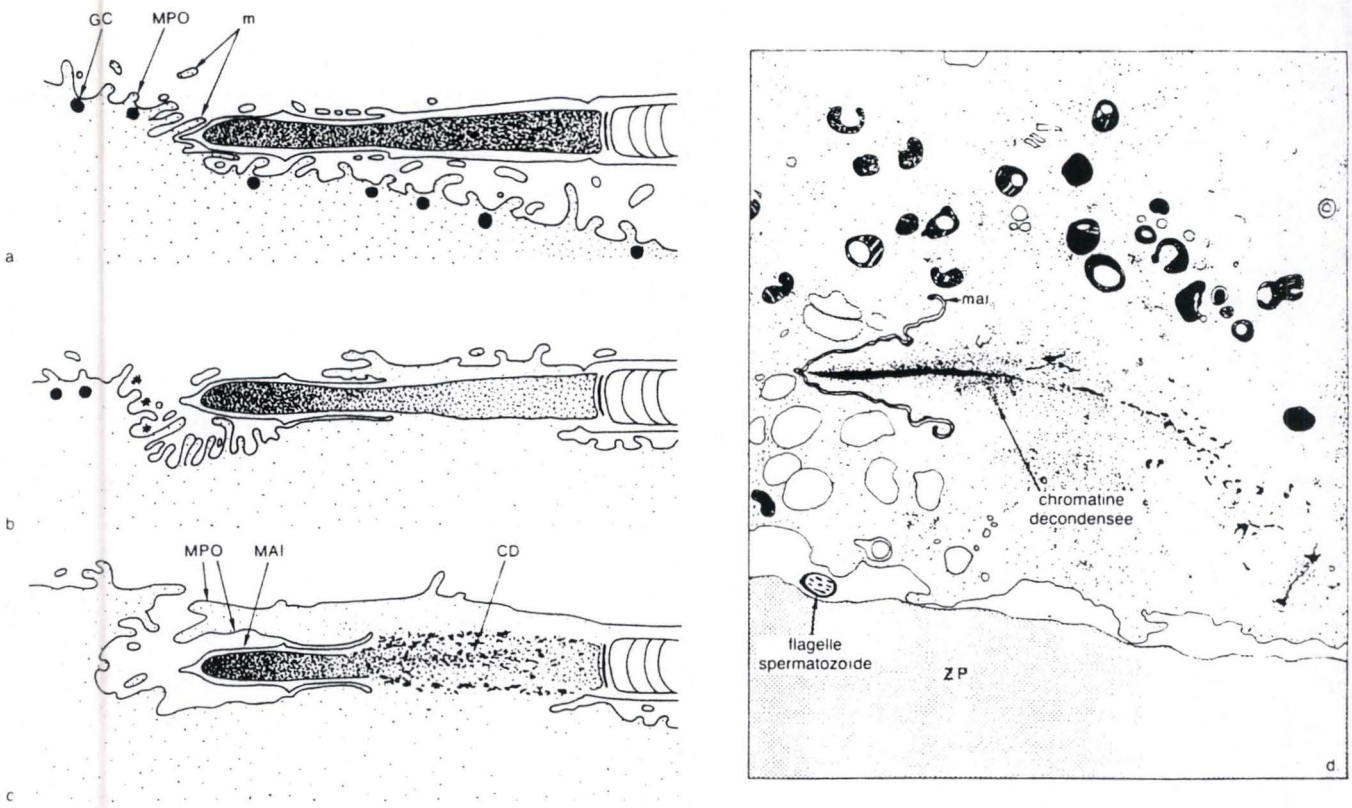
Le Ca^{++} intracellulaire, quant à lui, se lie avec des phospholipides anioniques avec pour effet la déstabilisation des membranes, et favorise la fusion des membranes plasmique et acrosomiale externe. Il active également des phospholipases membranaires telle la phospholipase Ca^{++} dépendante qui induisent à leur tour la formation de produits fusogènes tels que des lysophospholipides (LPC, LPE) et des acides gras insaturées (Langlais et Robert, 1985).

III.7. PENETRATION DE LA ZONE PELLUCIDE

Le spermatozoïde qui a effectué sa réaction acrosomiale abandonne les vésicules membranaires, produit de la réaction, à la surface de la zone pellucide puis traverse cette enveloppe en suivant une trajectoire oblique (Crozet, 1989). Il est alors animé d'un mouvement lui conférant une force propulsive importante. La trace laissée dans la zone pellucide par le passage du spermatozoïde présente des bordures nettes, suggérant ainsi une pénétration mettant en jeu un processus mécanique plutôt qu'enzymatique (figure 1.19; figure 1.20). Il semble toutefois que la motilité du spermatozoïde ne soit pas suffisante pour assurer à elle seule son passage au travers de la pellucide. L'acrosine, qui ne digère pas de zone pellucide *in vitro* pourrait néanmoins hydrolyser partiellement certaines de ses glycoprotéines, et donc modifier la texture de la pellucide. En hydrolysant des molécules de la zone pellucide, les enzymes associées aux spermatozoïdes peuvent donc faciliter le passage de celui-ci au travers de cette enveloppe.

III.8. FUSION DES GAMETES

Le spermatozoïde, après avoir franchi la zone pellucide, pénètre dans l'espace périvitellin, (espace compris entre la zone pellucide et la membrane de l'ovocyte), s'immobilise et fusionne avec le gamète femelle. La fusion se produit entre la membrane plasmique qui recouvre le segment équatorial du spermatozoïde et la membrane plasmique de l'ovocyte (Crozet, 1990; figure 1.21).



(a) le spermatozoïde qui a traversé la zone pellucide entre en contact avec l'ovocyte ; (b) la fusion se produit entre la membrane plasmique qui recouvre le segment équatorial et celle de l'ovocyte (MPO) ; (c) l'enveloppe nucléaire du spermatozoïde disparaît rapidement après la fusion et la chromatine mâle commence à se décondenser (CD) (d'après Yanagimachi et Noda, J. Ultrastruct. Res., 1970) ; (d) stade plus avancé de décondensation d'un noyau de spermatozoïde (d'après cliché de microscopie électronique). MAI : membrane acrosomique interne ; GC : granules corticaux ; m : microvillosités.

Figure 1.21: Fusion du spermatozoïde et de l'ovocyte.

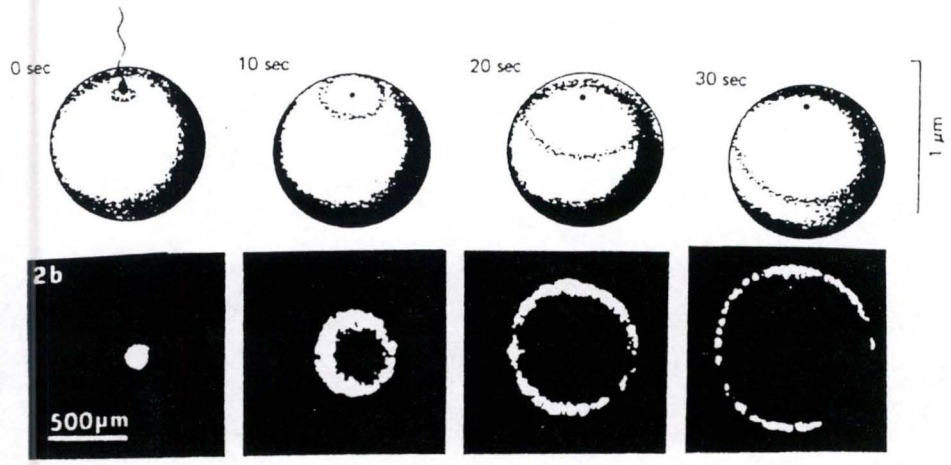


Figure 1.22: Activation de l'ovocyte: flux de Ca^{++}

Les conditions généralement relevées dans les fusions membranaires interviendraient aussi dans la fusion des gamètes. L'augmentation de la concentration en Ca^{++}, due à la réaction acrosomique, active des phospholipases, qui à leur tour interviennent dans la formation d'un gradient temporaire de lysophospholipides, considérés comme lipides fusogéniques. Il semble de plus, que les points de contact entre les deux membranes soient libres de toute protéine, faisant ainsi de la zone de fusion une zone exclusivement lipidique.

Au cours de cette fusion, la membrane plasmique du spermatozoïde est intégrée à celle de l'ovocyte, alors que la membrane acrosomiale interne est incorporée dans le cytoplasme de l'ovocyte en même temps que le noyau du spermatozoïde et les mitochondries de la pièce intermédiaire (Wasserman, 1990).

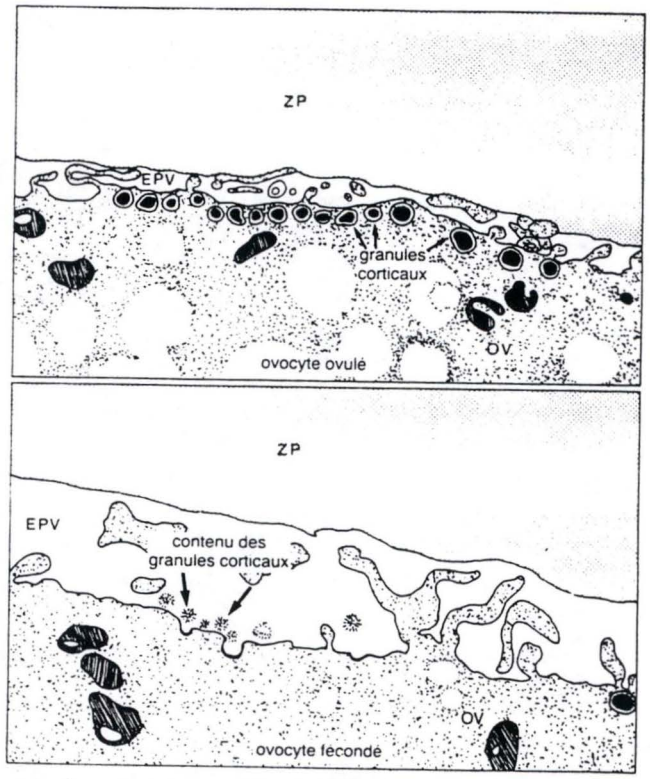
III.9. ACTIVATION DE L'OVOCYTE

L'activation de l'ovocyte par le spermatozoïde entraîne la modification de son métabolisme, ainsi que des remaniements cellulaires importants. Bien que les mécanismes moléculaires intervenant dans l'activation soient assez peu connus chez les mammifères, on voit qu'un changement de potentiel transmembranaire et une mobilisation massive du Ca^{++} intracellulaire constituent une des premières étapes de ce phénomène. Les manifestations cellulaires qui accompagnent l'activation, à savoir l'exocitose des granules corticaux, l'achèvement de la deuxième division méïotique et la modification des propriétés corticales sont, elles, mieux connues.

III.9.1: Changements de potentiel transmembranaire et mobilisation du Ca^{++} intracellulaire

Chez les mammifères, les changements de potentiel transmembranaire qui accompagnent la fusion de l'ovocyte se manifestent par une succession d'hyperpolarisations négatives qui se produisent à des intervalles réguliers de temps variables chez les espèces (de l'ordre de la minute chez le hamster et de plusieurs minutes chez la souris). Ces vagues d'hyperpolarisations s'accompagnent d'une diminution progressive du potentiel de base qui passe de -20 mV à -40mV. Ces hyperpolarisations sont dues à un accroissement de la perméabilité membranaire au K^+, consécutive à l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium.

La fusion du spermatozoïde et de l'ovocyte est suivie d'une décharge massive de Ca^{++} à partir des réservoirs intracellulaires de l'œuf (figure 1.22). Cette décharge de Ca^{++} est la première modification détectable consécutive à la fécondation et se propage comme une onde à travers l'œuf, à partir du site de pénétration du spermatozoïde. Elle est suivie de plusieurs



Les granules corticaux sont alignés le long de la membrane plasmique de l'ovocyte ovulé ; au moment de la fécondation, leur contenu est déchargé dans l'espace périvitellin (EPV) et modifie la zone pellucide (ZP) la rendant impénétrable par des spermatozoïdes surnuméraires (d'après cliché de microscopie électronique).

Figure 1.23: Exocytose des granules corticaux.

vagues calciques successives qui se produisent à quelques minutes d'intervalle et aident à déclencher le programme d'activation du gamète femelle.

Il est possible de déclencher l'activation artificielle de l'ovocyte, sans fécondation, à l'aide d'influx artificiels de calcium, et l'injection d'agents chélateurs du calcium (EGTA) inhibent l'activation ovocytaire après la fécondation. Une question se pose néanmoins: "Comment la fécondation induit-elle la libération de Ca^{++} intracellulaire dans le cytosol?". Des résultats obtenus avec des ovocytes d'oursin suggèrent que la fécondation augmente le Ca^{++} intracellulaire de la façon suivante : juste après la fécondation se produit une augmentation d'inositol-1-4-5-triphosphate (IP3) qui précède la vague d'ions calciques dans le cytoplasme.

Ce phénomène serait provoqué par un facteur spermatique libéré dans l'ooplasme au moment de la fécondation, activant ainsi une protéine G qui induit l'hydrolyse du phosphatidyl-inositol biphosphate (PIP2) par une phospholipase C spécifique. Le résultat de cette hydrolyse est la formation de PIP3 et de diacylglycérol (DAG). L'IP3 provoque la libération du calcium retenu dans le calcisome (compartiment cellulaire) tandis que le DAG active une protéine kinase C, début d'une cascade cellulaire; l'œuf est alors activé (Crozet, 1989).

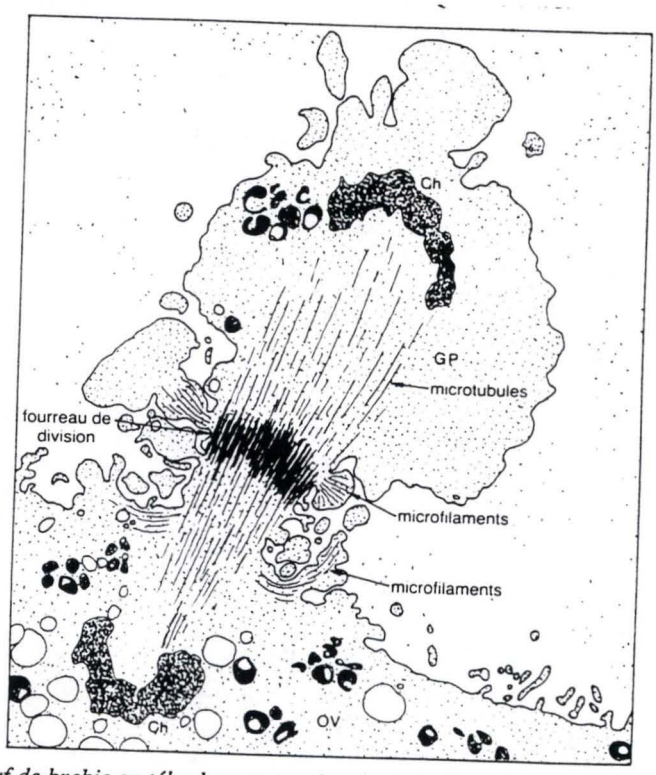
III.9.2. Augmentation du pH intracellulaire et synthèses dans l'œuf

L'augmentation de la concentration en Ca^{++} intracytosolique suivant la fécondation est transitoire et ne peut de toute évidence être impliquée dans les événements observés dans les dernières phases d'activation de l'ovocyte. De ce fait, on pense que l'activation d'une protéine kinase C joue un rôle important, notamment en augmentant le pH intracellulaire par phosphorylation d'un échangeur Na^+/H^+ dans la membrane plasmique de l'oeuf. En effet, cette protéine de transport utilise l'énergie stockée dans le gradient Na^+ à travers la membrane pour pomper des H^+ hors de la cellule. La sortie de ces derniers provoque une augmentation de pH intracellulaire. Il est maintenant bien établi qu'un tel processus induit une accélération des synthèses protéiques et d'ADN (Alberts et coll., 1989).

III.9.3. Exocytose des granules corticaux

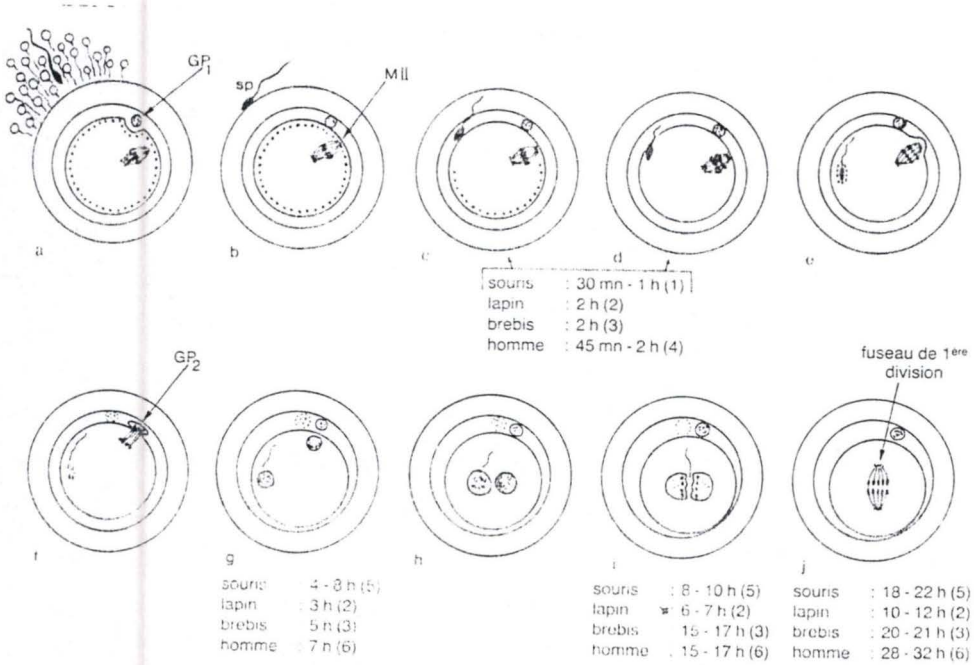
Après la fusion des gamètes, les granules corticaux, qui dans l'ovocyte sont alignés le long de la membrane plasmique, sont déchargés dans l'espace périvitellin (figure 1.23). La zone pellucide devient ensuite réfractaire à la liaison de spermatozoïdes et à sa pénétration par ces derniers. On appelle "zona reaction" ou "réaction corticale" le processus caractérisé par des modifications chimiques et physiques touchant les glycoprotéines constitutives de la zone pellucide. Ces modifications constituent la mise en place d'un blocage de la polyspermie.

Selon des études récentes, ces modifications seraient essentiellement dues à des enzymes hydrolitiques libérés lors de l'exocytose des granules corticaux, et agissant sur les glycoprotéines de la zone pellucide. Le récepteur ZP3 est inactivé, et sa forme modifiée est



Œuf de brebis en télophase II ; un lot de chromatine femelle (Ch) se trouve dans le globule polaire en cours de formation (GP), tandis que l'autre reste dans l'œuf (OV) ; les microfilaments présents de part et d'autre du fourreau de division assurent l'expulsion du globule polaire (d'après cliché de microscopie électronique).

Figure 1.24: Deuxième division méiotique de l'oeuf.



GP_1, GP_2 : 1er et 2e globule polaire ; sp : spermatozoïde ; MII : fuseau de Métaphase II. (1) Sato et Blandau, Gamete Res., 1979 ; (2) Thibault, Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 1967 ; (3) Crozet, Gamete Res., 1989 ; (4) Plachot et al., Human Reprod., 1986 ; (5) Howlet et Bolton, J. Embryol. exp. Morph., 1985 ; (6) Plachot, communication personnelle.

Figure 1.25: Les stades de la fécondation et leur durée chez les mammifères.

appelée ZP3f. La nature de la modification, ainsi que son étendue restent à déterminer (Wassarman, 1990).

La ZP2 n'échappe pas à ces modifications; elle subit en effet une protéolyse au niveau des extrémités carboxyles terminales et aminées et devient ZP2f. La conversion de ZP2 en ZP2f provoque un durcissement de la pellucide, plus communément appelé "hardening de la pellucide". La protéolyse de ZP2 cause probablement un réarrangement structurel qui favorise les interactions entre les filaments glycoprotéiques, rendant ainsi le manteau extracellulaire beaucoup moins soluble (Wasserman, 1994).

Les changements de propriétés de la pellucide constituent un deuxième blocage de la polyspermie, le premier bloc intervenant au niveau de la membrane plasmique de l'ovocyte, suite au changement du potentiel membranaire.

Les granules corticaux sont composés de protéases et de glycoprotéases diverses assez mal connues. On assimile ces petits organites sous la membrane plasmique à des lysosomes. Un ovocyte de souris non fécondé peut contenir jusqu'à 4500 granules corticaux qui s'accumulent pendant la croissance de l'ovocyte (Wassarman, 1990).

III.9.4. Achèvement de la seconde division méïotique de l'ovocyte et expulsion du second globule polaire (Crozet, 1991)

L'ovocyte mûr, ou ovule, est arrêté en métaphase II de la méïose. Sous l'effet de l'activation due à la pénétration du spermatozoïde, il termine sa seconde division méïotique (figure 1.24), passe en anaphase, en télophase, puis se divise en deux cellules de taille inégales : l'oeuf et le deuxième globule polaire. Elles contiennent chacune la même quantité (n) d'ADN maternel. Cette division inégale a un intérêt : elle assure le maintien dans l'oeuf de la quasi totalité des molécules et informations stockées lors de la croissance de l'ovocyte et nécessaires au développement du jeune embryon.

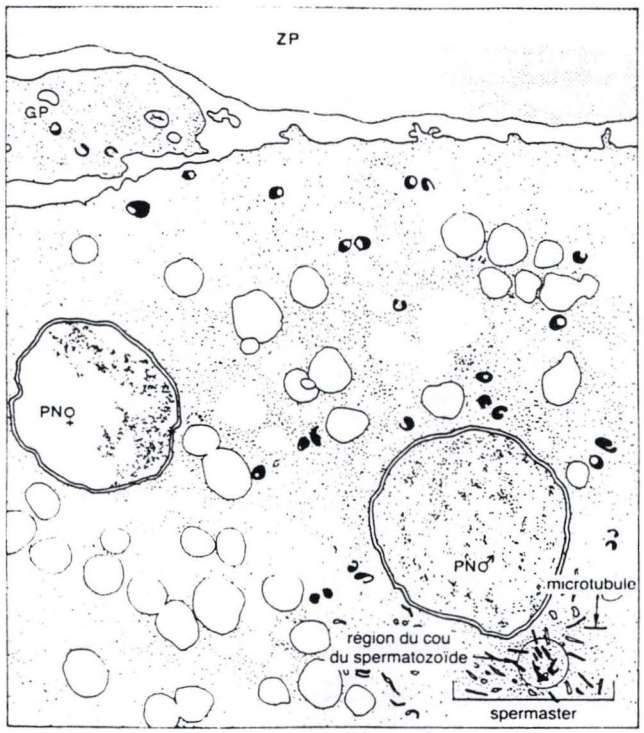
Les globules polaires n'ont chez le mouton, qu'une existence assez fugace. Peu de temps après leur formation (quelques heures), ils se lysent et leur matériel est réincorporé dans l'ovocyte (figure 1.25).

III.10. FORMATION, DEVELOPPEMENT ET MIGRATION DES PRONUCLEI

III.10.1. Décondensation du noyau des spermatozoïdes

Avant d'être transformé en un pronucleus mâle fécondant, le noyau du spermatozoïde doit subir un certain nombre de modifications :

- dissolution de son enveloppe nucléaire;



Pronoyaux (PN) mâle et femelle récemment formés dans le cortex d'un œuf de brebis (d'après cliché de microscopie électronique).

Figure 1.26: Formation des pronucléi.

- réduction des ponts disulfure des protéines associées à l'ADN;
- décondensation de la chromatine et remplacement des protamines (nucléoprotéines spécifiques des spermatozoïdes) par des histones de type somatique.

La dissolution de l'enveloppe nucléaire débute dès l'incorporation du spermatozoïde dans l'ovocyte (qui à ce moment est en M II), et est terminée deux heures post-insémination chez le mouton. La chromatine mâle entre donc directement en contact avec le cytoplasme ovocytaire (ooplasme) et se décondense durant la transition MII- télophase, alors que la chromatine femelle est encore fortement condensée. L'aptitude du cytoplasme à décondenser le noyau spermatique est liée à la présence de la vésicule germinale lors de la maturation (Meng et Armstrong, 1994).

Des études ont démontré que le gluthation présent dans les ovocytes mûrs sous sa forme réduite (GSH) favorise la réduction des ponts disulfure des protamines et joue ainsi un rôle dans la décondensation du noyau du spermatozoïde.

III.10.2. Formation et développement des pronuclei

Les pronuclei, mâle et femelle, se forment, côte à côte, dans la zone corticale de l'oeuf (figure 1.26). Une enveloppe nucléaire se forme autour de la chromatine mâle décondensée et autour des chromosomes femelles qui subsistent dans l'oeuf après la deuxième division méïotique. La chromatine femelle jusqu'alors également condensée, se décondense de manière progressive.

Le développement du pronucleus mâle est contrôlé par des facteurs cytoplasmiques comme le *male pronucleus growth factor* . Ce dernier n'est présent que dans les ovocytes dont la maturation cytoplasmique est complète. La synthèse d'ADN correspondant à la phase S du cycle cellulaire a lieu simultanément dans les deux pronuclei, mais ne commence cependant que lorsque ceux-ci sont complètement développés (Crozet, 1989).

III.10.3. Migration des pronuclei au centre de l'oeuf

Les pronuclei se rassemblent au centre de l'oeuf, sur le fuseau de la première division de segmentation. Des études montrent que les microfilaments et les microtubules sont impliqués dans cette migration. Les microtubules ont des structures dynamiques qui déplacent les pronucléi par polymériстations-dépolymérisations successives. Les drogues inhibitrices de leurs polymérisation (Nocodazole, Colchicine) ou de leurs dépolymérisation (Taxol) empêchent la migration des pronuclei vers le centre de l'oeuf. Les microtubules se polymérisent à partir des centrosomes, dont l'origine et l'organisation microtubulaire qui en découle varie selon les espèces.

On remarque également que, lors de la migration des pronuclei, la duplication de l'ADN de ceux-ci est déjà entamée.

III.11. ETABLISSEMENT DU FUSEAU DE PREMIERE DIVISION

L'oeuf est à ce stade une cellule binuclée, qui compte le nombre normal de chromosomes de l'espèce. Le cycle de division cellulaire peut commencer. Chaque division débute par une duplication des chromosomes qui commence dès que les pronuclei sont développés et est initiée simultanément dans les deux noyaux. A la fin de la réplication de l'ADN, les chromosomes paternels et maternels se condensent dans les pronoyaux en opposition. Chez les mammifères, ces derniers ne fusionnent pas, mais les enveloppes nucléaires deviennent étroitement jointives. Après la rupture de ces enveloppes, les chromosomes viennent s'aligner sur le fuseau de division mitotique qui se forme à partir des microtubules et centrosomes déjà présents dans cette région cytoplasmique. La fusion des deux génomes ne se fait qu'à ce stade, puis la première mitose se déroule de manière classique et permet la formation de deux blastomères. Un nouvel embryon est né.

CHAPITRE VI: DEVELOPPEMENT PRECOCE DE L'EMBRYON

IV.1. CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES DU DEVELOPPEMENT PRECOCE DE L'EMBRYON

Le début de la période embryonnaire, marqué par la fécondation, est caractérisé par une succession de divisions cellulaires et par l'apparition des premières différenciations.

La première division en deux blastomères identiques de l'embryon intervient, quelle que soit l'espèce, entre 11 et 20 heures après la fécondation. La seconde division (début du stade 4) est légèrement asynchrone et se traduit par l'apparition d'un stade trois cellules pendant une à deux heures environ. Jusqu'à la troisième division de segmentation, les divisions cellulaires sont symétriques, mais s'effectuent sans régularité dans l'orientation des plans de division. Au cours des divisions de segmentation, la taille des blastomères diminue.

Au stade 16-32 cellules, l'œuf acquiert l'aspect de mûre, d'où son nom de *morula*. La taille des blastomères continue à diminuer et ceux-ci s'associent par des jonctions membranaires spécialisées, ce qui fait que les limites cellulaires des blastomères deviennent moins discernables. La morula, qui compte alors 32 - 64 blastomères devient compactée.

Le stade 100 cellules est marqué par l'accumulation de liquide à l'intérieur de la morula, ce qui conduit à la formation d'une vésicule creuse: le *blastocyste*. C'est à ce stade qu'apparaissent les premières différenciations cellulaires. Le trophoblaste forme la couche de cellules à la surface de l'embryon, alors que la masse cellulaire interne sera à l'origine de l'embryon lui-même.

Lorsque le blastocyste atteint 400 cellules, il sort de sa zone pellucide (éclosion), augmente de taille, accélère ses divisions cellulaires et voit le volume de son blastocœle augmenter.

IV.2. DEVELOPPEMENT DE L'ŒUF: ASPECTS BIOCHIMIQUES ET MOLECULAIRES

Les processus métaboliques observés après l'activation de l'ovocyte provoquée par la pénétration du spermatozoïde peuvent être considérés comme la résultante de deux programmes de développement ("programme" désigne ici la succession d'événements dont la nature moléculaire est peu connue et qui permettent la réalisation de la segmentation de l'œuf, la différenciation cellulaire, tissulaire et organique.): celui mis en route pendant l'ovogenèse et celui qui s'initie au sein de l'embryon. Le passage d'un programme à l'autre défini une transition qui sépare le début du développement en une période dépendant des facteurs stockés dans l'ovocyte et constituant l'héritage maternel et en une autre période résultant de l'activité du nouveau génome provenant des deux génomes parentaux.

IV.2.1. Contribution des ARN_m maternels au début du développement

L'embryon dispose en son sein de tous les composants de l'appareil traductionnel, en quantité suffisante pour pouvoir réaliser les premières synthèses de polypeptides en l'absence d'activité propre. La plupart des transcrits destinés à devenir des ARN_m porteurs d'informations pour le développement sont polyadénylés. Ces ARN polyA représentent environ 10% de l'ARN de l'œuf et sont 40 fois plus nombreux que ceux d'une cellule différenciée tel le fibroblaste (Bachvarova *et al.*, 1985).

La teneur en ARN polyA de l'œuf de souris chute d'environ 50% au stade deux cellules et est due à une déadénylation et/ou une dégradation des molécules. Ces molécules ne sont pas toutes affectées de la même façon : les messagers de l'actine et de la tubuline subissent dès après la maturation de l'ovocyte un processus de déadénylation et sont dégradés dans l'heure qui suit la fécondation. Par contre, les messagers de certains enzymes sont dégradés plus tardivement au cours du stade deux cellules. Bien que la plupart des ARN polyA soient éliminés avant la mise en activité du génome embryonnaire, une petite fraction est toujours présente au moment ou se réalisent les premières différenciations au stade blastocyste. Cependant, les rôles que peuvent jouer ces ARN maternels dans le déroulement des premières étapes du développement ne sont pas encore compris.

L'œuf fécondé possède une importante activité de synthèse protéique résultant de l'utilisation des transcrits maternels (prouvée par sa mise en évidence dans des œufs activés parténogénétiquement, ou avec des œufs dont on a retiré les pronuclei par microchirurgie).

La plupart des polypeptides sont stables puisqu'il est encore possible de les déceler au stade 8 cellules, et au moins pour quelques-uns d'entre eux au stade morula ou blastocyste ; les autres étant rapidement dégradés lors de la mise en route du génome.

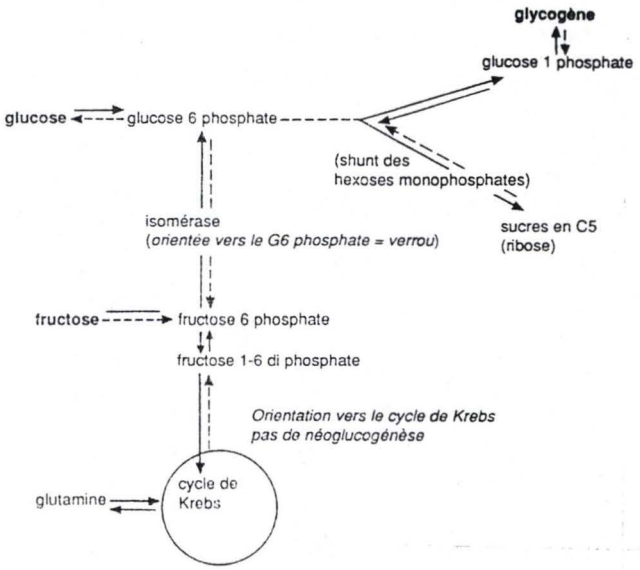


Figure 1.27: Métabolisme du glucose. Isomérase et blocage de l'oeuf fécondé

Bien qu'il soit possible de mettre clairement en évidence la présence de nombreux facteurs d'origine maternelle dans l'œuf, on ne dispose encore pratiquement d'aucune information sur le rôle spécifique que certains d'entre eux pourraient jouer dans le contrôle des premières étapes du développement.

IV.2.2. Mise en route du génome embryonnaire

La transition entre la période où le développement dépend exclusivement des molécules synthétisées au cours de l'ovogenèse et celle où le génome embryonnaire intervient activement, est caractérisée par une dégradation importante des ARN_m d'origine maternelle, par l'apparition d'une activité transcriptionnelle et par des modifications dans le profil de la synthèse protéique (Moor et Gandolfi, 1987). Cette transition se produit selon les mammifères à un stade plus ou moins avancé du début du développement. Elle s'effectue par exemple chez la souris en deux étapes au cours du stade deux cellules : la première est caractérisée par la néosynthèse d'un groupe de protéines de 70 kDa qui correspond aux protéines dites de choc thermique produites lors de la phase G1 du cycle cellulaire (les protéines de choc thermique proviennent de gènes très conservés au cours de l'évolution, qui sont activés à la suite d'un stress cellulaire non létal et permettent la reprise d'une activité génomique normal), et la seconde phase de l'activation du génome se produit environ huit heures plus tard avec la synthèse de plusieurs nouvelles protéines .

L'initiation de la première phase de l'activité transcriptionelle peut se produire en l'absence de réplication de l'ADN au cours du cycle précèdent et dépend étroitement du temps écoulé après l'activation de l'ovocyte. Elle met en jeu une succession de protéines kinases qui contrôlent l'accessibilité d'un facteur de transcription non spécifique permettant l'activité de la polymérase 2. La seconde phase de l'activation transcriptionelle du génome ne peut, contrairement à la première, se produire que si la réplication de l'ADN a bien eu lieu au cours du stade précédent. Elle correspond aux exigences métaboliques nouvelles de l'embryon.

IV.2.3. Le métabolisme énergétique

IV.2.3.1. Les sucres

Le métabolisme des sucres est à la base des fournitures énergétiques via la synthèse d'ATP. Le glucose, métabolite clé, est cependant toxique pour les tout premiers stades chez le hamster et la souris (il provoquerait l'arrêt du développement au stade 2 cellules). La toxicité de ce sucre est liée à l'accumulation de glycogène et amène à penser à un verrou métabolique au niveau de l'isomérase ou de la phosphofructokinase (figure 1.27). Si le fructose remplace le glucose, il n'y a plus d'arrêt du développement et plus de 50% des œufs donnent des blastocystes.

L'addition de pyruvate de sodium en concentration décroissante et de glucose en concentration croissante augmente le développement d'embryons de lapin *in vitro* (Abubaker *et al.*, 1994). L'arrêt du développement au stade 2 cellules chez la souris peut être ainsi imputé en partie à des variations dans l'activité des enzymes correspondants.

Le glucose peut être remplacé transitoirement par la glutamine. Celle-ci ne peut cependant pas remplacer le glucose du stade une cellule au stade blastocyste car le zygote est peu capable de néoglucogenèse. Elle ne peut assurer la progression des besoins métaboliques associés au métabolisme du glucose. Le fructose le peut puisque, du fait de l'orientation de l'activité isomérase, il permet aussi la formation de glucose-6-phosphate.

Les inhibiteurs de la glycolyse, du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative ont très rapidement un effet inhibiteur sévère sur la segmentation et la survie des embryons.

Les teneurs en NAD et ATP demeurent constantes jusqu'au stade blastocyste puis augmentent fortement. Le glucose (ou le fructose) devient rapidement indispensable (stade 4-8). La voie du shunt des hexoses monophosphates qui nécessite la disponibilité de glucose-6-phosphate est très importante pour la synthèse des sucres en C5 (riboses) et du matériel nucléaire. Ainsi l'omission du glucose dans les milieux de culture empêche "l'éclosion" *in vitro* des blastocystes de vache et de souris.

IV.2.3.2. Les lipides

Les besoins en lipides sont importants, surtout pour la synthèse de nouvelles membranes, par suite de la multiplication des cellules.

In vitro comme *in vivo*, les acides gras sont fournis sous une forme liée à l'albumine qui peut passer dans l'embryon. La fourniture de cholestérol exogène n'apparaît pas nécessaire; cependant, elle est réalisée de facto par addition d'albumine *in vitro* et par les lipoprotéines de haute et basse densité présentes dans les sécrétions de l'oviducte.

IV.2.3.3. Les protéines

L'embryon possède les systèmes de transport classiques des aminoacides. Avant la mise en route du génome, l'incorporation se fait grâce aux systèmes présents dans l'ovocyte qui en plus des transporteurs habituels, possède un transporteur de glycine spécifique. Cette observation est très importante du fait que la glycine représente l'acide aminé le plus concentré dans les sécrétions génitales. La glycine peut aussi être utilisée comme substrat recyclable par l'embryon de souris et entrer dans le cycle de Krebs. Ce système spécifique de transport disparaît au fur et à mesure que les transcrits maternels sont dégradés pour être totalement absent à l'éclosion du blastocyste.

Les acides aminés peuvent aussi être synthétisés par les voies classiques, notamment à partir du cycle de Krebs. Comme pour les sucres, certains acides aminés ont été décrits comme

stimulateurs (Gly, Cys, Lys), inhibiteurs (Phe, Val, Ile, Tyr, Trp, Arg) ou neutres (Pro, Ser, Thr, His, Ala, Leu, Asp, Met) pour le développement embryonnaire précoce (Moore et Bondioli, 1993). Cependant, quelle que soit l'espèce, ces acides aminés sont tous nécessaires au stade blastocyste et au moment de l'éclosion.

IV.2.4. Arrêt du développement embryonnaire in vitro

Chez la plupart des embryons cultivés *in vitro*, une phase de blocage cellulaire survient après une ou quelques mitoses suivant les espèces étudiées. Ce bloc cellulaire se produit au stade deux blastomères chez la souris et serait associé à l' activation du génome de l'embryon. Pour le mouton, ce blocage apparaît au stade 8-16 cellules (Gandolfi et Moor, 1987). Ce phénomène est dû aux conditions de culture *in vitro*. Il est irréversible mais n'est pas conséquent d'une mort de l'embryon. En effet, les embryons répondent toujours au colorant vital FDA et présentent le même profil de synthèse protéique que des embryons fraîchement récoltés.

La culture des embryons après fécondation, en présence d'α-amanitine (un inhibiteur de l'ARN polymérase II) provoque l'arrêt de la segmentation à ce stade dit de blocage. Ceci indique que dans les conditions de culture où se produit le bloc, le génome du zygote ne prend pas la relève. On attribue donc cet arrêt de développement à une chute des ARNm maternels en dessous d'un niveau seuil. Seule une activité transcriptionnelle du génome embryonnaire permet de lever ce blocage. Dans les conditions *in vitro*, c'est le retard ou la non mise en route de l'activité transcriptionnelle qui provoque cette chute au dessous du seuil critique. Comme le blocage se produit en phase G2/M, après la phase de synthèse, il est probable que ce sont les transcrits codant pour le processus de la mitose qui se trouvent à un niveau critique (MPF et cyclines). Ce retard serait lié à des conditions de culture défavorables ralentissant la machinerie biosynthétique.

L'inadéquation entre le métabolisme embryonnaire et les métabolites fournis dans les milieux de culture aboutit aussi à des déviations métaboliques responsables de l'arrêt du développement. Comme nous l'avons vu l'introduction de glucose par exemple se révèle toxique et provoque l'arrêt du développement de l'embryon de souris. Ce phénomène n'est pas observé in-vivo. Cependant, il est étonnant que l'on puisse lever ou éviter le blocage embryonnaire en omettant le glucose alors que l'oviducte et les sécrétions tubaires en contiennent.

Si des œufs de souris, de vache, de brebis ou de truie sont transférés dans un oviducte homo ou hétérospécifique (incubateur vivant) ou encore cultivés avec des cellules épithéliales du tractus génital en monocouche, le blocage ne se produit pas (First et Parrish, 1987; Gandolfi *et al.*, 1989; Gandolfi et Moor, 1987; Fukui *et al.*, 1988; Crozet, 1992; Minami *et al.*, 1994). La

culture des embryons en milieu conditionné par des cellules d'oviducte permet des résultats équivalents (Mermillod *et al.*, 1992).

La coculture ou la culture en milieu conditionné avec des cellules oviductales et l'omission de glucose dans le milieu de culture interviennent différemment pour permettre le passage du stade de blocage.

L'omission du glucose provoque probablement une déviation métabolique moins délétère évitant les blocages métaboliques.

L'effet exercé par les cellules de l'oviducte est encore discuté. Ces cellules synthétisent des composés spécifiques dont des protéines et glycoprotéines embryotrophiques (Long *et al.*, 1994; Hill, 1994), des facteurs de croissance comme de l'EGF (Epidermal Growth Factor), du PDGF (Platelet Derived Growth Factor), des IGF (Insulin-like Growth Factor) et des acides aminés (glycine et alanine) qui peuvent être utilisés par les embryons comme substrats énergétiques, comme régulateurs de pH ou pour les synthèses protéiques. Elles favoriseraient le développement embryonnaire en détoxifiant le milieu de culture par exemple en utilisant le glucose (Gandolfi *et al.*, 1988; Eyestone *et al.*, 1991).

Mais les études récentes montrent qu'une adaptation de la composition des milieux de culture au niveau de leur teneur en acides aminés (Pinyopummintr et Bavister, 1991; Moore et Bondioli, 1993; Aurich et Hahn, 1994) et la coculture avec d'autres types de cellules somatiques comme des cellules de foie de rats (Rehman *et al.*, 1994), des cellules de la granulosa ou des fibroblastes (Fukui *et al.*, 1988) permettent aussi le passage du bloc au stade 8 cellules et le développement embryonnaire. Cependant, la qualité (nombre de cellules dans la masse cellulaire interne et dans le trophectoderme) et la viabilité des embryons semblent altérées.

II semblerait donc que le blocage serait levé par les cellules somatiques via la réduction de la concentration de facteurs inhibant le développement embryonnaire dans le milieu de culture. Un apport de facteurs embryotrophiques (vitamines, facteurs de croissance...) serait nécessaire ensuite pour coordonner le développement du trophoblaste et du bouton embryonnaire. Cette approche est confortée par les résultats de développement embryonnaire de zygotes cultivés dans un milieu minimum (élimination des facteurs inhibiteurs) complémenté après le passage du bloc avec du sérum de femelle en œstrus (apport des facteurs stimulateurs).

IV.2.5. Synthèse de composés spécifiques par l'embryon

L'embryon est très tôt capable de synthèse de signaux susceptibles d'être reçus par l'organisme maternel. Ces molécules interfèrent avec le métabolisme et la motricité de l'oviducte et elles pourraient modifier la sécrétion ovarienne (facteurs précoces de gestation : EPF). Mais l'action des sécrétions embryonnaires ne se limite pas là.

En effet, il a été observé que des embryons cultivés *in vitro* en groupes présentent un développement jusqu'au stade blastocyste amélioré et un nombre de cellules plus élevé que des

embryons cultivés seuls. Ceci suggère la production par les embryons de facteurs de croissance agissant de façon autocrine/paracrine.

S'il est maintenant clair que les facteurs de croissance EGF, TGF-α et β, ainsi que l'IGF-II interviennent dans le développement précoce de l'embryon, leur rôle semble différent d'une espèce de mammifères à l'autre. De plus, il est fort probable que d'autres facteurs agissant aussi de façon autocrine/paracrine sont impliqués (Kato et Tsunoda, 1994; Keefer *et al.*, 1994).

CHAPITRE V: L'HORMONE DE CROISSANCE (GH)

V.1. INTRODUCTION

C'est en 1921 déjà qu'Evans et Long découvraient des substances promouvant la croissance dans une émulsion du lobe antérieur de l'hypophyse chez le rat. En 1945, une hormone de croissance d'origine bovine fut pour la première fois isolée par Li et Evans, et actuellement, les hormones de croissance (GH) sont reconnues comme des hormones pléiotropes exerçant des effets de facteurs de croissance et de différenciation et agissant comme d'importants régulateurs métaboliques (Paladini *et al.*, 1983).

On connaît à l'heure actuelle les principales fonctions des GH, mais leurs modes d'actions sont moins bien connus parce que les effets des GH sont tellement variés qu'il est difficile d'exprimer une théorie unique pour les différentes espèces animales.

V.2. LOCALISATION

La GH est une protéine principalement synthétisée et sécrétée par les cellules de l'hypophyse antérieure. Elle est exprimée à partir du gène GH-N localisé dans les cellules somatotropes de l'adénohypophyse. Dans une moindre mesure, les cellules somatomammotropes de l'adénohypophyse bovine sécrètent également de la GH parallèlement à de la prolactine (Kineman *et al.*,1991). Il existe également une deuxième forme de GH exprimée à partir du gène GH-V placentaire, mais ce type d'hormone de croissance n'est exprimé que durant la gestation et nous n'en parlerons pas, volontairement car il n'intervient nullement dans nos expériences.

Chez le mouton, la GH est présente dès le 50 ^{ème} jour après la fécondation dans l'hypophyse foetale.

V.3. STRUCTURE

Tous les membres de la famille des GH sont des protéines formées par une simple chaîne polypeptidique d'environ 200 acides aminés avec 2 ou 3 ponts disulfures intrachaînes et

des extrémités N- et C- terminales libres. Chez l'homme, le poids moléculaire est d'environ 22 kDa; celui-ci est de 48 kDa chez le mouton et 45 kDa chez le bovin (Kelly *et al.*, 1993). La comparaison des séquences hormonales entre les différentes espèces montre que les GH bovine, équine et porcine présentent 65% d'homologie, de même que la GH, la PL (Placental Lactogen), et la PRL (Prolactin) possèdent des régions à forte homologie suggérant ainsi qu'elles forment une famille d'hormones polypeptidiques provenant de la duplication d'un gène ancestral commun. Il est même fréquent d'observer au sein d'une même espèce une hétérogénéité de GH soit lors de son extraction, soit lors de sa mesure dans les fluides biologiques.

Cette multiplicité de forme pourrait être due à:

- des chemins post-transcriptionnels multiples; en effet, chez l'homme, la forme secondaire GH-N provient d'un épissage alternatif de l'ARN_m conduisant à une GH de 20kDa; derechef pour la forme tertiaire, provenant de l'épissage de l'exon 3 conduisant à une GH de 17,5 kDa. Les autres formes minoritaires de GH sont nommées "acidic GH".
- des modifications post-transcriptionnelles comme la déamination, l'acylation, la glycosylation, l'oligomérisation,...
- la fixation sur deux protéines de liaison (Bauman, 1991).

V.4. MODES D'ACTION

V.4.1. Récepteur

Le récepteur de la GH est présent dans de nombreux tissus et cellules, à l'exeption de certains organes tels que la prostate où l'expression de l'ARN_m est pratiquement indécelable. Les cellules ayant le niveau d'expression le plus élevé sont les hépatocytes et les adipocytes.

Le récepteur est structurellement apparenté à ceux de la prolactine et des cytokines, c'est-à-dire à la famille des récepteurs hématopoïétiques. Ces récepteurs ont en commun une région cytoplasmique variable, une région extracellulaire plus conservée et une seule région transmembranaire hydrophobe (Kelly *et al.*, 1993).

Chez l'homme, la région extracellulaire qui lie l'hormone comporte environ 250 acides aminés, avec plusieurs résidus cystéine pouvant former des ponts disulfures. La région cytoplasmique du récepteur couvre environ 350 acides aminés et contient 10 résidus tyrosine susceptibles d'être phosphorylés. De plus, cette région possède des domaines fonctionnellement distincts qui sont couplés aux différentes réponses biologiques induites par la GH (Le Cam, 1993).

Chez le mouton, le récepteur membranaire hépatique de la GH comprend un domaine extracellulaire de 242 acides aminés, une région transmembranaire hydrophobe de 24 acides

aminés et un domaine cytoplasmique de 350 acides aminés. Ce récepteur apparaît au 145ème jour de gestation, pour atteindre un maximum une semaine après la naissance (Adams *et al.*, 1990). Ces récepteurs sont exprimés au niveau de l'ovaire uniquement dans les grandes cellules lutéales du corps jaune et dans les follicules de diamètre supérieur à 5 mm, bien que leurs ARN_m soit présent dans l'ovaire tout entier (stroma, follicules, corps jaunes...; Lucy *et al.*, 1993).

V.4.2. Complexe hormone-récepteur

Comme pour les autres hormones polypeptidiques, la première étape de l'action biologique de la GH est sa liaison à son récepteur membranaire. Des études ont montré qu'une molécule de GH se lie à deux molécules de GH-BP (GH binding protein), suggérant ainsi que la dimérisation du récepteur est importante pour son internalisation et pour la transmission du message hormonal.

Dans le processus d'internalisation, le complexe hormone-récepteur n'est pas complètement dissocié par le milieu acide du lysosome. Dans l'adipocyte, 75% de ces complexes internalisés sont dégradés dans le lysosome, les 25% restant étant relâchés dans le milieu extracellulaire, permettant ainsi le recyclage du récepteur. Le rôle de ces processus d'internalisation et de recyclage dans la transmission du signal reste hypothétique (Roupas et Herington, 1989).

V.4.3. Voies de signalisation

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

- Voie des phosphorylations en cascade : la GH est liée à son récepteur qui est associé à une tyrosine kinase -, JAK2, activée par le complexe hormone-récepteur et qui, suite à cette activation, phosphoryle le récepteur. JAK2 phosphoryle également les MAP kinases, qui font partie des protéines kinases intracellulaires (comme la S6 kinase), impliquées dans les voies de signalisation de nombreux facteurs mitogéniques et de différentiation (Ullrich et Schlessinger, 1990). L'activation de gènes (IGF-I...) et l'augmentation de la synthèse protéique découlant de la réponse à la GH résultent de cette cascade de kinases, conduisant entre autres, à la phosphorylation de la protéine ribosomiale S6 qui est une étape clé de la synthèse protéique (Le Cam et Legraverend, 1993).

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

V.4.4. Régulation des récepteurs de la GH

La régulation des récepteurs à la GH est spécifique à chaque tissu et est provoquée par la GH elle-même. En effet, chez le rat hypophysectomisé (perte de la production de GH), on remarque une augmentation du taux d'ARN_m du récepteur de GH dans les muscles et les hépatocytes, mais on constate une diminution de ceux-ci pour les adipocytes (Kelly *et al.*, 1993 ; Le Cam et Legraverend, 1993).

Cette régulation est également influencée par une exposition continue ou intermittente à de la GH exogène (administrée *in vivo*). Au niveau du foie, une exposition chronique à la GH a pour effet d'augmenter le nombre de ces récepteurs ; par contre, une simple administration de GH à des brebis hypophysectomisés diminue le nombre de récepteurs (Maiter *et al.*,1988). Il a également été mis en évidence que l'oestradiol augmente le nombre de récepteurs au niveau du foie.

V.4.5. Régulation de l'expression génique par la GH

La liaison de la GH à son récepteur déclenche des signaux intracellulaires qui se propagent, au moins en partie, jusqu'au noyau où ils modulent l'expression génique. Cette modulation peut concerner les gènes les plus divers tels que ceux de l'Insuline, de l'IGF-I, de la Somatostatine, de la Prolactine-R, du Collagène,...

V.5. CONTROLE DE LA SECRETION

Le contrôle de la sécrétion de GH peut se faire soit par les hormones hypothalamiques soit par d'autre substances ou facteurs régulateurs.

Lors du contrôle par les hormones hypothalamiques, la libération de GH est réalisée principalement par deux peptides, la *somatostatine* (SS) qui inhibe et *la GH-releasing hormone* (GRH) qui stimule cette sécrétion.

La GRH est sécrétée de façon épisodique et inverse par rapport à la SS. Une rapide diminution de la sécrétion ou de l'action de la SS semble être l'événement primaire induisant la sécrétion épisodique de GRH accompagnée d'une réduction de la libération de SS dans le système porte hypophysaire (Page *et al.*,1989).

Actuellement, il a été montré chez le rat que la GRH agit directement sur l'expression du gène codant pour la GH après liaison à son récepteur sur les cellules somatotropes. La liaison de l'hormone à son site spécifique induit une activation du système membranaire associé à ce site. La protéine G couplée au récepteur membranaire se voit ainsi activée, et sa sous-unité catalytique α se détache de cette dernière et migre vers l'adénylate cyclase pour l'activer après fixation. La voie de l'AMP_c est ainsi activée. La protéine kinase dépendante de l'AMP_c active alors les facteurs de transcription CREB participant à la transcription du gène codant pour la GH. Ce type d'activation membranaire par la GRH est également responsable de la sécrétion épisodique de GH.

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

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

D'autres substances et facteurs régulateurs interviennent aussi dans le contrôle de l'émission de GH. Il s'agit de facteurs métaboliques, hormonaux ou neurogéniques.

L'insuline, la prolactine, les opioïdes, le glucagon et les androgènes, sont des facteurs qui stimulent la sécrétion de GH (Wright, 1980).

Une concentration plasmatique élevée en arginine stimule également la sécrétion de GH (Wright, 1980).

Les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes stimulent la sécrétion de GH en augmentant l'ARNm.

L'oestradiol augmente les niveaux plasmatiques de GH en inhibant les sécrétions hypophysaires de SS et les sécrétions tissulaires d'IGF-I (Christman et Halme, 1992)

Le jeûne provoque une augmentation de la concentration en GH (Wright, 1980).

Les facteurs stressants et l'obscurité (par l'intermédiaire de la mélatonine) sont d'autres facteurs favorables à la synthèse accrue de GH (Wright, 1980).

Par contre, la Prolactin-Inhibiting-Hormone, l'angiotensine, la progestérone et une concentration plasmatique élevée en glucose sont des facteurs inhibiteurs de cette sécrétion.

Les acides gras, en stimulant la sécrétion de SS hypophysaire, ont un effet inhibiteur de la sécrétion de GH (caractérisé par une diminution de la fréquence des pulses).

Les IGF-I et IGF-II diminuent la sécrétion de GH en inhibant l'action de GRH sur les cellules somatotropes et en stimulant la décharge hypophysaire de SS.

V.6. PROTEINES DE LIAISON

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

- elles augmentent le temps de demi-vie de la GH (qui varie de 17 à 45 minutes selon les espèces) et abaissent sa vitesse de dégradation et d'élimination;
- Restreignent les mouvements de la GH notamment au niveau de la filtration glomérulaire où la GH et sa protéine de liaison échappent à la filtration et se voient ainsi protégées dans leurs principal site de dégradation;
- Et interviennent au moment de la liaison de l'hormone à son récepteur (Bauman, 1991). Suite à cette liaison, la BP empêcherait l'internalisation du complexe hormone-récepteur et par le même fait, sa dégradation intracellulaire.

Chez l'homme, la vache et le lapin, la GH-BP est produite par coupure protéolytique de la partie extracellulaire du récepteur de la GH (en effet, on retrouve un ARNm de 4,5 kDa codant pour le récepteur et pas d'ARNm codant pour la GH-BP). En revanche, chez le mouton, le rat et la souris, une GH-BP de même type existe qui est codée par un ARNm produit par épissage alternatif du transcrit du gène du récepteur. Il y a donc ici deux ARNm de 4,5 et 1,5 kDa codant respectivement pour le récepteur membranaire et pour la GH-BP.

Dans les deux cas, la GH-BP correspond à la partie extracellulaire additionnée d'un peptide hydrophile qui remplace les parties transmembranaires et intracellulaires du récepteur (Smith *et al.*, 1989; Adams *et al.*, 1990; Wells *et al.*, 1993).

V.7. EFFETS

L'hormone de croissance nommée ainsi du fait qu'elle est indispensable à la croissance harmonieuse de l'organisme, et notamment du squelette peut, en plus de son action sur le développement de l'organisme, avoir de nombreux effets métaboliques ainsi qu'un effet sur l'activité de divers organes. La GH peut agir directement sur l'organe ou le tissus cible pour provoquer ses effets propres, mais dans de nombreuses parties de l'organisme (placenta, cartilages, muscles squelettiques..) les actions de l'hormone sont dues aux IGF. La GH peut donc avoir des effets indirects médiés par les IGF qui agissent alors de façon endocrine ou paracrine sur le tissu cible:

Développement de l'organisme: la GH agirait au niveau des os, en collaboration avec l'IGF-I pour stimuler la croissance linéaire ; de ce fait, la GH en agissant directement au niveau de la plaque épiphysaire stimule la différenciation des préchondrocytes en chondrocytes qui sécrètent alors de l'IGF-I. Ce dernier stimule l'expression clonale et la maturation des chondrocytes. Accessoirement, la GH augmente aussi l'activité des ostéoblastes et de la même, l'ossification (synthèse de collagène et de glycoprotéines ; Paquay, 1989). Dans le foie, la GH augmente le volume des cellules et y active la synthèse des acides nucléiques et des protéines. Le développement des masses musculaires est peut être l'action la plus efficace de la GH, principalement par stimulation de la synthèse protéique. La GH pourrait, en collaboration avec d'autres hormones, également être impliquée dans le développement des organes sexuels et des glandes mammaires et donc dans le processus de puberté.

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

Métabolisme des graisses et des hydrates de carbone: les effets de la GH sont insulino-semblables dans les tissus n'ayant pas été préexposés à l'hormone et sont inversés après exposition à celle-ci. Ainsi, l'hormone stimule le transport de *glucose* et la synthèse protéique dans le cœur et le muscle de moutons hypophysectomisés mais ces tissus deviennent ensuite totalement résistants à son action. De la même manière, la GH qui active la lipogenèse des adipocytes de rats préalablement incubés sans GH réduit l'utilisation du glucose et augmente la lipolyse des cellules pré-traitées par l'hormone durant 48 heures (Smal et De Meyts, 1989). Toutefois, cet effet est sélectif car d'une part, aucune autre hormone (insuline ou glucocorticoïdes) ne rend ces tissus réfractaires à leurs propres actions ni à celle de la GH, et d'autre part, la GH ne crée cet état réfractaire que vis à vis d'elle même et pas vis-à-vis des autre

hormones. Sur le *tissu adipeux*, la GH exerce un effet lipolytique avec libération dans le plasma d'acides gras non estérifiés ainsi qu'une augmentation de la cétogenèse. Ces effets s'observent lors d'hypoglycémie, d'inanition ou de malnutrition sévère, suggérant ainsi que cette hormone permettrait un ajustement calorique en mobilisant les graisses. En fonction des circonstances alimentaires, les effets de la GH sur les métabolismes glucidiques et lipidiques varient : si les apports alimentaires sont insuffisants, le maintien de la glycémie avec libération des lipides de réserve est prioritaire. Par contre, si les apports alimentaires sont importants, les dépôts de substances corporelles sont favorisés (glycogène, matières grasses ; Paquay, 1989). L'hormone de croissance influence donc le métabolisme lipidique, glucidique et protéique à travers des effets opposés qui, paradoxalement peuvent s'exercer sur un même tissu.

Activité de divers organes: la GH a un effet bénéfique sur l'activité de divers organes; elle intervient avec d'autres hormones dans les mécanismes de la lactogenèse, et de la galactogenèse (Plaut *et al.*, 1993). Elle augmente ainsi la production laitière notamment en stimulant le comportement alimentaire, en augmentant le débit sanguin et en agissant sur la répartition préférentielle des nutriments dans la glande mammaire (Delouis et Richard, 1991). Dans le rein, la GH favorise le développement des néphrons et permet l'hypertrophie du rein restant en cas de néphrectomie unilatérale, elle augmente le débit sanguin rénal, le débit de filtration glomérulaire et la réabsorption de substances tel que glucose, les sulfates, les phosphates... dans les tubes rénaux (Paquay, 1989).

Interaction avec l'insuline (Wright, 1990): l'insuline stimule la sécrétion de GH et la glycémie est le facteur le plus important du contrôle de sa sécrétion. La sécrétion de GH par l'hypophyse est stimulée par l'hypoglycémie, celle de l'insuline l'est par l'hyperglycémie et aussi par l'augmentation de l'acétonémie. Ainsi, l'effet d'une hormone aboutit à favoriser la sécrétion de l'autre. Aussitôt après un apport de glucides par voie digestive, on observe une hyperglycémie, une augmentation de la sécrétion d'insuline et une diminution de la sécrétion d'hormone de croissance. A elle seule, l'insuline peut donc faciliter le stockage des glucides et des lipides. Quelques heures plus tard, quand la glycémie est redevenue à son niveau normal, la GH et l'insuline sont toutes deux présentes à des concentrations pour lesquelles elles facilitent l'anabolisme protéique sans mobiliser les graisses. Plus tard, si le sujet reste encore à jeun la concentration d'insuline diminue et celle de GH augmente. La GH reste alors seule à agir et stimule la mobilisation des graisses et la libération d'acides gras disponibles pour l'oxydation, diminuant en même temps l'utilisation du glucose.

Activité ovarienne: il est actuellement prouvé que la GH est une hormone supplémentaire impliquée dans les mécanismes de régulation du développement folliculaire. Ses effets se réalisent soit par action directe sur l'ovaire, soit via libération accrue d'IGF dans le sang. Ce dernier agit alors de façon endocrine sur l'ovaire. La concentration en IGF-I dans le

fluide folliculaire peut être influencée par la GH. En effet, les expériences de Barecca et collaborateurs (1990) ont montré qu'un traitement de GH administré *in vivo* et utilisé à des fins de superovulation chez la femme et la brebis augmente la concentration en IGF-I dans le fluide folliculaire, dirigeant ainsi la croissance et la maturation folliculaire. L'hormone de croissance agit en collaboration avec la FSH humaine sur la production d'oestrogènes par les cellules de la granulosa (Lippe et Nakamoto, 1993) et la formation du récepteur à la LH dans les cellules granulosales de rat. De plus, la GH permet à elle seule d'augmenter le taux de progestérone dans les cultures de cellules lutéales humaines et ovines (Mason *et al.*,1990; Lanzone *et al.*, 1992; Juengel *et al.*,1994). La croissance folliculaire peut également être influencée par la GH; lorsque celle-ci est injectée quotidiennement à des brebis, elle modifie le recrutement folliculaire en augmentant le nombre de follicules (Perrad *et al..*,1997). Cette action sur la croissance folliculaire est liée à une augmentation de la concentration périphérique en IGF-I et en insuline. La dynamique de croissance folliculaire et le nombre de vagues de croissance folliculaire ne sont pas affectés par le traitement (Gong *et al.*, 1993). Chez la brebis, l'augmentation du nombre de follicules recrutés suite à un traitement à la GH peut s'expliquer, en plus d'une augmentation des concentrations périphériques en IGF-I, par une augmentation de la sensibilité des follicules face aux hormones gonadotropes (Christman et Halme, 1992).

SECONDE PARTIE:

OBJECTIFS POURSUIVIS

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE I: OBJECTIFS POURSUIVIS

Les données bibliographiques et des expériences effectuées au laboratoire de Physiologie Animale des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix de Namur montrent que l'hormone de croissance (GH) influence le fonctionnement du système reproducteur chez diverses espèces et notamment chez le mouton.

Au laboratoire, il a été observé que l'administration de GH recombinante bovine (rbGH) à des brebis se trouvant dans des états physiologiques variables (cycle oestral, anoestrus saisonnier) influence favorablement les croissances folliculaires terminales et les taux d'ovulation. De plus, ce traitement modifie les sécrétions hormonales dans le sens d'une augmentation de l'émission d'insuline et d'IGF-I et d'une diminution de la FSH.

Afin d'approfondir nos connaissances relatives aux effets et au mode d'action de l'hormone de croissance chez la brebis, nous avons étudié l'influence de la rbGH sur les performances de reproduction des brebis, sur la maturation ovocytaire, sur la fécondation et sur le développement embryonnaire.

Pour répondre à l'objectif fixé, nous avons programmé deux expériences. La première est consacrée à la détermination des conséquences d'une administration de rbGH *in vivo* sur les performances de reproduction des brebis en début et milieu de saisons de reproduction. La seconde a pour but de déterminer les conséquences d'un apport *in vitro* de rbGH sur la maturation et la fécondation ovocytaire ainsi que sur le clivage embryonnaire.

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

II.1. PREMIERE EXPERIENCE : EFFETS DE LA RBGH ADMINISTREE *IN VIVO* SUR LES PERFORMANCES DE REPRODUCTION DES BREBIS

II.1.1. Objectifs

Les effets de l'hormone de croissance sur les performances des brebis ont été déterminés après avoir administré quotidiennement de la rbGH durant le cycle oestral et/ou durant les premières semaines de gestation chez des brebis se trouvant dans des états physiologiques différents (début et milieu de saison de reproduction).

En début de saison, nous avons déterminé les effets du traitement durant le cycle oestral sur le taux d'ovulation, la viabilité foetale, la fertilité et la prolificité. En milieu de saison, les effets de l'administration durant le cycle oestral mais également durant les premières semaines de gestation ont été mesurés sur la viabilité foetale, la fertilité et la prolificité.

L'expérience débute en juillet 1996 pour se terminer en juin 1997 et porte sur 136 brebis de race Suffolk pure, ou croisée F1 avec la race Frison laitier.

II.1.2. Conditions expérimentales

Les brebis utilisées pour Cette expérience font partie du troupeau du Centre de Recherches Ovines de Faulx-les-Tombes (C.R.O.). Selon le moment de l'année et les nécessités expérimentales, les animaux sont laissés en prairie ou placés en bergerie avec des rations alimentaires adaptées à leurs besoins.

Toutes les manipulations *in vivo* (injections quotidiennes, endoscopies, échographies et agnelages) sont effectuées au C.R.O. .

	Début de saison 1996/1997	*Milieu de saison 1996/1997*
1ère injection de PGF2	Mar 23 juillet	Mar 15 octobre
2ème injection de PGF2	Ven 2 août	Ven 25 octobre
Injection de rbGH (cycle oestral)	Lun 5 août - Mer 21 août	Lun 28 octobre - Ven 15 novembre
Saillies	Lun 19 août - Ven 23 août	Lun 11 novembre - Ven 15 novembre
Injection rbGH (gestation)	/	Ven 15 novembre - Sam 30 novembre
Endoscopies	A partir du Mar 27 août	A partir du Mar 19 novembre
Echographies	Mar 8 octobre	A partir du Ven 27 décembre
Parturitions	A partir du mois de janvier 1997	A partir du mois d'avril 1997

Tableau 2.1: *Calendrier expérimental suivi en début et milieu de saison de reproduction.*

II.1.3. Protocoles expérimentaux

Les protocoles expérimentaux suivis en début et milieu de saison de reproduction sont résumés ci-dessous et le calendrier expérimental est repris dans le tableau 2.1. Signalons que, quelle que soit la saison étudiée, il est nécessaire que toutes les brebis soient au même stade du cycle. Ceci est réalisé en synchronisant les cycles par le recours à la prostaglandine F2α. Les différentes étapes programmées lors des deux saisons sont:

Jour 1: première injection de PGF2α à toutes les brebis;

Jour 11: seconde injection de PGF2α à toute les brebis;

Jours 15 - 31 (soit jours 1 à 17 du cycle oestral): injection de 6 mg de rbGH aux brebis constituant le lot traité;

Jours 30 - 35 (soit 1 jour avant et 4 jours après l'oestrus): fécondation naturelle des brebis;

En milieu de saison de reproduction uniquement :

Jours 31 - 46 (soit en début de gestation) : injection quotidienne de 6 mg de rbGH à 42 brebis;

En début de saison uniquement :

Jours 40 - 43: endoscopie des brebis ;

Jour 72: échographie des brebis afin de déterminer le taux de fertilité et d'évaluer le nombre de fœtus;

Jour 180: relevé des agnelages.

L'essai portant sur le début de saison de reproduction commence en juillet 1996 avec 47 brebis Suffolk ou croisées Suffolk/Laitier. Parmi ces brebis, 24 constituent le lot témoin et les 23 autres le lot traité à la rbGH. Les brebis du lot traité reçoivent quotidiennement une injection de 6 mg de rbGH durant 17 jours, soit la durée du cycle œstral. Après 21 jours (soit 4 jours après l'œstrus), toutes les brebis sont endoscopiées. Au jour 72 de l'expérience (soit 42 jours après la mise à la lutte), l'échographie renseigne sur le nombre de fœtus portés par les brebis (figure 2.1).

L'essai portant sur le milieu de saison de reproduction commence en octobre 1996 avec 89 brebis Suffolk ou croisées Suffolk/Laitier. Parmi celles-ci, 47 brebis constituent le lot témoin et 42 autres le lot traité à la rbGH. Les animaux traités reçoivent quotidiennement une injection intramusculaire de 6 mg de rbGH depuis le jour 15 jusqu'à leur fécondation naturelle. Après les fécondations naturelles, chaque lot est divisé en deux groupes et, dans chacun des lots, les brebis d'un des deux groupes reçoivent pendant une période de 30 jours une injection quotidienne de même importance. Les brebis ne sont pas endoscopiées pour éviter de perturber le début de la gestation; elle sont cependant échographiées (figure 2.2).

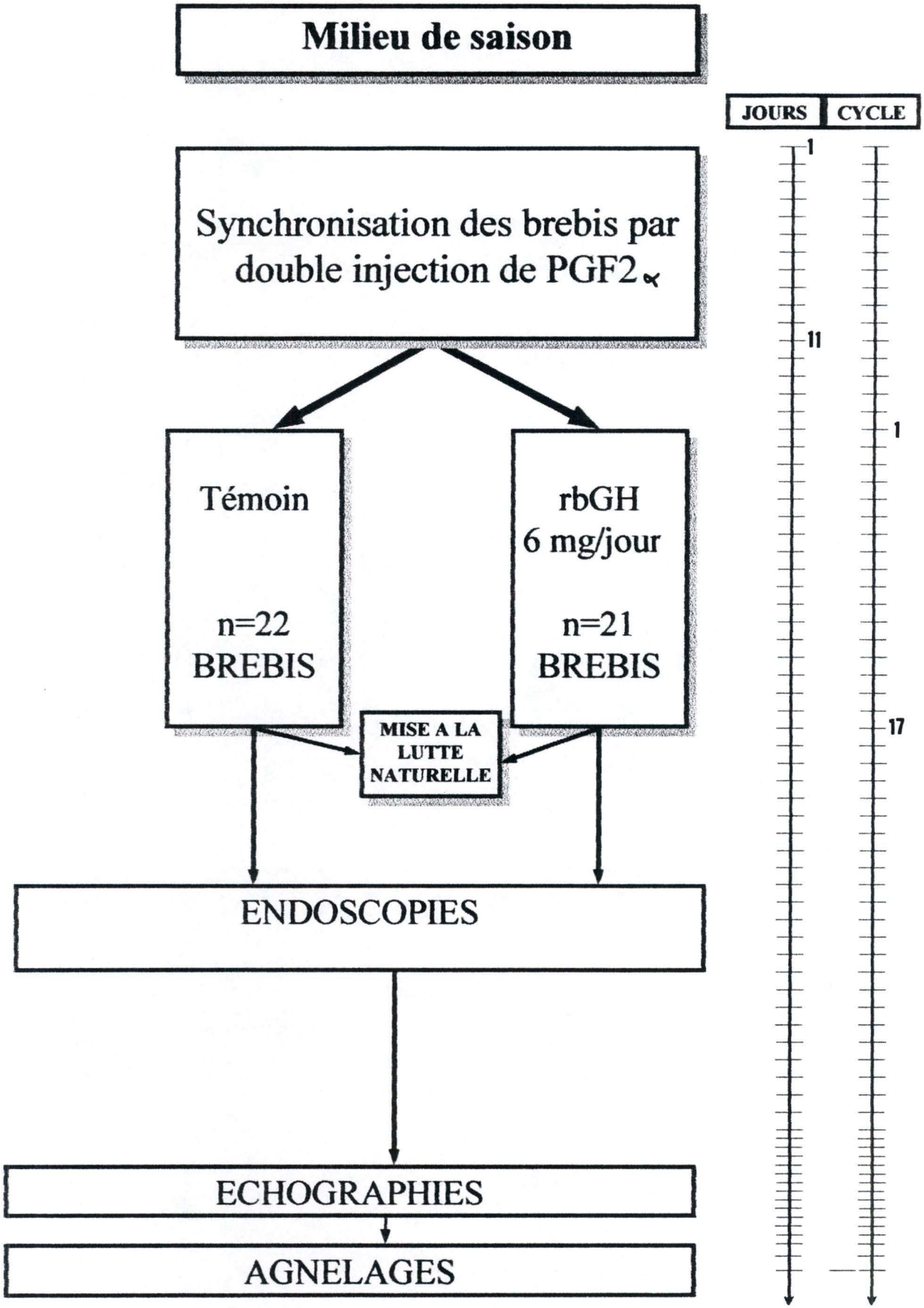


Figure 2.1: Résumé du protocole expérimental appliqué en début de saison de reproduction

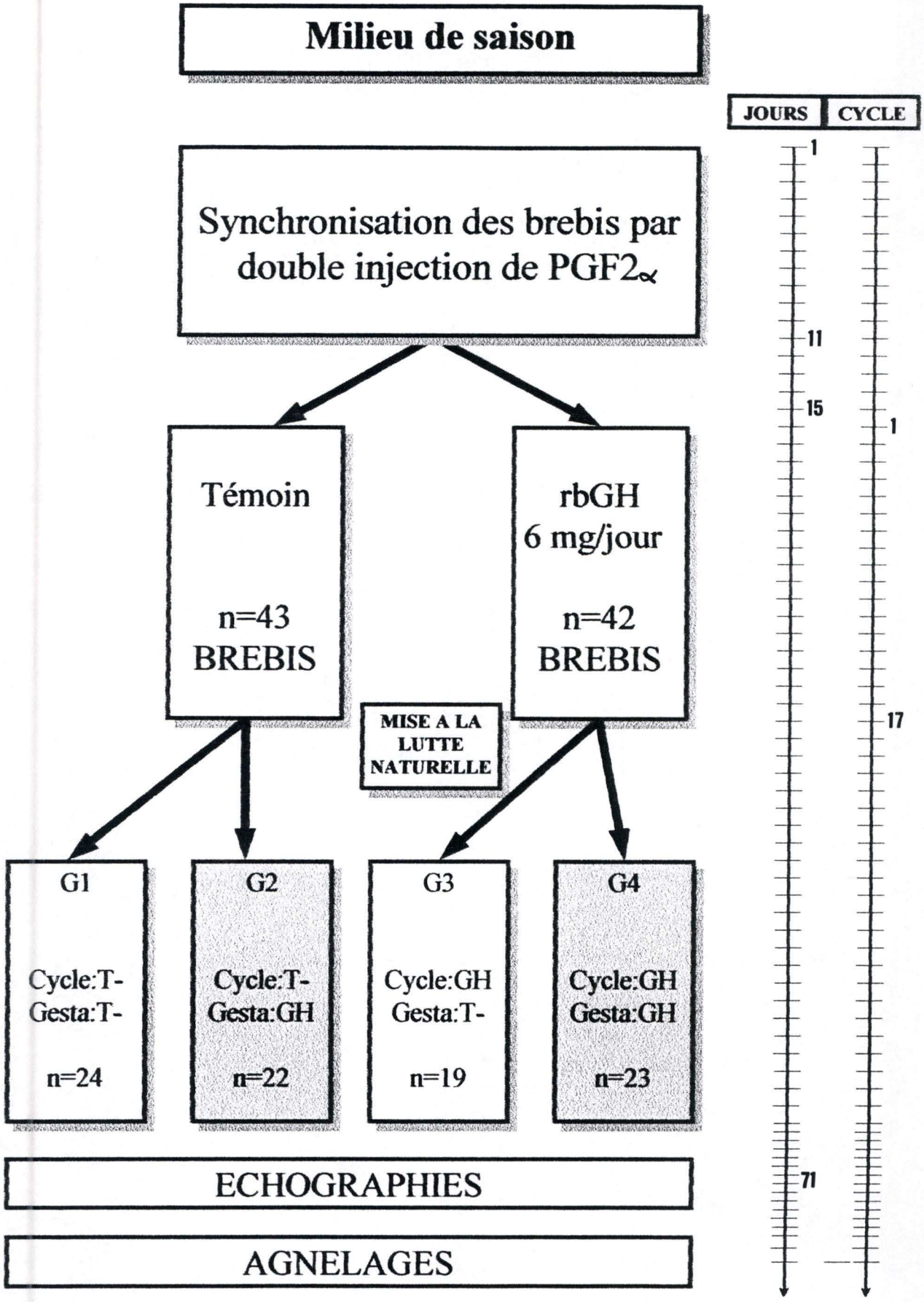


Figure 2.2: Résumé du protocole expérimental appliqué en milieu de saison de reproduction

II.1.4. Méthodes

II.1.4.1. Synchronisation des cycles

La synchronisation des cycles est, comme précisé dans les plans expérimentaux, réalisée par le recours à une prostaglandine, le cloprosténol, dérivé de la synthèse de la PGF2α commercialisé sous le nom d'Estrumate® par la firme Coopers. Elle est injectée par voie intramusculaire et deux injections à 11 jours d'intervalle sont nécessaires pour parfaire l'efficacité du traitement.

L'Estrumate® est un agent lutéolytique puissant qui provoque très rapidement la régression fonctionnelle et morphologique du corps jaune. L'œstrus réapparaît normalement deux à quatre jours après le traitement. Il est suivi d'une ovulation normale et de la formation d'un nouveau corps jaune.

II.1.4.2. Traitement à la rbGH

Pour les besoins de nos expériences, nous avons eu recours à l'injection quotidienne et intramusculaire de 6 mg de rbGH (Eli Lilly, Indianapolis; lots n°015B143 et 015BM3) aux brebis des lots traités. L'injection se fait toujours en début de matinée afin d'éviter d'introduire dans nos expériences de nouvelles variables. La rbGH est dissoute dans une solution physiologique de NaCl 0.9% afin d'obtenir une concentration de 1 mg/ml. La solution est répartie par doses de 6 ml et stockée à 4°C jusqu'au moment de l'injection.

II.1.4.3. Endoscopie

Afin de déterminer l'effet de la rbGH sur le taux d'ovulation, nous avons eu recours aux endoscopies.

L'endoscopie est l'examen d'un organe interne à l'aide d'une sonde optique. L'ovaire est un organe aisé à observer via cette technique, mais il faut une pratique fréquente afin de pouvoir interpréter correctement les résultats.

Le déroulement pratique se déroule comme suit : la brebis est placée sur une table inclinable; elle est immobilisée en décubitus dorsal et l'arrière train est soulevé un peu plus que la tête de façon à faciliter l'observation des ovaires grâce au tassement des viscères contre le diaphragme. La paroi abdominale est rasée et désinfectée. Deux anesthésies locales à la xylocaïne sont pratiquées aux endroits prévus pour la pose de l'endoscope et du palpeur, c'est-à-dire à 10 cm de part et d'autre de la ligne médiane et à une quinzaine de cm de la naissance du pis, en évitant soigneusement la veine mammaire. Les instruments introduits après perforation au trocart, sont un endoscope Wolf muni d'une fibre de verre souple qui le relie à une source lumineuse de 150 Watts et un palpeur gradué. De l'air filtré est insufflé par un petit compresseur afin de soulever la paroi abdominale du péritoine.

Le tractus génital est ainsi livré à l'œil de l'observateur. Une observation rapide permet de déterminer dans un premier temps le type d'ovaire (gauche ou droit) et sa position (interne ou externe) et dans un second temps, le nombre de corps jaunes présents en surface.

A la fin de l'observation des ovaires, les instruments sont retirés et désinfectés à l'alcool. Les incisions sont désinfectées avec de la poudre antiseptique, le Spitalen, et refermées par une agrafe.

II.1.4.4. Echographie

L'échographe est un appareil composé d'une sonde émettrice-réceptrice, d'un ordinateur et d'un écran. La sonde émet des ondes ultrasonores qui sont réfléchies différemment selon les tissus et les structures qu'elle rencontre. Les ondes réfléchies sont traduites en image par l'ordinateur et apparaissent sur l'écran. L'interprétation de ces images demande une certaine expérience.

La sonde est appliquée près du pis, dans la région de l'aine. La taille et le nombre de jeunes peuvent être observés avec précision entre les 35 et 100ème jours de gestation. Passé ce délai, le jeune prend trop de place sur l'écran par rapport à la sonde et il devient malaisé d'estimer la taille, et plus encore le nombre de jeunes présents.

II.1.4.5. Relevé des performances

Le relevé des performances est fait dans un "carnet d'agnelage". Ce carnet est standardisé et contient toute une série d'informations sur le jeune et ses parents. Ces informations sont notamment le numéro de tatouage de l'agneau, son sexe, sa date de naissance, son poids à la naissance, le numéro d'enregistrement de ses parents ainsi que diverses observations sanitaires (adoption de l'agneau par une autre brebis que la mère, problèmes sanitaires...).

Les performances de reproduction peuvent être caractérisées par trois critères:

- le *taux de fertilité* qui est le nombre de brebis agnelant pour 100 brebis mises à la reproduction;
- le *taux de prolificité* qui est le nombre de jeunes nés par brebis parturiante;
- le taux de fécondité peut être calculé en multipliant la fertilité par la prolificité, ce qui est équivalent au nombre de jeunes nés pour 100 brebis mises à la reproduction.

II. 2. SECONDE EXPERIENCE: EFFETS DE LA GH ADMINISTREE *IN VITRO* SUR LES PROCESSUS DE MATURATION, DE FECONDATION ET DE CLIVAGE EMBRYONNAIRE

II.2.1. Objectifs

Au cours de la seconde expérience, nous avons déterminé les effets d'une administration *in vitro* d'hormone de croissance sur la maturation ovocytaire, la cinétique de progression méiotique des ovocytes, la fécondation et le développement embryonnaire. L'influence de l'hormone de croissance sur les différents paramètres étudiés est comparée aux effets que peut avoir la FSH sur ces mêmes paramètres.

II.2.2. Conditions expérimentales

Les techniques que nous avons utilisées sont basées sur celles employées pour la fécondation in vitro ovine par l'équipe de Cognié au centre INRA de recherches en physiologie de la reproduction des mammifères domestiques à Nouzilly (France).

Les manipulations in vitro sont réalisées au Laboratoire de Physiologie Animale des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix à Namur. Chaque étape de culture in vitro, partant de la récolte des ovocytes au clivage embryonnaire doit se faire dans des conditions de température et de stérilité strictes. C'est pourquoi ces manipulations sont réalisées sous hotte à flux laminaire et sous loupe binoculaire munie d'une platine chauffante maintenue à 39°C, et les cultures en étuve stérile, sous 5% de CO_2 et 80% d'humidité relative.

II.2.3. Récolte des ovaires et de la semence

Les ovaires nécessaires au bon déroulement des expériences sont récoltés à l'abattoir d'Anderlecht immédiatement après abattage des brebis et transportés le plus rapidement possible au laboratoire dans une solution physiologique de NaCl 0,9% à une température avoisinant 39°C ou 4°C selon nos besoins.

La semence congelée provient d'un pool constitué préalablement au Centre d'Insémination et de Sélection Ovine (C.I.S.O.) de Faulx-les-Tombes.

Nous effectuons au C.R.O de Faulx-les-Tombes les prélèvements sur des brebis présentant des chaleurs spontanées afin d'établir un pool de sérum de brebis en chaleur nécessaire lors des fécondations in vitro.

II.2.4. Plans expérimentaux

Afin de déterminer l'influence de l'hormone de croissance sur les processus de maturation, de fécondation ovocytaire et de clivage embryonnaire, nous avons planifié trois essais.

II.2.4.1. Premier essai

Lors du premier essai, nous avons étudié les effets de la GH sur la **maturation extra-ovocytaire** et sur la **cinétique de progression méïotique** ou **maturation nucléaire** des COCs placés en culture in vitro. La nécessité d'additionner de la FSH dans les milieux de maturation est également déterminée lors de cet essai.

Pour ce faire, les ovaires sont récoltés à l'abattoir pour en ponctionner les follicules de 3 à 6 mm de diamètre et ne présentant aucun signe visible d'atrésie. Les ovocytes récupérés sont sélectionnés sur base de divers critères de qualité du complexe ovocyte-cumulus (COC) et répartis de façon aléatoire en quatre groupes :

- le premier (témoin négatif ou T^-) incube dans un milieu de maturation sans ajout d'hormones;
- le deuxième (témoin positif ou T^+) incube dans un milieu de maturation complémenté de FSH à une concentration de 100 ng/ml;
- le troisième incube en présence de GH (groupe GH) à une concentration de 50 ng / ml dans le milieu;
- le quatrième (FSH/GH) incube dans un milieu de maturation complémenté de FSH et de GH.

Durant les différentes tentatives, le **taux de maturation extra-ovocytaire ou TME** est estimé après observation de l'expansion du cumulus au sein de chaque groupe de COC. Cette estimation est faite après 10, 12, 18 ou 24 heures d'incubation. Le stade méiotique ou **taux de maturation nucléaire** (TMN) est déterminé après fixation et coloration des ovocytes (point 2.11). Cette estimation est également effectuée après 10,12,18 ou 24 heures de maturation *in vitro*.

Au terme de chaque culture, le milieu d'incubation est prélevé et congelé à -20°C en vue du dosage ultérieur de stéroïdes (P_4 et E_2).

Ce premier essai doit nous permettre de déterminer les effets de la GH et/ou de la FSH sur les processus de maturation ovocytaire. A ce stade expérimental, le meilleur environnement hormonal pour la maturation peut être défini et appliqué lors des essais suivants.

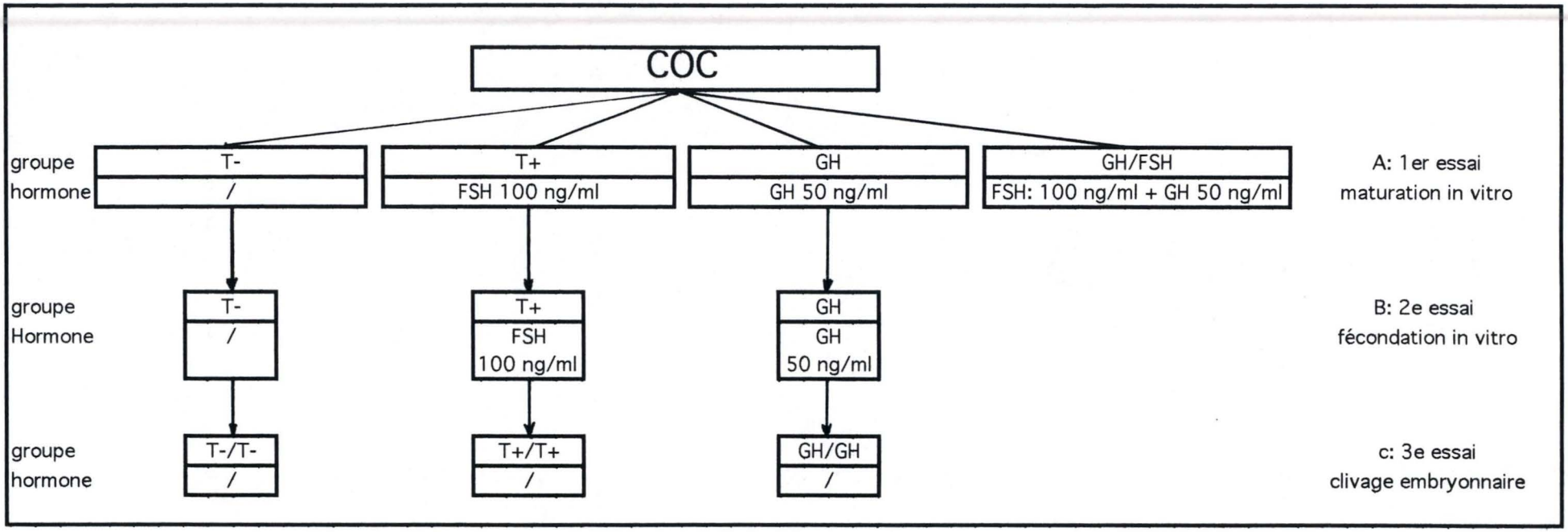


Figure 2.3: Schéma du protocole appliqué pour nos expériences *in vitro*

II.2.4.2. Deuxième essai

Au cours du deuxième essai, nous avons étudié l'influence de l'hormone de croissance sur la **fécondation** *in vitro* des ovocytes. Les ovocytes sont scindés en trois groupes pour être maturés *in vitro* en l'absence ou présence de GH ou FSH (figure 2.3.a). Signalons que pour ce 2ème essai, nous avons supprimé le groupe FSH+GH parce que nous n'avons pas remarqué d'effets additifs de ces deux hormones lors de la maturation des ovocytes (premier essai).

Après 24 heures d'incubation, les ovocytes présentant des signes favorables de maturation sont retenus pour la suite des opérations et fécondés *in vitro* sous trois conditions différentes (tableau 2.3.b).

Dix sept heures après l'insémination *in vitro*, le **taux de fécondation (TF)** obtenu au sein de chaque groupe peut être estimé après fixation et coloration des ovocytes (point 2.11). Une comparaison entre les TF obtenus permet de déterminer les conséquences d'un apport *in vitro* de GH durant la maturation et la fécondation ovocytaire sur les processus de fécondation ovocytaire. Un environnement optimal peut ainsi être déterminé au terme de cette expérience afin d'obtenir un TF *in vitro* le plus élevé possible.

II.2.4.3. Troisième essai

Au cours du troisième essai, nous avons étudié l'influence de l'hormone de croissance sur le clivage embryonnaire. Les conditions expérimentales suivies durant la maturation et/ou la fécondation ovocytaire découlent des résultats du deuxième essai. Vingt quatre heures après le début de l'insémination *in vitro*, les ovocytes sont placés dans un milieu favorable au clivage embryonnaire (figure 2.3.c). Le pourcentage de clivage embryonnaire, ainsi que la qualité de clivage sont estimés après 24, 48, 72 et 96 heures supplémentaires de culture. Les caractéristiques et critères de qualité du clivage embryonnaire sont décrits dans le point 2.10 de ce même chapitre. Au terme de cet essai, nous serons en mesure de déterminer les conséquences d'un apport *in vitro* d'hormone de croissance sur le clivage embryonnaire.

II.2.5. Milieux utilisés

Pour chaque étape de la production *in vitro* d'embryons ovins, un milieu spécifique est utilisé.

II.2.5.1. Milieux de récolte, de lavage et de maturation des ovocytes

Les milieux utilisés lors de la récolte, du lavage et de la maturation des COCs sont constitués à partir d'un milieu de culture classique, le M199 (GIBCO BRL, n° 31100-076). Il est utilisé sous forme de poudre à dissoudre dans de l'eau ultrapure (milli-Q). Selon les recommandations de la firme, du $NaHCO_3$ (Merck 6329, PM 84,01) est ajouté à raison de 2,2 g/l de milieu. De la gentamycine (SIGMA, G1272) est additionnée à raison de 40 µl/10 ml de

milieu. Le pH est ajusté à 7,2 - 7,3 et le tout est stérilisé sur filtre millipore stérivex (Sterile Acrodisc 0,2 µm, GelmanSciences, N°4192).

Afin de constituer le milieu de récolte des ovocytes, on ajoute au M199 en solution de l'héparine (20 µl/ml; Heparine Novo, Novo Nordisk, 5000 U.I./ml, 047-068) qui permet d'éviter la formation d'un réseau de fibrine qui agglutine les cellules aspirées au fond du tube.

Le milieu de lavage des ovocytes est constitué en ajoutant à 10 ml de M199 23,8 mg d'HEPES (Sigma, H-6147) et 40 µl de Gentamycine.

Le milieu de maturation est constitué de M199 complémenté de fluide folliculaire (10%) et, selon le groupe expérimental, de FSH (NIDDK-oFSH-RP-1) et/ou de GH(NIDDK-oGH-I-4).

La composition des différents milieux de maturation selon les groupes expérimentaux est la suivante :

Groupe	Constituants rajoutés au milieu de maturation	
Groupe T^-	/	/
Groupe T^+	FSH (100ng/ml)	/
Groupe GH	/	GH (50 ng/ml)
Groupe FSH/GH	FSH (100ng/ml)	GH (50ng/ml)

Lors de chacune des étapes de la manipulation des ovocytes, les différents milieux sont préparés extemporanément.

II.2.5.2. Milieux de capacitation et de fécondation

La base des milieux de capacitation et de fécondation est une modification du milieu défini de Brackett. On le nomme DM-H pour « define medium » tamponné avec de l'HEPES. Le DM-H est préparé au départ d'une solution saline dont la composition est (dans 500 ml d'eau milli-Q) :

- 3,785 gr de NaCl;
- 0,150 gr de KCl;
- 0,165 gr de $CaCl_2 2H_2O$;
- 0,0565 gr de $NaH_2PO_4\ 2H_2O$;

- 0,053 gr de $MgCl_26H_2O$;
- 0,175 gr de $NaHCO_3$.

Cette solution se conserve un mois à 4°C.

Afin d'obtenir du DM-H, on ajoute à 100 ml de la solution saline :
- 250 mg de glucose;
- 13,7 mg de pyruvate de Na (SIGMA; P-4562);
- 238,3 mg d'HEPES (SIGMA, H-6147);
- 5 mg de pénicilline/streptomycine (GIBCO BRL, 15145-014);
- 400 mg de BSA (SIGMA, A-9647).

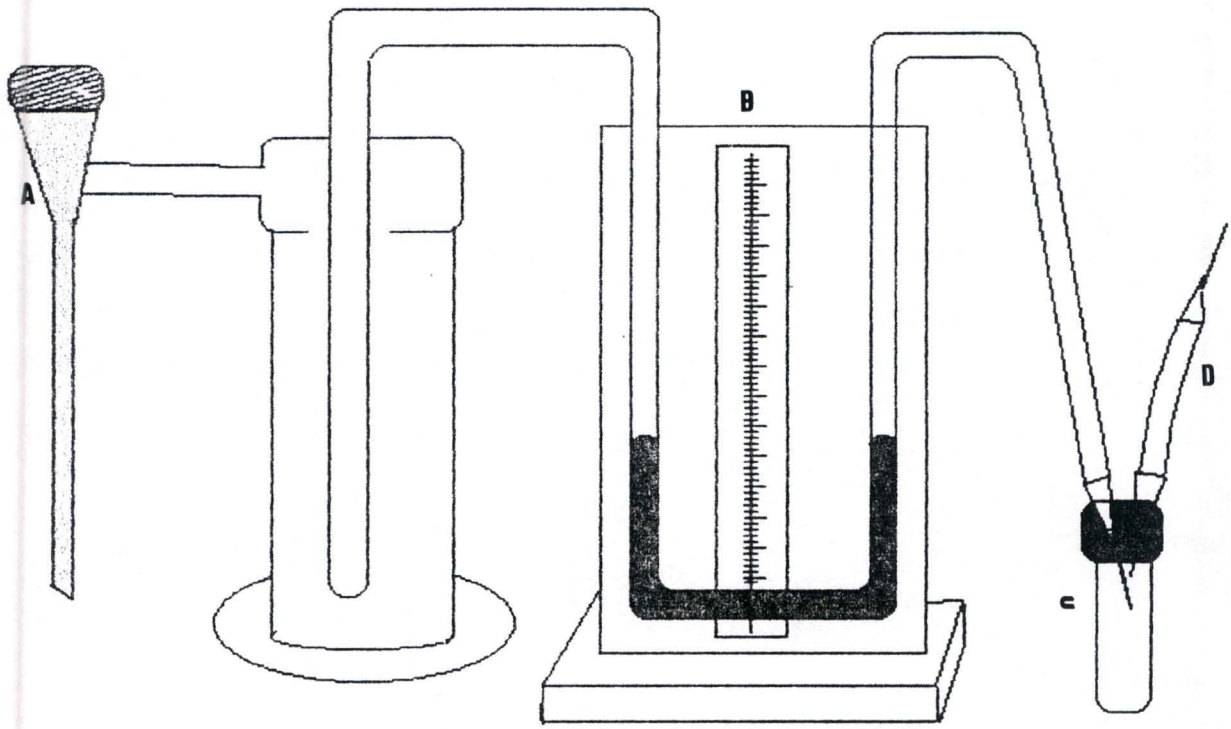
Le milieu de capacitation est constitué de DM-H complémenté de 20% de sérum de brebis en chaleur. Il est ajusté à pH 7,3 et stérilisé sur un filtre stérivex de 0,2 µm.

Le milieu de fécondation (FIV) est également constitué de DM-H complémenté de 20% de sérum de brebis en chaleur, mais contient en plus du lactate de Na (180 mg/100 ml de milieu; SIGMA, L-7900). Son pH est ajusté à 7,7 et le tout est stérilisé sur stérivex 0,2 µm.

II.2.5.3. Milieu de clivage embryonnaire

Le milieu de clivage embryonnaire est le SOF (synthetic oviduct fluid), mis au point en 1992 par Takahashi et First. Pour 100 ml d'eau milli-Q, il se compose de :
- 629,4 mg de NaCl;
- 53,4 mg de KCl;
- 16,2 mg de KH_2PO_4;
- 25,2 mg de $CaCl_2.2H_2O$;
- 9,8 mg de $MgCl_2.6H_2O$;
- 210,6 mg de $NaHCO_3$;
- 28,2 µl de lactate de Na;
- 3,4 mg de pyruvate de Na;
- 26 µl de rouge phénol (SIGMA, P-0290);
- 500 µl de L-Glutamine 200 mM (SIGMA, G-7513);
- 2 ml d'acides aminés essentiels (BME Amino Acids solution, SIGMA, B-6766);
- 1 ml d'acides aminés non essentiels (MEM Non-Essential Amino Acid solution, M-7145).

Figure 2.4: Système de ponction (a: trompe à vide, b: colonne de mesure de la depression, c: tube de récolte des COCs, d: tube reliant aiguille d'aspiration des ovocytes au tube de récolte)



Les chlorures sont à dissoudre séparément, puis ils sont additionnés des autres sels et enfin des autres composants. Le pH est ajusté à pH 7,3, puis la solution est stérilisée sur filtre 0,2 µm et se conserve stérilement une semaine à 4°C .

II.2.5.4. Percoll

La technique de capacitation des spermatozoïdes est réalisée sur gradient biphasique de Percoll. La préparation des deux gradients est réalisée de la façon suivante:

- Percoll 90% (0,5ml NaCl 9% + 4.5 ml Percoll 100% SIGMA, P1644);
- Percoll 45% (1 ml de la solution à 90% + 1 ml de DM-H + 2 µl de phénol rouge.

II.2.6. Récolte du matériel animal

II.2.6.1. Ovocytes

Les follicules antraux à divers stades d'évolution sont visibles à la surface de l'ovaire. Les ovocytes sont récoltés à partir des ovaires transportés de l'abattoir dans du liquide physiologique à 39°C. Seul le contenu des follicules de 3 à 6 mm de diamètre ne présentant pas de signes visibles d'atrésie est ponctionné. Cette ponction est réalisée au moyen d'une aiguille 18G1/2 montée sur une trompe à vide de dépression réglable (figure 2.4). La dépression est contrôlée via une colonne de mercure disposée en parallèle. Nous utilisons une dépression de 30 mm de mercure. Le biseau de l'aiguille pénètre dans le follicule vers le bas, parallèlement à la surface de l'ovaire.

Les complexes ovocytes-cumulus (COCs) et le liquide folliculaire sont recueillis dans un tube stérile placé entre l'aiguille et la trompe à vide et maintenue à 39°C. Le tuyau reliant l'aiguille au tube de récolte des ovocytes est régulièrement lavé avec du milieu de récolte.

Le contenu du tube de récolte est versé dans une boîte de pétri maintenue à 39°C pour en sélectionner les COC. Afin d'être retenus, les COC doivent répondre à divers critères de qualité:

- un cumulus de plus de deux couches de cellules doit être présent;
- le cumulus ne doit pas présenter de début d'expansion cellulaire (signe de maturation extra-ovocytaire);
- le cytoplasme doit être clair et homogène (pas de signe de dégénérescence).

II.2.6.2. Spermatozoïdes

Nous avons au laboratoire de Physiologie Animale la possibilité de nous rendre au Centre d'Insémination et de Sélection Ovine de Faulx-les-Tombes afin de disposer de sperme frais ou congelé.

Pour reproduire les mêmes conditions expérimentales lors de chaque essai de fécondation *in vitro*, nous avons travaillé avec la même semence à chaque fois. Un stock de semence congelée à donc été constitué à partir d'un pool de quelques prélèvements réalisés sur un même bélier, sélectionné sur base d'une bonne fertilité. La semence de ce bélier avait été préalablement reconnue apte à être congelée.

II.2.6.3. Fluide folliculaire

La maturation *in vitro* d'ovocytes ovins nécessite la présence dans le milieu de culture de 10 % de fluide folliculaire. Afin de reproduire, lors de chacune des maturations, les mêmes conditions expérimentales, un pool de fluide folliculaire (FF) est constitué avant toute manipulation, fractionné et conservé à -20°C. Le même fluide folliculaire est ainsi utilisé lors de chaque tentative de maturation *in vitro* des ovocytes.

Le FF est récolté à partir d'ovaires transportés de l'abattoir dans une solution physiologique à 4°C. Après ponction des follicules de 3 à 5 mm de diamètre, le liquide obtenu est centrifugé à 3500 rpm pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est prélevé, aliquoté par fraction de 400 ml et conservé à -20°C.

II.2.6.4. Sérum de brebis en chaleur

Le sérum de brebis en chaleur (SBC) est obtenu à partir de prélèvements sanguins effectués sur des brebis en œstrus spontané. Les prélèvements sont effectués au niveau de la jugulaire, recueillis dans des tubes et stockés durant une nuit à 4°C. Après rétraction du caillot, le tube de sang est centrifugé (4000 rpm pendant 20 minutes à 4°C), le sérum récupéré est décomplémenté par chauffage à 56°C durant 30 minutes. Quand il est encore chaud, le sérum est filtré (filtre Cohatman, 1003090). Il est ensuite stocké par fraction de 1 ml à -20°C.

II.2.7. Maturation in vitro des ovocytes (MIV)

La manipulation des ovocytes doit être rapide et propre; c'est pourquoi nous avons choisi de travailler avec le système Unopette (Capillary Pipettes, Becton Dickinson, 5878). Ce système est constitué d'une micro seringue Hamilton de 100 µl sur laquelle on monte une Unopette (capillaire en verre transparent).

Après ponction, les ovocytes sont lavés quatre fois dans du milieu de lavage réparti par fractions de 500 µl dans une boîte Nuncon à quatre puits. Cette étape permet d'éliminer le sang et les débris cellulaires susceptibles d'inhiber ou de contaminer la maturation. Les COCs

sélectionnés sont ensuite répartis de façon aléatoire en quatre groupes; chaque groupe incube dans un milieu de maturation spécifique :

Groupe	Composition milieu maturation
Groupe T^-	Milieu maturation sans adjonction d'hormones
Groupe T^+	Milieu de maturation + FSH (100 ng/ml)
Groupe GH	Milieu de maturation + GH (50 ng/ml)
Groupe FSH+GH	Milieu de maturation + FSH + GH

Les boîtes sont ensuite placées 24 heures dans un incubateur sous une atmosphère constituée de 5% de $C0_2$, 95% d'air saturé en humidité et à une température de 39°C. L'état de maturation des COCs est noté après 10, 12, 18 et 24 heures de maturation.

II.2.8. Capacitation des spermatozoïdes.

La technique de capacitation que nous avons choisie est le Percoll biphasique. Cette manipulation permet de laver les spermatozoïdes de leur dilueur, et de les trier par centrifugation sur gradients de densité. Le déroulement de la technique a fait l'objet de quelques mises au point décrites dans la partie Résultats (point 1.3.).

II.2.9. Fécondation in vitro (FIV)

Après 24 heures de maturation, les COCs montrant une nette expansion du cumulus sont sélectionnés et débarrassés des cellules du cumulus par un bref passage dans du milieu de fécondation contenant de l'hyaluronidase (100 unités/ml). Ils sont ensuite lavés dans du milieu FIV à trois reprises et répartis dans les puits de fécondation. L'environnement hormonal des groupes d'ovocytes sont les suivants :

Conditions MIV/FIV	Composition des puits de fécondation
T^-	500 µl milieu FIV $\pm 10^5$ spermatozoïdes / ovocyte
T^+	500 µl milieu FIV (complémenté de FSH 100ng/ml) $\pm 10^5$ spermatozoïdes / ovocyte
GH	500 µl de milieu FIV (complémenté de GH 50ng/ml) $\pm 10^5$ spermatozoïdes /ovocyte

Les ovocytes sont inséminés *in vitro* avec des spermatozoïdes capacités et dilués dans du milieu de capacitation afin d'approcher une concentration de 100 000 spermatozoïdes par ovule. Après l'insémination *in vitro*, les boîtes sont placées à l'étuve durant 17 heures (39°C, 5% CO_2 , 95% air humide).

II.2.10. Culture embryonnaire

Vingt quatre heures après l'insémination *in vitro*, les ovocytes sont lavés par quatre passages successifs dans du milieu de culture SOF préalablement mis à température de 39°C. Ils sont ensuite répartis dans différents puits contenant 500 µl de milieu SOF sous huile minérale (250µl) et placés dans l'incubateur (39°C, 5% CO_2, 85% d'humidité) durant quatre jours. Le taux ainsi que la qualité du clivage embryonnaire sont relevés quotidiennement au sein de chaque groupe.

Après fécondation, le génome zygotique qui résulte de la fusion des deux pronuclei est activé au stade de deux cellules. Puis l'embryon s'engage dans une série de division qui donnent naissance à la morula (8 - 16 cellules). Au cours des divisions successives de l'embryon, il peut être classé selon deux aspects morphologiques:

- le STADE c'est-à-dire le nombre de blastomères qui le constitue;
- la CLASSE ou la taille des blastomères résultant du mode de division de la cellule (symétrique, partiellement symétrique ou asymétrique).

La classe ou qualité du clivage embryonnaire s'étale sur une échelle de 1 à x selon la symétrie de division des blastomères:

- un embryon de **classe 1** est constitué de blastomères de tailles égales résultant d'une division symétrique (stade 2 cellules; photo 2.1.a) et synchrone (pour les stades de plus de deux cellules);
- un embryon de **classe 2** est le résultat d'une division cellulaire légèrement asymétrique donnant deux blastomères de taille différente (photo 2.2 a et b);
- pour un embryon de **classe 3**, l'asymétrie de la division est telle qu'il est constitué d'une (de) cellule(s) plus large(s) et d'une (d') autre(s) plus petite(s);(photo 2.3);
- l'embryon de **classe 4** présente une morphologie irrégulière, il est constituée d'au moins un blastomère et de fragments cytoplasmiques (photo 2.4);
- l'embryon de **classe x** ou 'fragmenté' est formé de cellules anormales (résultat d'une division rapide et asymétrique) et de fragments cytoplasmiques (photo 2.2.c).

II.2.11. Techniques de coloration et observation des ovocytes et des oeufs fécondés

II.2.11.1. Observation en fluorescence (Hoechst 33342)

La coloration au fluorochrome Hoechst 33342 permet une bonne visualisation du matériel chromosomique des ovocytes et des embryons après liaison du groupe bisbenzimide à l'ADN. L'observation en microscopie à épifluorescence fait apparaître la chromatine en bleu.

Le déroulement technique de la coloration peut être résumé de la façon suivante. Les ovocytes ou embryons sont lavés 4 fois dans une solution de NaCl 0,9%. Après séchage, les cellules sont fixées en plongeant les lames durant 24 heures dans de l'éthanol à 70%. Ce temps écoulé, les lames sont séchées et recouvertes par quelques gouttes de fluorochrome (1mg de Hoechst/ml d'eau contenant 2,3 % de citrate trisodium). Les lames sont ensuite recouvertes par une lamelle en évitant la formation de bulles d'air et scellées avec du vernis. Elles sont conservées en chambre noire à température de 4°C jusqu'à observation au microscope à épifluorescence (filtre BP 340-380 nm et filtre LP 430 nm.).

II.2.11.2. Coloration acide acétique/éthanol

Dix sept heures après le début de l'insémination *in vitro*, on récupère les ovocytes. Ceux-ci sont lavés trois fois dans une solution physiologique (NaCl 0.9%) afin d'éliminer les spermatozoïdes et cellules du cumulus qui les entourent. Ils sont ensuite fixés et décolorés en les plongeant dans un mélange d'acide acétique et d'éthanol (1 volume d'acide acétique pour trois volumes d'éthanol).

Après quelques minutes de décoloration, l'observation au microscope inversé permet de déterminer le nombre d'ovocytes fécondés en visualisant les deux pronuclei ou œufs 2PN, et les éventuels œufs polyspermiques (observation de plusieurs pronuclei).

TROISIEME PARTIE:

RESULTATS

CHAPITRE I: EFFETS DE LA GH ADMINISTREE *IN VIVO* SUR LES PERFORMANCES DE REPRODUCTION OVINE

I.1. RAPPEL DES OBJECTIFS

Cette expérience est consacrée à la détermination des effets de la GH sur la prolificité, la fécondité et le TO des brebis. Cette expérience se déroule en deux parties: la première porte sur un troupeau de 47 brebis et est réalisée en début de saison de reproduction, la seconde se déroule en milieu de saison de reproduction et analyse les effets de la GH sur la prolificité, la fécondité et les premières phases de gestation de la brebis.

I.2. RESULTATS OBTENUS EN DEBUT DE SAISON DE REPRODUCTION (tableau 3.1)

I.2.1. Endoscopies

L'analyse des résultats des endoscopies réalisée en début de saison de reproduction nous montre un pourcentage de brebis ayant ovulé plus important dans le lot témoin (88%) que dans le lot traité (83%). Cette différence n'est donc pas significative. Nous n'avons pas réussi non plus à montrer une différence significative pour les taux d'ovulation qui sont respectivement 1,7 ± 0,6 pour le groupe témoin et 1,8 ± 0,5 pour le groupe traité. Nous avons obtenu, ce pour les deux lots 1,5 ovule émis par brebis mise à la reproduction.

I.2.2. Echographies

Nous obtenons après échographies réalisées 6 semaines après insémination un pourcentage de brebis gestantes presque identique pour le groupe traité (26%) que pour le groupe témoin (25%), et cette différence est trop faible que pour être significative. Le nombre de fœtus par brebis gestante ainsi que le nombre de fœtus par brebis mise à la lutte sont identiques pour les deux groupes. Ils se situent à une valeur de 1,8 ± 0,4 et 0,5.

		Témoin/Témoin (n = 24)	Témoin/GH (n = 23)	GH/Témoin (n = 19)	GH/GH (n = 23)
Echographies	**Nombre de brebis gestantes (%)**	92	78	100	100
	Nombre de foetus par brebis gestante	1,7 ± 0,6	1,9 ± 0,7	1,8 ± 0,5	1,7 ± 0,6
	Nombre de foetus par brebis mises à la lutte	1,6 ± 0,8	1,5 ± 1,0	1,8 ± 0,5	1,7 ± 0,6
Parturitions	**Fertilité (%)**	79	61	89	83
	Prolificité	1,7 ± 0,6	1,9 ± 0,7	1,7 ± 0,6	1,8 ± 0,6
	Fécondité	1,3 ± 0,8	1,2 ± 1,1	1,5 ± 0,8	1,5 ± 0,9

Tableau 3.2: *Résultats des échographies et parturitions des brebis témoins et traitées à la rbGH en milieu de saison de reproduction.*

I.2.3. Parturitions

La fertilité des brebis traitées à la GH est plus importante (26%) que celle des brebis du lot témoin (21%). L'analyse de la prolificité semble également plus importante pour les brebis du lot traité avec une valeur se situant à 1,3 ± 0,5, alors que la prolificité des brebis du lot témoin est minimale de 1,0 ± 0,0. Cette différence n'est cependant pas assez importante que pour être statistiquement valable. La fécondité des brebis du lot traité (0,3 ± 0,6) paraît plus importante que celle du lot témoin (0,2 ± 0,4), mais la différence n'est pas significative.

I.3. RESULTATS OBTENUS EN MILIEU DE SAISON DE REPRODUCTION (tableau 3.2)

Dans cette seconde partie de la première expérience, les endoscopies n'ont pas été réalisées afin d'éviter les perturbations éventuelles qu'elles pourraient provoquer sur les premières phases de la gestation.

I.3.1. Résultats des échographies

Les brebis traitées à la GH pendant le cycle précédant la fécondation (groupe GH/Témoin et GH/GH) se sont toutes retrouvées gestantes, alors que la fertilité des brebis non traitées durant le cycle est de 92% pour le groupe T/T et 78 pour le groupe T/GH.

Il est impossible de montrer une différence significative pour les quatre groupes en ce qui concerne le nombre de fœtus par brebis gestante. Nous obtenons en effet une valeur identique qui se situe aux alentours de 1,8 et est la même que celle obtenue pour les deux groupes en début de saison de reproduction. Le nombre de fœtus par brebis mises à la lutte semble légèrement plus important (1,8 ± 0,5 et 1,7 ± 0,6) pour les groupes GH/Témoin et GH/GH que pour ceux non traités lors des premières phases du cycle (1,6 ± 0,8 et 1,5 ± 1,0 pour respectivement les groupes Témoin/Témoin et Témoin/GH).

I.3.2. Résultats des parturitions

La fertilité des groupes traités lors du cycle précédent l'insémination est plus importante que celle des deux groupes non traités durant cette même période. Il semble également que l'administration des GH durant les premières phases de gestation diminue faiblement la fertilité. Nous obtenons en effet pour le lot GH/GH une fertilité de 83%, alors que le lot GH/Témoin présente une fertilité de 89%, et, de la même manière, les T/GH ont une fertilité de 61% pour 79 chez les T/T. L'analyse statistique que nous avons réalisée ne permet cependant pas d'affirmer une différence significative entre ces résultats.

Il est également impossible de montrer une différence significative de prolificité entre les quatre groupes. Cette prolificité se situe aux alentours de 1,8 et est bien meilleure que celle obtenue en début de saison.

La fécondité des lots traités en début de cycle semble légèrement supérieure (1,5 ± 0,8) à celle des lots non traité lors des premières phases de cycle ou elle est de 1,3 ± 0,8 et 1,2 ± 1,1 pour le lot Témoin/Témoin et Témoin/GH, mais cette différence n'est pas significative.

Tentatives de ponction	*Taux de récupération par ovaire*	*Taux de récupération par follicule*
1	0,18	0,11
2	0,85	0,35
3	0,68	0,21
4	0,91	0,58
5	0,45	0,35
6	1,86	0,65
7	0,98	0,57
8	0,85	0,50
9	1,70	0,52
10	1,43	0,74
11	0,93	0,74
12	2,28	0,90
13	1,30	0,77
14	1,35	0,47
15	1,73	0,69
16	2,39	0,67
17	2,00	0,70
18	2,13	0,56
19	1,37	0,40
20	1,37	0,45

Tableau 3.3: *Evolution des taux de récupération des COCs lors des différentes tentatives de ponction.*

CHAPITRE II : EFFETS DE LA GH ADMINISTREE *IN VITRO* SUR LA MATURATION ET LA FECONDATION OVOCYTAIRE

II.1. RAPPEL DES OBJECTIFS

Cette partie du travail est consacrée à la détermination des effets de l'hormone de croissance sur la maturation, la fécondation *in vitro* des ovocytes et le clivage embryonnaire.

Avant d'entamer toute recherche fondamentale, nous devions nous familiariser avec la manipulation des ovocytes et procéder à quelques mises au point. Nous avons abordé successivement la technique de ponction des complexes ovocytes - cumulus (COC), et le mode de capacitation des spermatozoïdes avant insémination *in vitro* des ovocytes.

II.2. PONCTION OVOCYTAIRE

Nous avons tout au long de nos expériences procédé à des adaptations de la technique de ponction ovarienne et ce, en vue d'obtenir un taux de récupération des COC de qualité le plus élevé possible. Pour ce faire, nous étudions les effets de deux variables:

- la longueur du tuyau reliant l'aiguille d'aspiration au tube de récolte des COC;
- la dépression imposée dans la colonne de mercure; variable responsable de la force d'aspiration du système de ponction.

Afin de déterminer l'importance de la **longueur du tuyau** précédant le tube de récolte des COCs, nous avons réalisé plusieurs tentatives de ponctions avec des longueurs décroissantes partant de 70 jusqu'à 20 mm. Après plusieurs tentatives, nous constatons que plus la longueur est importante, plus le nombre d'ovocytes présentant de beaux cumulus est faible (tableau 3.3; figure 3.1). Nous attribuons ce fait aux frottements qui augmentent avec la distance parcourue par les COC avant le tube de récolte. En réduisant la longueur, nous diminuons ce phénomène et, comme le confirment les résultats, nous augmentons le taux de récupération des COC présentant au moins deux couches de cellules. Nous optons donc pour une longueur de 40 mm garantissant une manipulation aisée et un taux de récolte satisfaisant.

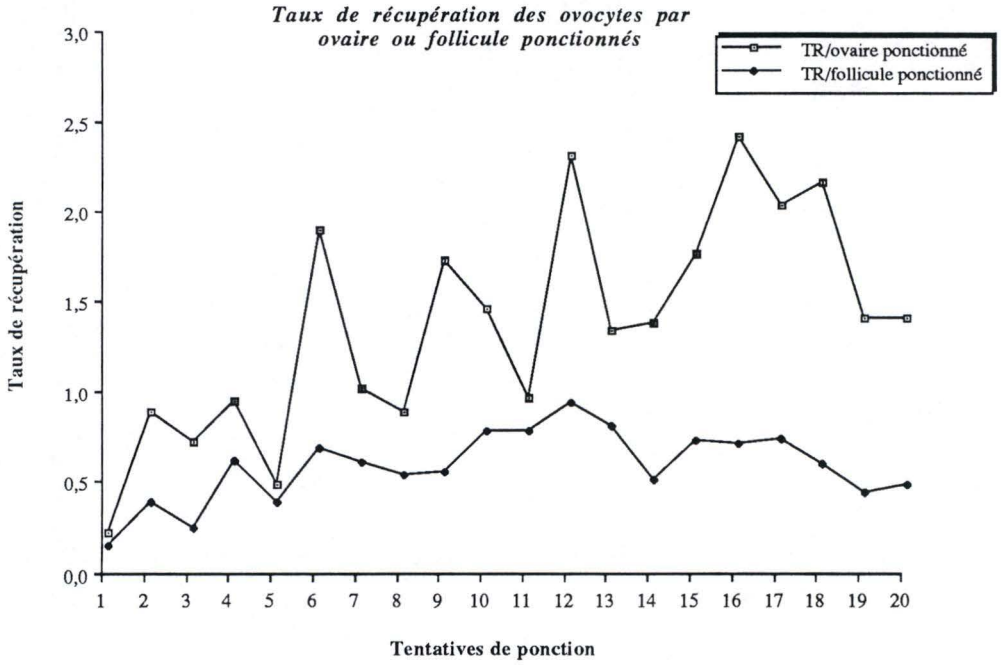


Figure 3.1: Evolution des taux de récupération des COCs au cours des différentes tentatives de ponction.

Le second paramètre testé est la **dépression** appliquée lors de la récolte des COCs. Le système de ponction possède en effet un tube de récolte à dépression réglable et constante. Nos premiers essais avec une dépression de 10 mm de mercure nous ont procuré un faible taux de récupération des COC (tableau 3.3, tentatives 1-5). Nous avons ensuite testé une dépression de 40 mm de mercure. Le taux de récupération ovocytaire a alors augmenté mais le nombre de COCs présentant de beaux cumulus a fortement diminué. Un compromis était donc nécessaire et nous optons pour une dépression de 30 mm.

Après avoir "ajusté" ces facteurs simultanément, nous obtenons un taux de récupération de 1,57±0,48 COC par ovaire ponctionné, taux satisfaisant généralement rencontré dans la littérature. Ces conditions de ponction sont dès lors appliquées pour la suite des travaux.

II.3. CONDITIONNEMENT DES SPERMATOZOIDES AVANT FIV

La capacitation des spermatozoïdes (spz) ou acquisition du pouvoir fécondant est nécessaire chez tous les mammifères mais ne peut s'effectuer très rapidement que quand le plasma séminal a été éliminé.

En fécondation *in vitro* (FIV), la semence fraîche ou congelée doit donc être lavée avant insémination afin d'éliminer le plasma séminal et les différentes structures (débris cellulaires, cellules germinales exfoliées, cellules du tractus génital, cellules sanguines, matériel amorphe, ...) diminuant ou inhibant le pouvoir fécondant du sperme. Les protocoles actuels de préparation du sperme consistent en une sélection des spermatozoïdes les plus fécondants. Dans le cadre de nos expériences, des essais ont été effectués afin de tester les différentes techniques appliquées dans les centres de FIV et, selon les résultats obtenus, d'inséminer les ovules dans les meilleures conditions possibles *in vitro*.

II.3.1. Technique de lavage et incubation des spermatozoïdes

II.3.1.1. Description de la technique

Pour mettre au point la méthode de préparation des spz, nous nous sommes inspiré des travaux de Leclercq (1994) qui obtenait, après lavage et incubation des spz dans un milieu approprié, un taux de fécondation (TF) *in vitro* de 57%.

L'échantillon de sperme subit d'abord deux lavages successifs, il est mélangé à 5 ml de M199 et centrifugé à 2500 rpm durant 5 minutes. Le culot contenant les spermatozoïdes est à nouveau suspendu dans 5 ml de milieu de capacitation et le tout est placé à l'étuve à 39°C sous

5% de CO2 durant une heure. Ce temps écoulé, les spz sont concentrés et le milieu de capacitation éliminé par centrifugation (2500 rpm pendant 10 minutes à 39°). Dix ml du culot sont prélevés et mélangés à 990 µl de sérum physiologique formolé. Une goutte du mélange est prélevée pour contrôle microscopique de la concentration en spermatozoïdes. Le culot est dilué afin d'obtenir une moyenne de 100 000 spz/ovocyte.

II.3.1.2. Résultats

Au cours de nos essais successifs, le succès de la FIV a été déterminé par l'observation des pronuclei après fixation et décoloration avec le mélange acide acétique/éthanol ou après coloration au fluorochrome (Hoechst) des œufs potentiels. Le TF (2%) obtenu lors de plusieurs tentatives de fertilisation nous a clairement démontré l'inadaptation de la méthode de capacitation. En effet, il ne s'opère à aucun moment de la technique une sélection des spermatozoïdes mobiles. Ceci nous amène à déposer *in vitro* un grand nombre de débris cellulaires et de germes bactériens responsables des contaminations souvent observées dans les puits de fécondation. Nous avons donc testé d'autres protocoles de conditionnement (swim-up, gradient de Percoll biphasique) au cours desquels une sélection des spz mobiles était effectuée au dépend des autres cellules ou des débris cellulaires présents dans le prélèvement.

II.3.2. Le Swim-Up

II.3.2.1. Description de la technique

La migration ascendante ou Swim-Up est un procédé simple qui permet de sélectionner les spz motiles d'un éjaculât ou d'une paillette. Pour la réalisation de cette technique, nous nous sommes inspiré des travaux de Lannoy (1993).

Comme préparation préliminaire, le sperme en paillette est décongelé, lavé dans du M199 et les spz concentrés par centrifugation. Nous en recupérons généralement un culot d'environ 200µl. Les étapes du Swim-Up peuvent ensuite être schématisées comme suit:

- déposer délicatement au dessus des spz 2 ml de milieu de capacitation afin d'obtenir une interface sperme - milieu très nette;
- placer les tubes deux heures dans l'étuve à 39°C sous 5% de CO2 afin de permettre la migration des spz;
- collecter la fraction supérieure du tube (contenant les spz mobiles et capacités);
- centrifuger la fraction supérieure pendant 5 minutes à 2500 rpm;
- éliminer le surnageant et remettre le culot en suspension.

Une goutte du culot en suspension est prélevée et déposée sur cellule de Bürker en vue du comptage des spermatozoïdes qui sont classés sous trois catégories:

- les mobiles progressifs ou motiles;
- les mobiles peu ou pas progressifs;
- les immobiles.

II.3.2.2. Résultats

Le nombre de spz motiles obtenus après application de la méthode ne dépassait pas 2 millions par ml de culot. Sachant que le nombre d'ovocytes à inséminer *in vitro* varie de 20 à 40, le nombre de spz récoltés est donc insuffisant pour assurer avec succès une insémination *in vitro* qui nécessite, en moyenne, 100 000 spz/ovocyte. Nous devons donc recourir à une autre méthode de conditionnement afin de sélectionner un nombre plus important de spz motiles.

II.3.3. Le gradient de Percoll biphasique

II.3.3.1. Description de la technique

La technique de capacitation de sperme congelé sur gradient de Percoll permet de laver les spz de leur dilueur et de les trier par centrifugation sur gradient biphasique (45 et 90%, voir matériel et méthode, point 2.5.4). Les grandes étapes de capacitation sur gradient peuvent être résumées comme suit (Cognié, communication personnelle).

Lors de la décongélation, les paillettes sortant de l'azote liquide sont directement plongées dans de l'eau maintenue à 39°C. La qualité de leur contenu est ensuite vérifiée en déposant une goutte de semence sur cellule de Burker. Pour être retenue après décongélation, la semence (diluée à 10^8 spermatozoïdes par paillettes de 250 µl) doit présenter encore 40% de spermatozoïdes motiles. Le contenu des paillettes est alors délicatement déposé au dessus du gradient de Percoll, le tout est passé à la centrifugeuse (2500 rpm à 39°C) durant 20 minutes. Ce temps écoulé, la majorité des spz vivants sont séparés du dilueur et des cellules mortes pour se trouver dans le culot. Ce dernier est lavé par centrifugation (2000 rpm pendant 20 minutes) et dilué dans du milieu de capacitation avant fécondation *in vitro*. Les spermatozoïdes morts restent pour la majorité concentrés entre les deux phases de Percoll.

II.3.3.2. Résultats

Au cours des essais de capacitation de sperme congelé sur gradient de Percoll biphasique, différents paramètres ont été adaptés au protocole communiqué par Cognié avant d'obtenir un nombre de spz motiles jugé suffisant pour pratiquer une insémination *in vitro*. Les quelques modifications apportées sont résumées ci-dessous:

- au Percoll 100% est additionné une solution physiologique saline (NaCl 9‰) dont la préparation doit se faire extemporanément;

- avant de réaliser la capacitation des spz sur le gradient de Percoll, il est nécessaire de placer les solutions durant un minimum de 2 heures dans l'étuve à 39°C, sous 5 % de CO_2 afin d'équilibrer le pH et la température de chacune d'elles;
- le volume de l'échantillon déposé au-dessus des gradients avant centrifugation est, selon la littérature, de 2 ml maximum, soit le contenu de 8 paillettes. Nous avons réalisé différents essais de capitation avec des volumes de 750, 500 et 250 ml de sperme déposés au dessus des gradients. C'est avec un volume de 250 µl, soit le contenu d'une seule paillette, que le taux de récupération des spz motiles était le plus élevé;
- la centrifugation des spz sur Percoll doit se faire, non pas à température ambiante, mais à 39°C;
- la récupération du culot contenant les spz motiles après la centrifugation doit être réalisée par aspiration de ce dernier et non après élimination du surnageant.

Avec ces conditions expérimentales, nous sommes parvenu à obtenir, au terme de la capacitation, une solution contenant entre 10 et 80 millions de spz motiles. Ce nombre jugé satisfaisant, nous avons, lors de chacune des tentatives de fécondation *in vitro*, appliqué le protocole ainsi défini.

II.4. Effets de la GH sur la maturation (MIV), la fecondation ovocytaire (FIV) et le clivage embryonnaire

II.4.1. Effets de la GH sur la maturation ovocytaire

Afin de déterminer l'influence de la GH sur la maturation ovocytaire, nous avons ponctionné des COC pour les répartir *in vitro* selon 4 groupes:

- le groupe témoin négatif (groupe T-) incube dans du MIV sans ajout d'hormone;
- le groupe témoin positif (groupe T+) incube dans du MIV complémenté de FSH (100 ng/ml);
- le groupe GH incube dans du MIV complémenté de GH (50 ng/ml);
- le groupe FSH/GH incube dans du MIV complémenté de FSH ainsi que de GH.

Les taux de maturation au sein de chaque groupe sont déterminés après 10, 12, 18 et 24 heures de culture *in vitro*. Pour déterminer s'il y a maturation ovocytaire, nous disposons de deux méthodes de contrôle:

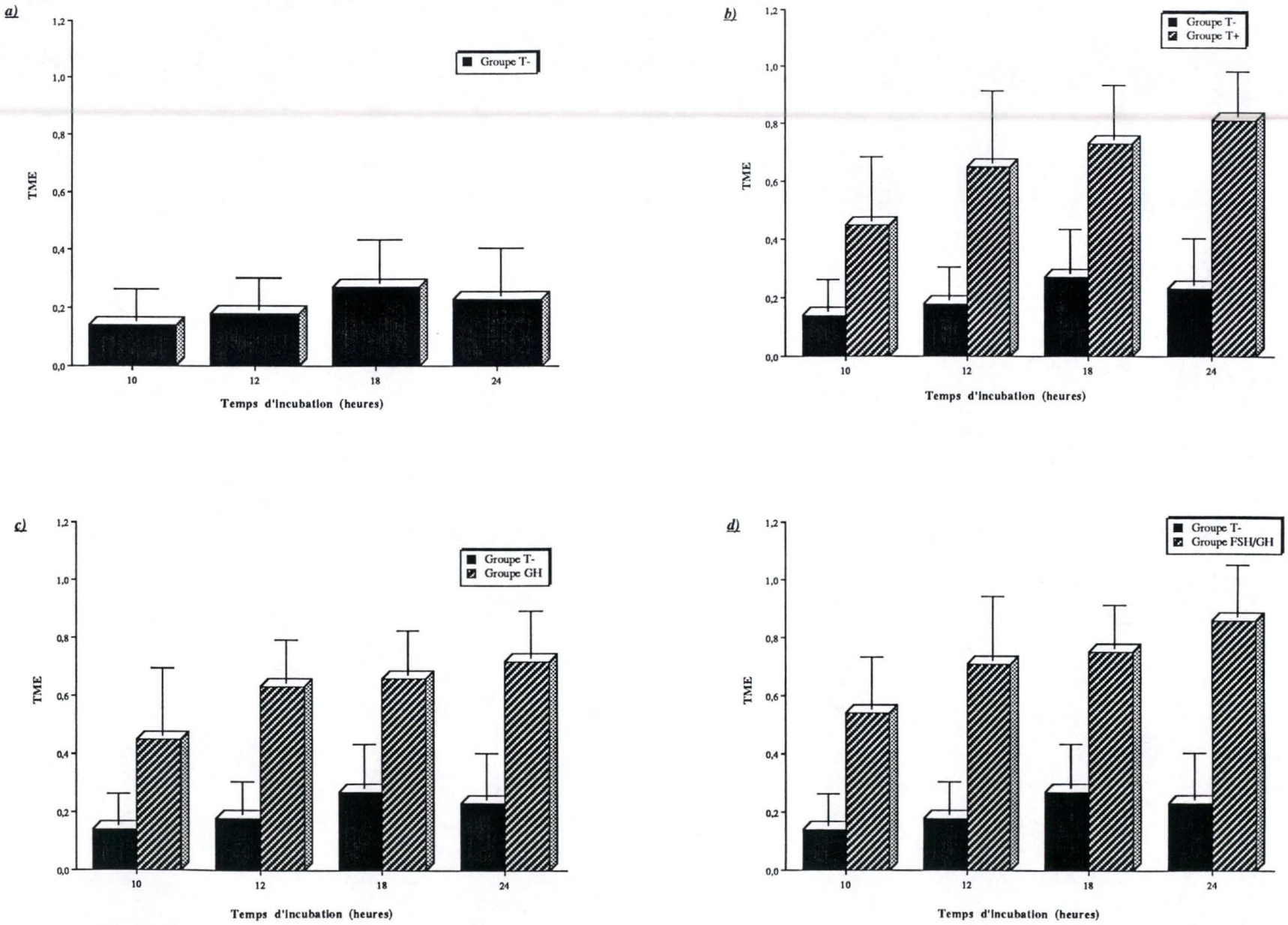


Figure 3.2: Evolution des taux de maturation extra-ovocytaire (TME) au cours du temps:
a: groupe T-;
b: groupe T+;
c: groupe GH;
d: groupe FSH/GH

- l'expansion du cumulus oophorus, témoin d'une reprise du processus méiotique et d'une maturation extra-ovocytaire (photo 3.1);
- l'observation, après coloration au fluorochrome Hoechst 33342 du fuseau de métaphase II et du premier globule polaire (photo 3.2), témoins de l'achèvement de la maturation ovocytaire.

Au sein de chacun des quatre groupes, nous analysons dans un premier temps, à l'aide de l'expansion du cumulus, l'évolution des **taux de maturation extra-ovocytaire** (TME) au cours du temps. La procédure consiste en un premier relevé après 10 heures de culture qui est comparé aux taux de maturation obtenus après 12, 18 et 24 heures. Dans un second temps, nous analysons l'effet des différents traitements imposés *in vitro* sur les TME en comparant, pour chaque temps, les taux du groupe témoin à ceux des groupe traité.

La même procédure est développée, pour la coloration au Hoescht 33342, ou un premier relevé après 10 heures de maturation est comparé aux taux obtenus après 12, 18 et 24 heures de MIV. Ces relevés nous renseignent les **taux de maturation nucléaire** (TMN) .

Enfin, nous comparons au sein d'un même groupe l'évolution des TME et TMN au cours du temps.

II.4.1.1. Taux de maturations extra-ovocytaires (TME; tableau 3.4)

Le TME au sein du **groupe T^-** augmente avec le temps d'incubation (figure 3.2.a). Après 10 heures de culture, une première observation des cumulus expansés témoigne d'un TME de 0,14 + 0,11. Une différence significative par rapport à cette valeur initiale n'apparaît qu'après 24 heures de culture (0,29 ±0,16; $P<0,05$).

Le **groupe T^+** présente un TME de 0,48 ± 0,21 après 10 heures de culture et augmente pour atteindre, après 24 heures d'incubation, une valeur de 0,81 ± 0,16 ($P<0,01$; figure 3.2.b). Un effet hautement significatif du temps sur le taux de maturation est déjà observé après 18 heures de culture.

Quelque soit le temps pour lequel les estimations d'expansion du cumulus sont effectuées, les TME de ce groupe d'ovocytes sont significativement supérieurs aux taux rencontrés au sein du groupe témoin ($P<0,01$).

Au sein du **groupe GH**, le TME est de 0,48 ± 0,22 après 10 heures d'incubation. Il augmente progressivement au cours des 24 heures jusqu'à une valeur de 0,72 + 0,16 (figure 3.2.c). Un effet significatif du temps d'incubation sur le TME étant déjà observé après 18 heures de culture ($P<0,05$).

	Taux de maturation extra-ovocytaire			
Temps d'incubation	**Groupe T-**	**Groupe T+**	**Groupe GH**	**Groupe FSH/GH**
10 heures	0,14 ± 0,11	0,48 ± 0,21	0,48 ± 0,22	0,56 ± 0,11
12 heures	0,18 ± 0,11	0,65 ± 0,25	0,63 ± 0,27	0,72 ± 0,19
18 heures	0,27 ± 0,15	0,73 ± 0,19	0,66 ± 0,15	0,75 ± 0,13
24 heures	0,29 ± 0,16	0,81 ± 0,16	0,72 ± 0,16	0,86 ± 0,17

Tableau 3.4: *Evolution des taux de maturation extra-ovocytaire durant 24 heures (estimés par l'expension du cumulus des COCs) au sein des différents groupes expérimentaux.*

	Taux de maturation nucléaire			
Temps d'incubation	**Groupe T-**	**Groupe T+**	**Groupe GH**	**Groupe FSH/GH**
10 heures	0,23 ± 0,07	0,44 ± 0,11	0,25 ± 0,12	0,31 ± 0,13
12 heures	0,29 ± 0,07	0,48 ± 0,16	0,62 ± 0,19	0,45 ± 0,28
18 heures	0,21 ± 0,15	0,53 ± 0,10	0,53 ± 0,17	0,46 ± 0,25
24 heures	0,19 ± 0,16	0,58 ± 0,14	0,59 ± 0,17	0,56 ± 0,28

Tableau 3.5: *Evolution des taux de maturation nucléaire durant 24 heures (estimés par la présence de noyaux en métaphase II) au sein des différents groupes expérimentaux.*

Par rapport au groupe T-, l'addition de GH dans le milieu de maturation augmente significativement les TME et ce, quelque soit le moment de la culture ($P<0,01$).

Les TME du **groupe FSH/GH** passent de 0,56 ± 0,11 après 10 heures d'incubation et augmentent significativement ($P<0,05$) jusqu'à 0,86 ± 0,17 après 24 heures (figure 3.2.d). L'augmentation des taux de maturation est significative après 12 heures d'incubation ($P<0,01$)

Par rapport au groupe témoin, l'addition simultanée des deux hormones *in vitro* augmente significativement les TME tout au long de la culture ($P<0,01$).

II.4.1.2. Résumé comparatif des résultats de TME

Les TME moyens obtenus au sein des groupes T^+, GH et FSH/GH sont comparables (figure 3.3). Ces taux sont proches après 10 heures de culture puis augmentent progressivement et de façon similaire au sein des trois groupes au cours du temps. Le groupe T- quant à lui, suit la même évolution tout en restant, quel que soit le moment de la culture, significativement inférieur ($P<0,01$) aux TME observés pour les autres groupes. Un supplément de GH, de FSH ou de FSH et GH dans le milieu de maturation favorise donc l'expansion du cumulus oophorus. Aucune différence n'a cependant été mise en évidence entre ces trois traitements. FSH et GH ont donc un effet comparable et l'addition simultanée de FSH et de GH dans le milieu de maturation ne provoque aucun effet potentialisateur sur les maturations extra-ovocytaires.

II.4.1.3. Taux de maturations nucléaires (TMN; tableau 3.5)

Les TMN au sein du **groupe T^-** fluctuent autour de 0,23 ± 0,07 après 10 heures de culture aucune évolution significative n'est observée durant les 24 heures d'incubation *in vitro* pour ce groupe (figure 3.4.a).

Les COC du **groupe T^+** présentent des TMN augmentant progressivement durant les 24 heures (figure 3.4.b). La valeur moyenne est de 0,44 ± 0,11 après 10 heures, et atteint 0,58 ± 0,11 au terme de la culture. L'évolution n'est pas significative.

Quel que soit le moment de la culture, les TMN de ce groupe de COCs sont significativement supérieurs ($P<0,05$) à ceux du groupe T^-.

Le TMN du **groupe GH** est de 0,25 ± 0,12 au temps 10 heures (figure 3.4.c). Il augmente après 12 heures (0,62 ± 0,19) d'incubation ($P<0,01$) puis se maintient pendant 24 heures.

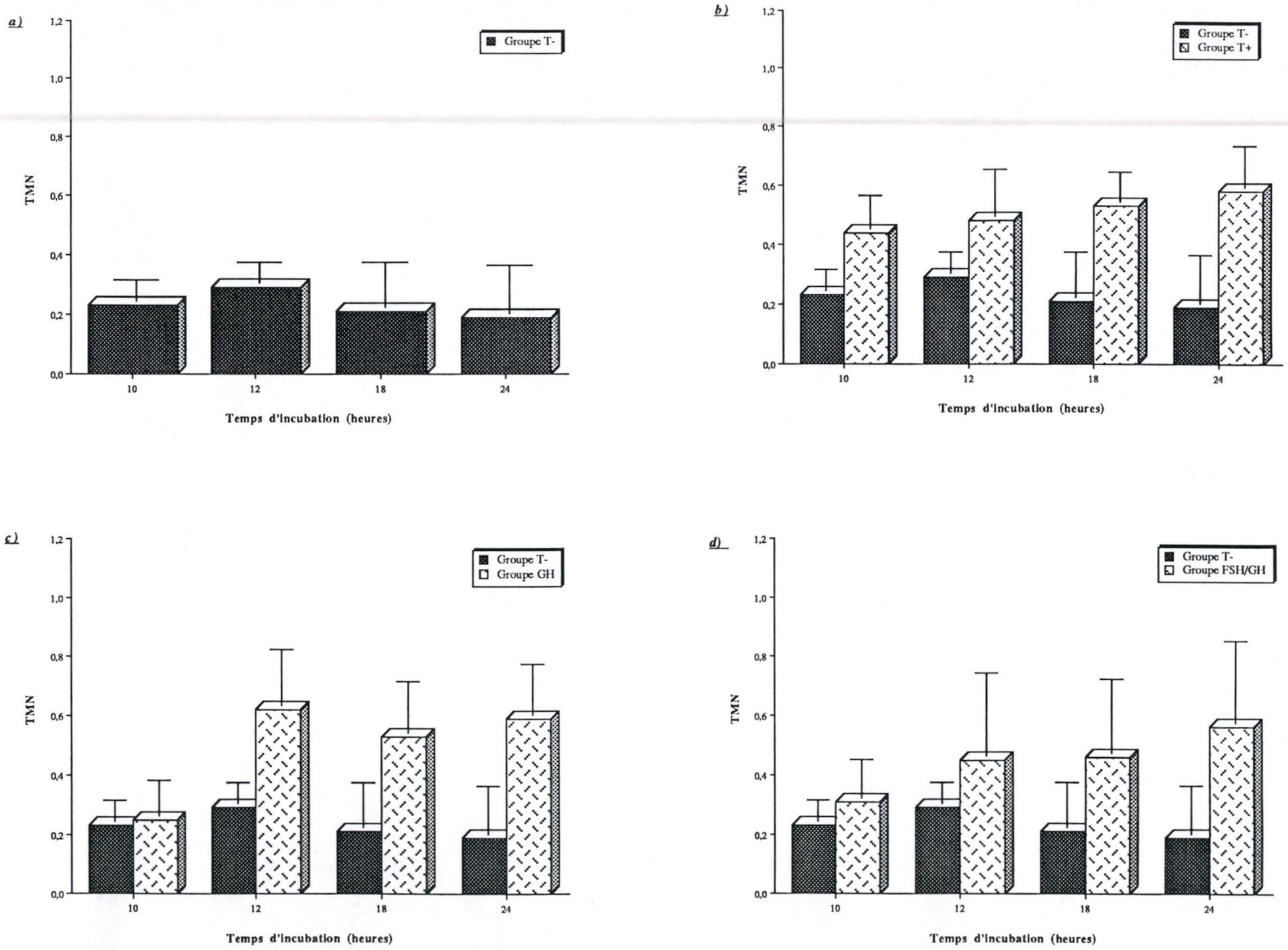


Figure 3.3: Evolution des taux de maturation nucléaire (TMN) au cours du temps:
a: groupe T-;
b: groupe T+;
c: groupe GH;
d: groupe FSH/GH.

Par rapport au groupe témoin, les TMN initiaux sont similaires. La présence de GH augmente cependant ce taux qui, après 12 heures de culture, devient significativement supérieur à celui du groupe témoin ($P<0,01$) pour le rester jusqu'en fin de culture.

Le **groupe FSH/GH** présente un TMN de $0,31 \pm 0,13$ au temps 10 heures (figure 3.4.d). Il augmente durant la culture pour atteindre une valeur significativement différente après 24 heures d'incubation ($0,56 \pm 0,28$; $P<0,05$).

Comme celui de GH, l'apport simultané de FSH/GH provoque une augmentation du TMN telle que celui-ci atteint des valeurs significativement différentes après 18 heures de culture ($P<0,05$).

II.4.1.4. Résumé comparatif des TMN

La présence *in vitro* de FSH, GH ou FSH et GH favorise donc la maturation nucléaire des ovocytes de façon similaire (figure 3.5). Les deux hormones ont des effets comparables et leur apport simultané ne se traduit pas par un effet favorable cumulé. L'addition de FSH semble ralentir le processus de maturation (maximum atteint à 24 heures), mais cet effet n'est pas significatif et peut être attribué à des erreurs de manipulation.

II.4.1.5. Comparaison des TME et TMN

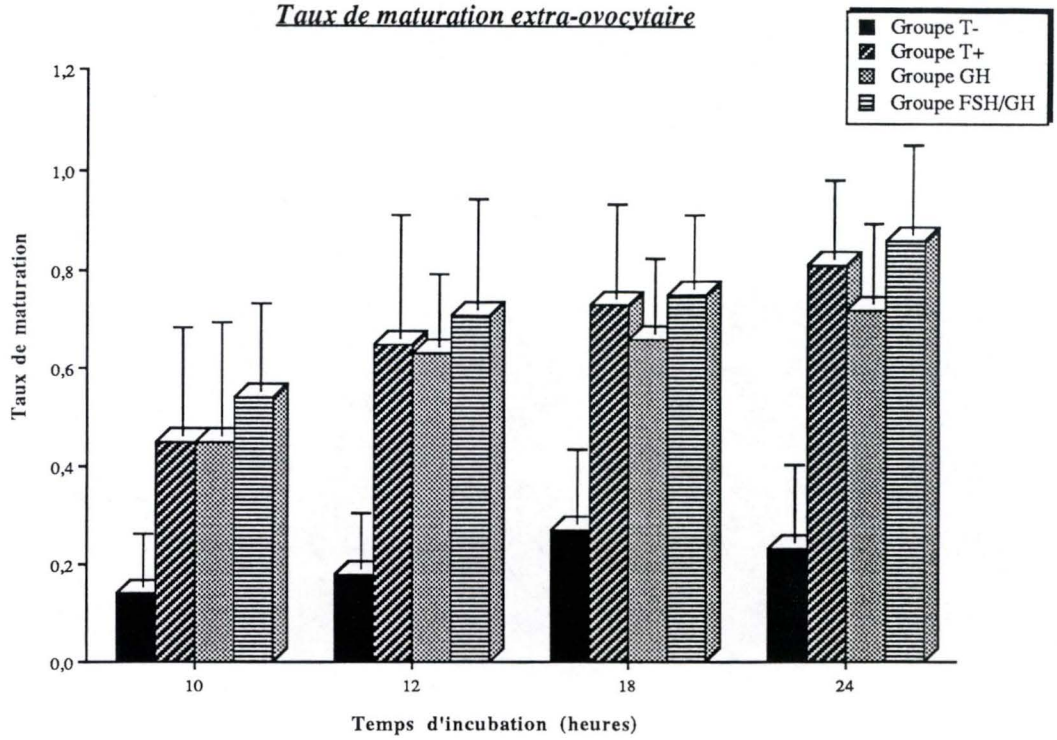
Le TMN et le TME du groupe T⁻ ne présentent pas de différences significatives pour les temps 10, 12, 18 et 24 heures de maturation. Ils sont compris entre $0,14 \pm 0,11$ et $0,29 \pm 0,07$.

Pour le groupe GH, il est possible d'observer, ce après 10 heures d'incubation, une nette différence ($P<0,05$) entre le TMN et le TME Ils se situent respectivement à une valeur de $0,48 \pm 0,22$ et $0,25 \pm 0,12$. Les TME du temps 18 et 24 heures ($0,66 \pm 0,15$ et $0,72 \pm 0,16$) sont également plus importants ($P<0,05$) que les TMN de ces même temps ($0,53 \pm 0,17$ et $0,59 \pm 0,17$).

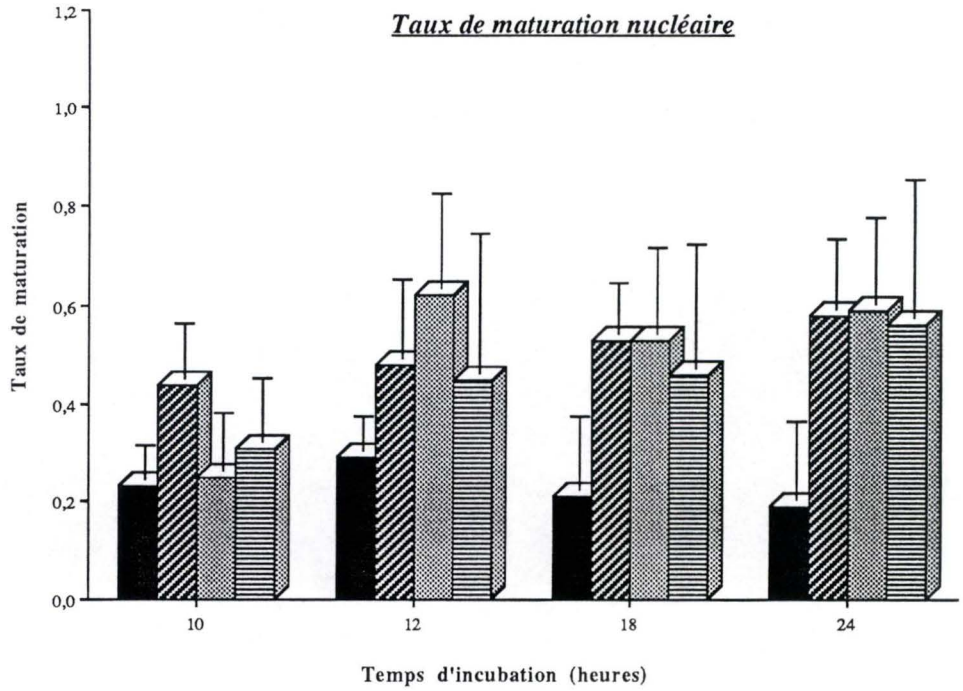
La différence entre les TME et TMN du groupe FSH ne se marque qu'après 18 heures ($P<0,05$) d'incubation *in vitro*. Passé ce délai, l'importance de la différence ne change plus.

Le groupe FSH/GH présente tout au long de la marturation un TMN inférieur à celui du TME ($P<0,05$), mais tous montrent une légère croissance au cours du temps.

Taux de maturation extra-ovocytaire



Taux de maturation nucléaire



II.4.1.6. Conclusion

Il semble que les trois groupes traités réagissent, par une augmentation de leurs TM au cours du temps. Une différence notable est établie entre les groupes traités, qui présentent des TM plus importants que les TMN ou TME du groupe témoin négatif.

Une autre observation possible est que les valeurs des TMN, sont dans la majorité des cas, excepté les temps 10 et 12 heures du groupe T^-, inférieures au TME.

Les observations obtenues par l'analyse des expansions des cumulus sont confirmés, par les observations des TMN.

II.4.2. Effets de la GH sur la fécondation ovocytaire

Les résultats du premier essai n'ayant pas montré d'effet potentialisateur de la GH et de la FSH lors de la maturation ovocytaire, nous avons donc éliminé le groupe GH/FSH lors de ce second essai pour ne conserver que les trois groupes d'ovocytes.

Afin de déterminer l'influence de la GH sur la fécondation ovocytaire, nous avons, après maturation *in vitro*, sélectionnés les COC présentant une nette expansion du cumulus et les avons placés selon les trois conditions de fécondation :

Conditions MIV et FIV	Composition des puits de fécondation
Groupe T^-	Milieu de fécondation sans complément d'hormone
Groupe T^+	Milieu de fécondation complémenté en FSH 100 ng/ml
Groupe GH	Milieu de fécondation complémenté de GH 50 ng/ml

II.4.2.1. Estimation des TF après coloration des ovocytes

Le succès de la FIV est généralement déterminé par l'observation des pronuclei (PN) 17 heures après l'insémination *in vitro*. Cette mise en évidence est réalisée après fixation et décoloration des œufs potentiels dans le mélange acide acétique/éthanol ou après coloration au fluorochrome (Hoechst).

Au cours de nombreux essais, les deux méthodes de coloration utilisées ne nous ont pas permis de mettre en évidence des œufs 2PN ou polyspermiques. La présence des PN mâle et femelle dans l'œuf n'étant pas une phase stationnaire, le moment auquel les fixation et coloration sont effectuées peut ne pas convenir. De plus, quelle que soit la coloration utilisée, l'observation du matériel chromosomique est rendue difficile par la présence de quelques cellules résiduelles du cumulus entourant l'ovocyte et par le nombre important de têtes de spermatozoïdes dans la zone pellucide (photo).

Date	*Groupe T-*	*Groupe T+*	*Groupe GH*
17/04/97	0,57	0,58	0,21
24/04/97	0,25	0,43	0,67
28/04/97	0,00	0,50	0,67
19/06/97	0,22	0,09	0,25
23/06/97	0,33	0,00	0,27
26/06/97	0,30	0,46	0,57
Moyenne	**0,28**	**0,34**	**0,44**
Ecart type	**0,18**	**0,24**	**0,22**

Tableau 3.6: *Taux de fécondation obtenus au sein des 3 groupes expérimentaux après 96 heures de culture embryonnaire lors de 6 tentatives.*

Afin d'éviter de procéder à de nouvelles mises au point et de valider notre technique de maturation et fécondation *in vitro* sur le potentiel de développement embryonnaire, nous sommes passé à l'étape suivante à savoir la détermination du TF sur base des résultats de clivage embryonnaire.

II.4.2.3. Estimation des TF et de la qualité du clivage embryonnaire

Une autre méthode d'estimation du taux de fécondation est la culture embryonnaire. Cette étape ultérieure met également en évidence l'influence des différents traitements imposés durant les phases de maturation et fécondation sur la qualité du clivage.

Après maturation et insémination *in vitro*, les trois groupes d'ovocytes sont placés dans les conditions de culture embryonnaire décrites dans le matériel et méthodes. Le nombre d'œufs clivés et la qualité du clivage embryonnaire sont déterminés au sein de chaque groupe après 96 heures de culture embryonnaire. Pour rappel, la qualité du clivage embryonnaire est estimée par le stade de division (nombre de cellules) ainsi que par la classe ou la symétrie/asymétrie du clivage. Il existe cinq classes différentes, la première (classe 1) correspond à une (des) division(s) parfaitement symétrique(s), alors que la dernière (classe x) révèle une qualité de clivage tout à fait différentielle.

A) Le taux de fécondation

Le tableau 3.6 reprend les TF obtenus au sein de chaque groupe après 96 heures de culture embryonnaire.

Le **groupe** de COC $\underline{T^-}$ présente un TF de 0,28 ± 0,18. Sur les six tentatives, nous obtenons un TF minimum de 0,00 et un maximum de 0,57.

Le **groupe** $\underline{T^+}$ présente un TF moyen de 0,34 ± 0,24. Par comparaison avec la moyenne obtenue au sein du groupe T^-, la présence de FSH durant la maturation et la fécondation des ovocytes n'a pas d'effets sur le TF.

Bien que la même procédure expérimentale aie été appliquée d'une tentative à l'autre, nous remarquons, au sein de ce groupe, une plus forte variabilité au sein des TF. En effet, ceux-ci varient d'un minimum de 0,00 à un maximum de 0,58.

Le **groupe** de COC maturés et fécondés dans du milieu complémenté en **GH** présente un TF de 0,44 ± 0,22 soit plus élevé que ceux des groupes T^- et FSH (non significatif). A nouveau, nous remarquons une variabilité élevée d'une culture à l'autre, avec des TF variant de 0,21 à 0,67.

	Caractéristiques embryonnaires					
	Groupe T- (n=12)		Groupe T+ (n=19)		Groupe GH (n=24)	
Stade	n	%	n	%	n	%
1	0	**0**	3	**16**	0	**0**
2	2	**15**	1	**5**	0	**0**
3	0	**0**	0	**0**	0	**0**
4	0	**0**	1	**5**	6	**25**
5	0	**0**	1	**5**	0	**0**
6	2	**15**	4	**21**	3	**13**
8	0	**0**	4	**21**	1	**4**
10	1	**8**	0	**0**	2	**8**
12	2	**15**	2	**11**	1	**4**
14	1	**8**	1	**5**	0	**0**
16	0	**0**	0	**0**	1	**4**
≥18	1	**8**	0	**0**	5	**21**
ND	3	**23**	2	**11**	5	**21**
Classe	n	%	n	%	n	%
1	4	**33**	10	**56**	7	**29**
2	4	**33**	6	**33**	10	**42**
3	1	**8**	0	**0**	2	**8**
4	0	**0**	0	**0**	0	**0**
x	3	**25**	3	**17**	5	**21**

Tableau 3.7 *Estimation de la qualité du clivage embryonnaire obtenus au sein des différents groupes expérimentaux après 96 heures de culture in vitro. (ND: Non Déterminé)*

B) La qualité du clivage embryonnaire

Le tableau 3.7 reprend les stades et classes embryonnaires obtenus après 96 heures de culture au sein des groupes T^-, T^+ et GH lors de 6 tentatives de clivage embryonnaire.

Parmi les 12 embryons constituant le **groupe T^-**, 9 atteignent des stades de 2 à 18 cellules et plus. Parmi ceux-ci, 8 présentent un clivage relativement symétrique (classe 1 et 2), et un seul s'est divisé asymétriquement (classe 3). Trois présentent de multiples fragments cellulaires (fragmentés ou de classe x).

Les stades cellulaires atteints par les embryons du **groupe T+** varient de 1 à 14 cellules avec une majorité d'embryons au stade de 6 à 8 cellules (soit 8 embryons). La majorité des embryons se sont clivés de façon relativement symétrique *in vitro* (10 embryons de classe 1 et 6 embryons de classe 2) alors qu'une partie (3 embryons) présente de nombreux fragments cellulaires.

Les embryons du **groupe GH** atteignent des stades allant de 4 à 18 cellules et plus (soit 19 embryons sur un total de 24). Plus de 70 % des oeufs clivés sont de bonne qualité (7 embryons de classe 1 et 10 embryons de classe 2) alors que 5 embryons sont fragmentés.

II.4.2.4. Conclusions

Au cours des 6 tentatives de fécondation et de culture embryonnaire *in vitro*, les TF obtenus pour le groupe T- sont, à quatre reprises, inférieurs aux valeurs observées pour les groupes T+ et GH. Les quelques tentatives ne nous permettent pas de dégager un effet significatif des traitements, mais elles mettent cependant en évidence un effet favorable de l'une ou l'autre hormone sur les processus de fécondation *in vitro*.

Le stade cellulaire minimum est 2 cellules pour le groupe T^-, 1 cellule pour le groupe T^+ et 4 cellules pour le groupe GH. Le nombre d'embryons atteignant un stade supérieur ou égal 16 cellules est de 2 pour le groupe T^-, 0 pour le groupe T^+ et 5 pour le groupe GH. La qualité du clivage, légèrement inférieure au sien du groupe GH, ne semble pas être influencé par les différents traitements hormonaux administrés in vitro. En effet, les proportions d'embryons de classes 1 et 2 sont relativement semblables d'un groupe à l'autre ainsi que le nombre d'embryons fragmentés ou de classe x. A nouveau, un échantillon plus important devrait nous permettre de dégager des conclusions plus fondées quant à l'influence des différentes différentes hormones additionnées *in vitro* sur la qualité du clivage embryonnaire.

QUATRIEME PARTIE:

DISCUSSION

EFFET DE LA GH SUR LES PERFORMANCES DE REPRODUCTION DES BREBIS.

En début de saison de reproduction

L'essai portant sur le début de saison de reproduction commence en Juillet 96 et porte sur 47 brebis Suffolk ou croisées Suffolk laitiers. Parmi ces brebis, 24 constituent le lot témoin et les 23 autres reçoivent une injection quotidienne de 6 mg de rbGH sur une période de 17 jours, soit la durée du cycle oestral.

Après 21 jours, soit 4 jours après l'oestrus, les brebis sont endoscopiées en vue du comptage des corps jaunes et, au jour 42, l'échographie renseigne sur le nombre de foetus portés par les brebis.

Les **TO** que nous observons sur les brebis qui ont ovulé ne présente pas de différence significative selon le traitement (1,7 pour les brebis témoins et 1,8 pour les brebis traitées à la rbGH). Les valeurs obtenues pour les animaux non traités sont très élevées par rapport à notre troupeau; jamais au cours des essais précédents réalisés sur les Suffolk du C.R.O., il n'a été enregistré un TO supérieur à 1,4 et ce, que ce soit en saison ou en contre saison si les animaux n'avaient pas reçu une stimulation à la mélatonine ou à la GH. Lagache (1994) observait un TO en début de saison de 1,0 sur les brebis qui ovulaient; Noël *et al.* (1994) a publié des résultats identiques. Cependant, dans d'autres troupeaux, un TO de 1,7 est considéré comme normal (Waterhouse, 1997).

Le nombre de brebis qui n'ont pas ovulé en cette période de l'année n'a pas été influencé par le traitement à la GH (6 dans chaque lot).

Si les résultats ne coïncident pas avec les essais antérieurs au laboratoire, c'est peut être du à l'excellent état des animaux qui a entraîné un excellent TO. Les résultats obtenus après administration de rbGH sont, par contre, semblables à ceux obtenus précédemment dans les mêmes conditions (Lagache, 1994).

Les valeurs que nous avons obtenues sont en concordance avec ceux de Gong *et al.* (1993) qui n'observent pas d'effets de l'administration de rbGH à des brebis sur le TO. Ces chercheurs n'avaient cependant pas effectué un traitement aussi long que celui de Lagache ou le nôtre.

Le **nombre de foetus** par brebis gestante déterminé lors de l'échographie est pour les deux lots de 1,8 ± 0,4. Ces valeurs sont semblables à celles trouvées dans la littérature pour des brebis n'ayant subi aucun traitement, mais à nouveaux, bien supérieures à celles obtenues précédemment dans le troupeau du C.R.O.. La GH n'a pas influencé le nombre de foetus par brebis gestantes. Elle n'a pas non plus influencé le taux de fécondation puisqu'en début de gestation, l'échographie a diagnostiqué 6 brebis pleines dans chacun des lots. Il est difficile d'attribuer une cause à ce faible taux de brebis gestantes (6/20 brebis ovulant dans chaque groupe); les résultats en début de saison sont toujours faibles et ce phénomène est bien connu. On pourrait cependant suspecter un effet de stress imposé aux animaux lors de l'endoscopie, stress défavorable sur les processus de nidation des embryons.

Lors des **mises bas**, nous observons que l'administration de GH à un troupeau de brebis en début de saison a pour effet d'augmenter significativement la fertilité. En effet, le lot traité présente une fertilité de 26% qui est supérieure ($P<0,05$) à celle du lot témoin (21%). La prolificité est également augmentée (1,0 pour le lot témoin et 1,3 pour le lot traité), mais pas de façon significative. Onze des 12 brebis diagnostiquées gestantes ont effectivement mis bas. Cependant, parmi les 10 brebis chez qui on avait observé 2 foetus lors de l'échographie, 7 n'ont eu qu'un agneau et une brebis n'a pas agnelé. Il se serait donc produit des avortements partiels en grand nombre, mais en proportions identiques dans les deux lots.

Il est difficile d'incriminer la technique d'échographie car, normalement, l'opération ne déclare que des foetus réellement observés et, par ailleurs, en aucun cas, le nombre de foetus n'a été supérieur au TO. Les raisons de cette perte foetal tardive ne sont pas connues.

En milieu de saison de reproduction

L'essai effectué en milieu de saison débute en octobre 1996 avec 89 brebis Suffolk ou croisées Suffolk laitier. 47 de ces brebis constituent le lot témoin, et les 42 autres le lot traité par injection quotidienne de 6 mg de rbGH. Les animaux traités reçoivent une injection intramusculaire depuis le jour 15 jusqu'à leur insémination naturelle. Après les fécondations, chaque lot est divisé en deux groupes et dans chacun des lots, les brebis d'un des deux groupes reçoivent pendant 30 jours une injection quotidienne de même importance. Les endoscopies n'ont pas été réalisées, pour cet essai, afin d'éviter de trop importantes perturbations des brebis.

A l'**échographie**, nous n'avons, pour cette période, pas pu mettre en évidence un effet de la GH sur le nombre de foetus portés par brebis gestante. Ce nombre est compris pour les quatre lots entre 1,7 ± 0,6 et 1,9 ± 0,7.

Une étude plus attentive montre cependant que 7 des 47 brebis non traitées à la rbGH avant l'ovulation ont été diagnostiquées vides alors que toutes ont été déclarées pleines lorsqu'elles ont reçu de la rbGH pendant 16 jours avant l'ovulation. La GH administrée pendant le cycle précédent l'insémination semble donc aussi avoir un effet favorable sur la fécondation et/ou sur le nombre de femelles ovulant.

Le nombre de foetus par brebis mise à la lutte n'est pas significativement modifié suite au traitement à la rbGH mais semble légèrement plus important pour les groupes recevant un traitement avant insémination (1,7±0,6 pour le lot GH/GH et 1,8±0,5 pour le groupe GH/T$^-$) que pour le lot non traité avant insémination (1,6±0,8 pour le groupe T$^-$/T$^-$ et 1,5±1,0 pour le groupe T$^-$/GH). La différence est due, bien entendu, au nombre de brebis non gestantes.

A l'**agnelage**, la fertilité des groupes traités avant fécondation est supérieure ($P<0,05$) à celle des groupes non traités durant cette même période. Nous obtenons en effet, une fertilité de 89% et 83% pour les groupes GH/T$^-$ et GH/GH, alors que les groupes T$^-$/T$^-$ et T$^-$/GH ne présentent qu'une fertilité de 79 et 61%. Ceci est la suite logique des résultats de l'échographie qui avait déclaré gestantes toutes les brebis traitées avant l'ovulation.

La prolificité semble légèrement supérieure pour les groupes traités après l'insémination (1,9±0,7 et 1,8±0,6 pour T$^-$/GH et GH/GH, alors que nous obtenons pour le groupe T$^-$/T$^-$ une prolificité de 1,7±0,6 et le groupe GH/T$^-$ montre une prolificité de 1,7±0,6), mais cette différence n'est pas significative.

Par contre, si on analyse le nombre de brebis déclarées gestantes mais qui n'ont pas agnelé, une différence est mesurée: le taux d'avortement tardif est de 8/46 (17 %) chez les brebis traitées à la rbGH en début de gestation et de 4/43 (9 %) chez les autres. Il est possible que la GH, ou plutôt l'arrêt de son administration, ait perturbé le bon déroulement de la gestation, mais il est difficile de comprendre pourquoi cet effet s'est fait sentir plus d'un mois après l'arrêt du traitement.

En général

Quelle que soit la saison, la GH influence la fertilité de manière positive lorsqu'elle est administrée durant le cycle qui précède l'ovulation. Par contre, lorsque la GH est administrée en début de gestation, elle diminue (non significativement) le taux de fertilité mesurée soit à l'échographe au 42èmejour soit à la mise bas, et pourrait avoir un effet néfaste sur la poursuite de la gestation.

Mais contrairement aux résultats antérieurs du laboratoire, nous n'avons observé ni d'augmentation du TO, ni de la prolificité.

EFFET DE LA GH SUR LA MATURATION OVOCYTAIRE, LA FECONDATION ET LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE.

Pour tester les effets de la GH sur les taux de maturation extra-ovocytaires (TME) et les taux de maturation nucléaires (TMN), nous avons ponctionné des complexes ovocytes-cumulus (COC) pour les répartir ensuite en 4 groupes:

- Le groupe T- incube dans du MIV sans complément hormonal
- Le groupe T+ incube dans du MIV complémenté de FSH à 100 ng/ml
- Le groupe GH incube dans du MIV complémenté de GH à 50 ng/ml
- Le groupe FSH/GH incube dans du MIV complémenté de ces deux hormones aux même concentrations que citées précédemment.

Maturation in vitro

La comparaison des TME et des TMN est toujours en faveur de l'expansion du cumulus, signe que cette étape de la MIV est plus aisée à induire que l'étape nucléaire. Il existe cependant une bonne corrélation entre les observations.

L'ajout de FSH et/ou de GH a pour effet d'augmenter significativement les taux de maturations, qu'ils soient extra-ovocytaires ou nucléaires. La somme des deux hormones semble voir un effet cumulatif sur l'expansion du cumulus puisque les moyennes sont, pour chaque temps, légèrement supérieures à celles obtenues au sein des groupes T-, FSH seul ou GH seul. Cependant, nous n'avons pas pu mettre cet effet en évidence par analyse statistique, et l'étude comparative du TMN ne confirme pas ce résultat.

Nous remarquons, avec la GH, une légère accélération de la maturation nucléaire, phénomène également observé par Izadyar et al. (1993), qui notent l'accélération significative de l'expansion du cumulus, ainsi que l'accélération de la maturation nucléaire en présence de GH.

La présence de FSH semble par contre ralentir la maturation nucléaire mais cet effet n'est pas significatif et pourrait être un artefact car il n'est pas confirmé lors de l'étude de l'expansion du cumulus.

En conclusion, la FSH et la GH semblent posséder une action similaire sur la maturation des COC *in vitro* et peuvent être utilisé indifféremment à cet effet, mais leurs effets ne semblent pas être cumulatifs, tout au moins aux concentrations utilisées dans nos essais.

Fécondation in vitro

Si l'addition de FSH ou/et de GH est poursuivie dans le milieu préparé pour la FIV, on observe lors de la plupart des essais un effet optimum de la GH alors que la FSH ne présente plus d'effets positifs. Malheureusement, les analyses statistiques que nous avons effectuées ne confirment pas cette tendance, principalement en raison des variations enregistrées d'un essai à l'autre. Ces variations peuvent être dues à des paramètres non maîtrisés lors de la récolte et du transport des ovocytes. Il paraît nécessaire de poursuivre cet essai afin de confirmer ou infirmer cette tendance.

Développement embryonnaire

En raison de la difficulté d'estimer la réussite de la FIV par l'observation des pronuclei, beaucoup de chercheurs ont opté pour l'étude directe du clivage embryonnaire; son apparition étant un signe certain d'une fécondation. Ceci a permis d'étudier l'effet de la FSH ou de la GH sur la qualité des embryons.

L'analyse des stades de clivage atteints après 96 heures (tableau 3.7) montre que la GH stimule la division cellulaire. Cependant, si la qualité des embryons (classe) est prise en compte, on n'observe plus de différence en faveur de la GH. En effet, en estimant que pour pouvoir être transplanté, un embryon doit être de classe 1 ou 2 et avoir atteint ou dépassé un stade de 8 cellules, nous avons obtenus respectivement pour les T-, T+ et le groupe GH 4/12, 4/19 et 6/24 embryons de bonne qualité (soit 33, 21 et 25 % des embryons obtenus). Les différences ne sont pas significatives en raison de la taille de l'effectif.

Nous observons de fortes variations du taux de clivage d'un essai à l'autre. Aucun paramètre du protocole n'étant modifié d'une fois à l'autre, nous ne pouvons qu'incriminer la qualité des ovocytes. Les ovaires proviennent en effet d'animaux d'abattage sur lesquels nous n'avons aucun contrôle.

Izadyar cite l'effet positif de la GH sur le nombre de blastomères.

Nous observons également, au sein de nos cultures des embryons anormaux, mais nous ne sommes pas parvenus, contrairement à Izadyar et al. (1995) à montrer une amélioration de la qualité du clivage suite à l'action de la GH.

Conclusion sur les résultats "in vitro"

Finalement, en ce qui concerne les techniques *in vitro*, il ressort que l'adjonction de FSH et/ou de GH dans le milieu de maturation présente un intérêt certain et qu'une hormone peut être utilisée à la place de l'autre sans effet cumulatif. Les effets des ces hormones au cours de la FIV ou du développement embryonnaire n'ont pas pu être mis statistiquement en évidence, même si une tendance favorable est à mettre à l'acquis de la GH lors de la FIV.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adams N.R., Atkinson S., Martin G.B., Briegel J.R., Boukhliq R. & Sanders M.R. (1993). Frequent blood sampling changes the plasma concentration of LH and FSH and the ovulationrate in Merino ewes. J. Reprod. Fert. 99

Alberts B., Dennis B., Julian L., Martin R., Keith R. and James D. (1989). Biologie moléculaire de la cellule. Editions Médecine-Sciences Flammarion., Paris.

Alberts B., Dennis B., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J.D., (1990). Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc. New York and London Second Edition.

Bachvarova R., De Leon V., Johson A., Kaplan G., & Paynton B.V., (1985) Changes in total RNA, polyadenylated RNA, and actin mRNA during meiotic maturation of the mouse ovocytes Dev. Biol., 108

Barreca A., Minuto F., Volpe A., Cecchelli E., Cella F., Del Monte P., Artini P, & Giordano G. (1990). Insulin like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I binding protein in the follicular fluid of growth hormone treated patients. Clinical Endocrinology 32.

Bicsak T.A., Shimonoka M., Malkowski M. & Ling N. (1990). Insulin growth factor-binding protein (IGF-BP) inhibition of granulosa cell fonction : Effect on cycle adenosine 3'5'-monophospate, desoxyribonucleic acid synthesis, and comparison with the effect of an IGF-I antibody. Endocrinology 126.

Bister et Paquay (1986). Cours de physiologie animale.

Catt et Dufau M.L. (1991). Gonadotropic hormones: biosynthesis, receptors and action. In : Yen S.S.C & Jaffe R.B. (Eds) "Reproductive endocrinology" W.B. Saders Company

Christmans G.M., & Halme J.K. (1992). Growth hormone : revisited Fertility and Sterility.

Cognie Y., (1988). Nouvelles méthodes utilisées pour améliorer les performances de reproduction chez les ovins. Production animale.

Cox J.F., Hormazabal J. & Santa Maria A. (1993). Effect of the cumulus on in vitro fertilization of bovine matured oocytes. Therio Genology.

Coxam V., Davicco M-J., Pastoureau P., Delmas P.D. & Barlet J-P. (1992) Insulin-like growth factor-II increase plasma osteocalcin concentration in newborn lambs. Bone Miner 177

Crozet (1989). Nucleolar structure and RNA sunthésis in mammalian oocytes. J. Reprod. and Fert.

Crozet N. (1991 a). La fécondation in vivo et in vitro. Dans : La reproduction chez les mammifères et l'homme de Thibault C. et Levasseur M.C. Editions INRA, Paris.

Dadoune et Demoulin (1993). La fonction ovarienne. Dans : La reproduction chez les mammifères et l'homme de Thibault C., Levasseur M.Ç., Editions Ellipses, Paris.

Debry J.M. (1988). Human amniotic fluid use and IVF; recent development. 5th annual ESHRE meeting Malö; Sweden.

DeChiara T.M., Efstradiadis A. & Robertson E.J. (1990) A growth-defiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor-II gene disrupted by targetting Nature 345

Derivaux J. & Ectors F. (1986). Reproduction chez les animaux domestiques, CABAY, Louvain-La-Neuve.

Driancourt M.A. (1987). Ovarian features contributing to the variability of PMSG-induced ovulation rate in sheep. J. Reprod.Fert.

Driancourt M.A., Gougeon A., Royere D., Thibault C., (1991). La fonction ovarienne. Dans : La reproduction chez les mammifères et l'homme de THIBAULT C., LEVASSEUR M.C., Editions Ellipses, Paris.

Fortune J.E. (1994) Ovarian follicumlar growth and developpement in mammlas. Biol£. Reprod.

Fortune J.E., Sirois J. et Quirck S.M., (1988). The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine oestrus cycle. Theriogenology.

Fortune J.E. & Vincent S.E. (1983). Progesterone inhibits the induction of aromatase activity in rat granulosa cells in vitro

Fry R.C., Clarke I.j. & Cahill L.P. (1987). Changes in gonadotropin concentrations are not necessarily involved in ovarian compensation after unilateral ovariectomy in sheep. J. Reprod. Fert 79

gianaroli L., Seracchioli R., Ferraretti AP., Trounson A., Flamigni C. and Bovicelli L., (1986). The successful use of human amniotic fluid for mouse embryos culture and human in vitro fertilization, embryo culture and transfer.
Fertil. and Steril.

Gianaroli L., Trounson A., King C., Chiappazzo L., Ferraretti A. and Bafaro G. (1989). Human amniotic fluid for fertilization and culture of human embryos : results of clinical trials in human in vitro fertilization (IVF) programs.

Gong J.G., Bramley T.A.& Webb R. (1993). The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian follicular growth and development in heifers. J. Reprod. Fert. 97

Hill J.L. (1994). The effect of an ovine oviducal estrus-associated glycoprotein on the embryo clivage and blastocyst formation rates. Theriogenology 41

Jean M., Barriere P., Sagot P., L'hermite A., and Lopes P., (1992). Utility of zona pellucida drilling in cases of severe semen alteration in man.

Kelly P.A., Ali S., Rosaki M., Goujon L, Nagano M., Pellegrini I, Gould D., Djiane J., Edery M., Finidori J. & Postel-Vinay M.C. (1993) The growth Hormone/Prolactin Receptor Family. Recent progress in hormone research. 48

Kineman R.D., Henricks D.M., Faught WJ. & Frawley L.S. (1991) Fluctuation in the proportion of growth hormone - and prolactine - secreting cells during the bovine oestrus cycle. Endocrinology 3(129)

Langlais J. et Roberts K.D. (1985). Molecular membrane model of sperm capacitation & the acrosome reaction of mammalom spermatozoa. Gamete Research.

Le Cam A. & Legraverend C. (1993). Mode d'action de l'hormone de croissance Médecine /Sciences 9

Leclerq L. (1994). Première approche de la maturation et de la fécondation in vitro de l'ovocyte ovin

Lippe B.M., & Nakamoto J.M. (1993). Conventional and nonconventional uses of growth hormone. Recent progress in hormone research. 48

Long J.A., Dickey J.F., & Bodine A.B. (1994). Bovine oviduct epithelial cell monolayer produce proteins wich support embryoniuc developpement beyond the 8-cell in vitro block. Biology of Reproduction ,50

Lucy M.C., Collier R.J., Kitchell M.L., Dibner J.J., Hauser S.D., & Krivi G.G. (1993). Immunohistochemical and nucleic acid analisys of somatotropin receptor population in bovine ovary. Biol. Reprod. 48.

MAFEZ (1980).

Marieb, Elaine N.Aanatomie et physiologie humaine de boeck université

Meng L. & Armstrong D.T. (1994). The effects of germinal vesicle on rat oocyte maturation in vitro and development of male pronucleus. Biology of Reproduction.

Mets C.B. et Monroy A. (1985). Biology of fertilization. (Vol. 2 biology of the sperm), academic press; inc. Orlando.

Nagae et al. (1986).

Monget P., Monniaux D. & Durand P. (1989) Localisation, characterisation and quantification of insulin like growth factor-I-binding sites in the ewe ovary. Endocrinology 125.

Moor R.M. & Gandolfi F. (1987) Molecular and cellular changes associated with maturation and early development of sheep eggs J. Reprod. Fert., Suppl.34

Paladini A.J., Pena C. & Poskus E. (1983). Molecular biology of the growth hormone. CRC Critical Review in Biochemistry 1

Page M.D., Dieges C., & Scalon M.F. (1989). Neuroregulation of growth hormone secretion. Biotechnology in growth regulation.

Paquay R. (1989). Physiologie spéciale 2: Physiologie du système endocrinien - Physiologie du système digestif, cours FUNDP, Namur.

Peknicova J., Moos J., Mollova M., Srsen V & Capkova J. (1994). Changes in immunochemical localisation of acrosomel and sperm proteins in boar spermatozoa during capacitation and induced acrosome reaction. Anim. Reprod., Sci.

Perrad et al. (1996). Communication personnelle.

Plachot M. (1988). La maturation ovocytaire. Contraception-Fertilité et Sexualité.

Plaut K., Ikeda M. & Vonderhaar B.K. (1993). Role of the growth hormone and insuline - like growth factor-I in mammary developpement. Endocrinologt 133

Roupas P & Herington A.C. (1989). Cellular mechanism in the processing of growth hormone and its receptor. Mol. Cell. Endocrinol. 61

Sara V.R. & Hall K. (1990). Insulin -like growth Factors and their binding proteins. Physiological Reviews 70

Scaramuzzi R.S., Adams N.R., Baird D.T., Campbellb K., Dowing J.A., Findlay J.K., Hendersen K.M., Martin G.B., Mc Natty K.P., Mc Nelly A.S. & Tsonis C.G. (1993). A model for follicle selection and determination of ovulation rate in the ewe. Reprod. Fert. and Dev.

Skttner A., Clark R.G. FRYklund L. & Robinson I.C.A.F. (1989) Growth response in a mutant Dwarf rat to human growth hormone and recombinant human insulin like growth factor-I. Endocrinology 124.

Smal J. & De Meyts P. (1989). Sphingosine, an inhibitor of protein kinase C, suppresses the insulin-like-effects of growth hormone in rat adipocytes. Proc. Natl Acad. Sci. USA 86

Szoltos (1991). Dans : La reproduction chez les mammifères et l'homme de THIBAULT C., LEVASSEUR M.C., Editions Ellipses, Paris.

Tadir et al. (1991).

Vanderzwalmen et al. (1991).

Wassarman P.M. (1994). Gamete interactions during mammalian fertilization. Theriogenology.

WrightS. (1980). Physiologie appliquée à la médecine. Médecine-Sciences. Deuxième édition francaise. Flammarion.

Yen S.S.C. and Jaffe R.B. (1991). Reproductive Endocrinology. hird Edition. W.B. Saunders Company.T