

Effet d'un traitement a base de GH exogène sur la croissance folliculaire de la jument, en fonction de son état nutritionnel

Par : P. PEUGNET^(1,2,3,4), G. DUCHAMP⁽⁵⁾, F. REIGNET⁽⁵⁾, L. LARDIC^(1,2,3,4), J. DUPONT^(1,2,3,4), E. BARREY^(6,7), D. GUILLAUME^(1,2,3,4).

1) INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

2) CNRS, UMR6175 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

3) Université François Rabelais de Tours, F-37041 Tours, France

4) IFCE, F-37380 Nouzilly, France

5) INRA, UPAO domaine de l'Orfrasière -37380 Nouzilly, France

6)°Unité de Biologie Intégrative des Adaptations à l'Exercice - INSERM 902, Genopole Evry, France.

7) Génétique Animale et Biologie Intégrative, INRA, UMR1313, Jouy-en-Josas, France.

Résumé

Chez l'adulte, l'hormone de croissance (GH) régule le métabolisme de tous les tissus, en particulier de l'ovaire. Elle agit principalement via l'IGF-1 qui prépare l'action de la FSH sur les cellules du follicule ovarien au début de sa croissance. Les taux plasmatiques de GH et d'IGF-1 sont respectivement élevés et bas chez un animal maigre (l'inverse chez un gras). La croissance folliculaire est plus lente chez une jument dont l'apport alimentaire est restreint que chez une jument bien nourrie. Les effets d'un traitement chronique à base de GH exogène ont été testés pour démontrer que les effets du rationnement sur la croissance folliculaire ont notamment pour intermédiaire le système GH-IGF1.

Deux lots de 5 juments de race poneys Welsh ont reçu un régime amaigrissant et les 2 autres lots ont été maintenus gras. Puis, 1 lot de chaque type a reçu une injection matin et soir de GH recombinante. Chez les lots non traités, le taux plasmatique d'IGF-1 est plus élevé chez les grasses que chez les maigres et les deux lots traités répondent également aux injections de GH par une forte montée du taux d'IGF-1. Le ralentissement de la vitesse de croissance folliculaire chez les juments restreintes est confirmé. Le principal effet des injections de GH est la réduction de l'intervalle interovulatoire de près de 5 jours chez les juments maigres. Cependant, aucune différence n'a été observée entre les lots sur les variations des taux plasmatiques de LH, d'estrogène et de progestérone.

Mots clés : GH, IGF-1, croissance folliculaire, nutrition.

Summary

In adults, growth hormone (GH) is a metabolic regulator of all tissues in particularly ovaries. The main effect of GH is through IGF-1 which plays a key role in sensitizing ovarian granulosa cells to FSH action during terminal follicular growth. In restricted feed intake animals, plasma GH and plasma IGF-1 concentrations are higher and lower, respectively (the contrary in fat animals). A long-term feed restriction is associated with reduced follicle development in mares. The effect of a chronic treatment with exogenous recombinant GH was used to demonstrate that the effect of a restricted feed intake on the ovary is partially mediated by the GH-IGF-1 system.

Two groups of 5 Welsh pony mares had a restricted feed intake and 2 others groups are maintained fat. One group of each type received each morning and each evening recombinant GH.

-In the non-treated groups, the plasma IGF-1 concentrations are higher in fat than in thin mares and the 2 treated groups had the same increase in IGF-1 concentration. The low follicular growth in restricted mare is confirmed. The main effect of GH injections is the reduction of 5 days of the interovulatory interval in thin mares. Nevertheless, no difference was observed between groups on plasma LH, estrogens and progesterone.

Key-words : GH, IGF-1, follicular growth, nutrition

Introduction

Chez l'adulte, l'hormone de croissance (GH) sécrétée par l'hypophyse, agit soit directement soit via l'Insulin Like Growth Factor-1 (IGF-1). *In vivo*, GH et IGF-1 ont un rôle certain sur la croissance folliculaire et sur la stéroïdogénèse. L'IGF-1 prépare l'action de la FSH sur les cellules du follicule ovarien au début de sa croissance (Mazerbourg *et al* 2003). D'autre part, chez le Cheval, les taux plasmatiques de GH et d'IGF-1 sont respectivement élevés et bas chez un animal maigre, et *a contrario* bas et élevés chez un animal gras (Salazard-Ortiz *et al* 2011 Guillaume *et al* 2008). Chez un animal gras, cette relation entre les taux plasmatiques des deux hormones est due à l'effet de rétroaction de l'IGF-1 sur la sécrétion de GH qui est principalement lié à l'augmentation des taux de somatostatine (Gahete *et al* 2009). A l'inverse chez un animal maigre, les taux d'IGF-1 restent faibles malgré des taux de GH élevés, probablement en raison des récepteurs hépatiques à la GH dont la fonctionnalité semble dépendre des taux d'insuline (Radcliff *et al* 2006). De plus, un faible état d'engraissement résultant d'un régime spécifique est associé à un développement folliculaire à la fois plus lent et plus réduit en taille (Salazard-Ortiz *et al* 2004, Gastal *et al* 2004). Ces effets ont probablement pour intermédiaire le système GH-IGF-1. Au cours de cette étude, nous avons donc évalué les effets d'un traitement chronique à base de GH exogène sur la croissance folliculaire chez des juments dans différents états nutritionnels.

1. Matériels et méthodes

1.1. Expérimentation animale

Vingt juments de race poney Welsh, âgées de 3 à 6 ans, de l'UEPAO de l'INRA de Nouzilly, appariées en fonction de leur âge et de leur état corporel, sont réparties aléatoirement en 2 groupes : l'un restreint (R), l'autre bien alimenté (BA). L'objectif du rationnement était d'obtenir pour le lot BA des juments ayant une note d'état au alentour de 4 et pour le lot R au alentour de 1 suivant la codification INRA, HN & IE (1997), sans pour autant atteindre des états pathologiques (obèse : 5 ou émacié : 0). Préalablement à l'expérience, les juments étaient au pré, elles sont rentrées en stabulation en novembre soit 8 mois avant l'expérience proprement dite. Les deux groupes reçoivent en plus de la paille *ad libitum*, du foin, de meilleure qualité pour le groupe BA que pour le groupe (R). Le régime du groupe BA est complété d'une ration de granulés. Tous les quinze jours, les juments sont pesées et leur état corporel est évalué. En complément, trois mesures de l'épaisseur de gras sont effectuées sur la croupe, à mi distance entre la pointe tuberosacrale et le haut de la queue, par échographie.

Au sein, de chaque groupe, une jument de chaque paire est traitée avec de la GH recombinante porcine (rpGH) Reporcin® (OzBioPharm Australia). La pureté de cette préparation pharmaceutique préalablement estimée par électrophorèse était de l'ordre de 60%. Les protéines additionnelles proviennent certainement de l'organisme génétiquement modifié ayant fabriqué la GH. Deux injections quotidiennes sous-cutanées de rpGH. La dose quotidienne a progressivement été augmentée en un mois jusqu'à 30 µg/kg. Cette augmentation progressive avait pour but d'éviter l'apparition des réactions inflammatoires préalablement décrites (De Kock *et al* 2001). La dose injectée est calculée à partir du poids vif mesuré avant le début des injections (à J-7, J0 étant le premier jour du traitement).

1.2. Dosages hormonaux

IGF-1, LH, œstrogène et progestérone plasmatique ont été dosés par des méthodes immunologiques préalablement validées dans notre laboratoire.

1.3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées par analyse de variance ANOVA (SAS) : ANOVA simple, pour la durée (en jour) des intervalles interovulatoires et les épaisseurs de gras sous cutané (en mm), ANOVA en données répétées, pour les variations des concentrations hormonales et la croissance folliculaire, en utilisant une période de 3 jours soit comptée positivement à partir de la première ovulation, ou négativement à partir de la seconde.

2. RESULTATS

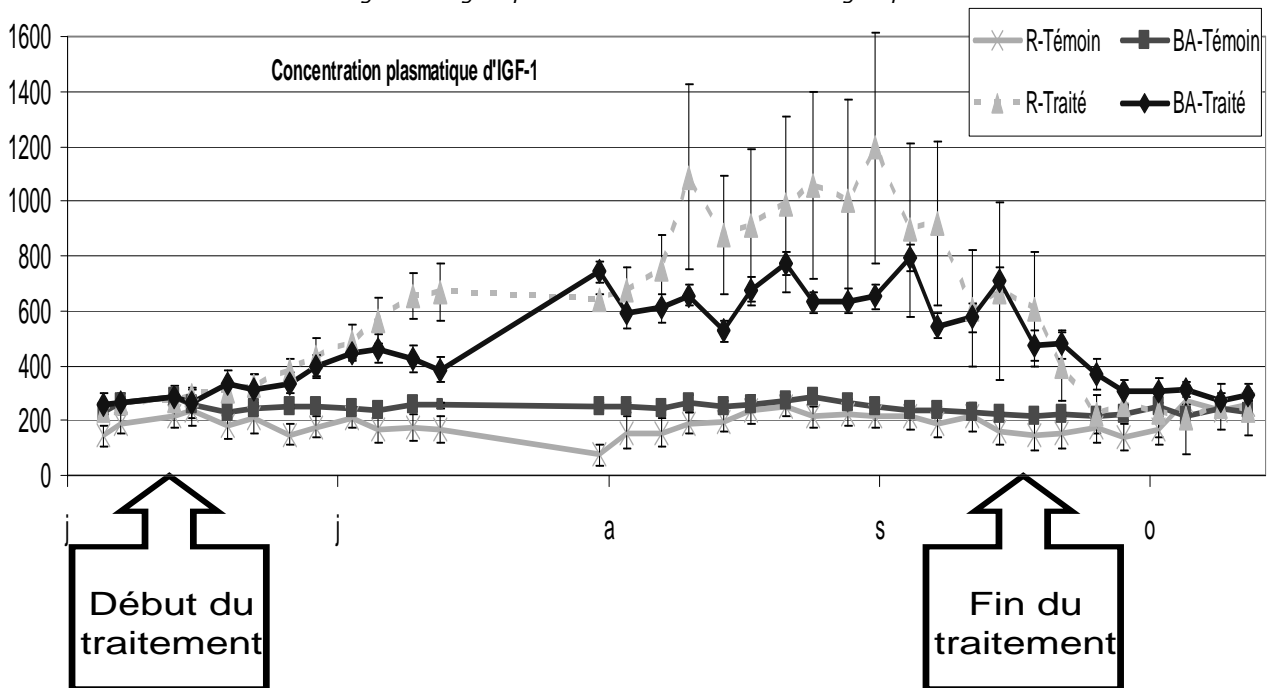
2.1. Poids

Les juments du groupe R ont présenté une perte de poids de 17% au cours de la restriction (54 ± 6 kg). Le groupe BA ayant maigri au début du rationnement, sa ration a été augmentée avant le début du traitement GH.

2.2. IGF-1

Au sein de chaque groupe BA et R, les lots traités présentent des taux plasmatiques d'IGF-1 significativement plus élevés (257 ± 32 ng/mL) que les lots témoins. Dans les lots témoins, le groupe BA présente des taux plasmatiques d'IGF-1 significativement plus élevés que le groupe R ($p < 0,01$). Il est à noter que les deux groupes BA et R, répondent également aux injections de rpGH par une forte montée des taux d'IGF-1 (Figure I).

Figure I : Evolution des taux plasmatiques d'IGF-1 au sein des 4 lots.
Figure II: Igf-1 plasma concentration in the 4 groups.



2.3. Croissance folliculaire par échographie et dosages hormonaux

Une des juments du lot R-traité ayant ovulé pour la dernière fois de la saison et avant le début du suivi échographique, est écartée des analyses. Les intervalles interovulatoires sont significativement plus longs chez les juments R-témoins ($p < 0,01$). L'effet du traitement sur la croissance folliculaire est donc la réduction de cet intervalle de près de 5 jours chez les juments R (Tableau 1). De plus, la durée de l'intervalle est corrélée à l'épaisseur de gras ($r = -0,62$, $p < 0,01$). Aucune différence n'est observée ni sur la somme des volumes de l'ensemble des follicules observés ni sur le diamètre du follicule préovulatoire ni sur les taux de LH et d'œstrogènes totaux, mais le plateau de progestérone semble être plus élevé chez le lot « R traité » que chez les autres lots ($p < 0,01$).

Tableau 1 : Durée de l'intervalle interovulatoire et épaisseurs de gras au sein des quatre lots.
Table 1: Duration of interovulatory interval and fat thickness in the four groups

Lots Groups	Intervalle inter ovulatoire Interovulatory interval (days, mean \pm SEM)	Epaisseur de gras Fat thickness (mm, mean \pm SEM)
BA-traité / Well-fed and treated (n = 5)	21,0 \pm 1,1	22,3 \pm 2,3
BA-témoin / Well-fed and control (n = 5)	23,0 \pm 0,4	22,7 \pm 2,3
R-traité / Restricted and treated (n = 4)	23,7 \pm 1,5	13,4 \pm 1,4
R-témoin / Restricted and control (n = 5)	28,4 \pm 1,4	10,2 \pm 1,0

3. Discussion

Cette étude confirme les résultats précédents concernant les effets d'une restriction alimentaire sur la croissance folliculaire : la croissance folliculaire est plus lente chez une jument restreinte. Par contre, la différence de dynamique folliculaire particulièrement active sur les petits follicules des juments BA et plus lente chez les juments R n'est pas retrouvée ici (Salazar-Ortiz 2004) ni la différence constatée sur le diamètre du follicule préovulatoire (Gastal *et al* 2004). Ceci est probablement dû à l'hétérogénéité de l'état d'engraissement dans les deux lots. Cette étude confirme également que les taux plasmatiques d'IGF-1 sont plus élevés chez les juments BA que chez les R. D'autre part, elle confirme l'efficacité de la GH porcine chez les équins pour augmenter le taux plasmatique d'IGF-1 (De Kock *et al* 2001). La GH exogène a été efficace pour augmenter le taux plasmatique d'IGF-1, que la jument soit bien alimentée ou restreinte. Ceci est relativement inattendu et semble en contradiction avec l'hypothèse du rôle de l'état nutritionnel sur les récepteurs hépatiques à la GH (Radcliff *et al* 2006). La réduction de l'intervalle interovulatoire chez les juments R-traitées est due à une croissance plus rapide du follicule préovulatoire. Les injections de rpGH compensent donc l'effet de la restriction alimentaire sur la vitesse de croissance folliculaire. Probablement qu'une GH de meilleure qualité aurait donné de meilleurs résultats; l'effet inflammatoire du traitement a certainement été à l'encontre des effets espérés. Par ailleurs, aucun effet du traitement rpGH sur les taux hormonaux (LH, oestrogènes et progestérone) n'a été mis en évidence.

De façon pratique: l'état nutritionnel de la jument influence clairement l'activité ovarienne de celle-ci. Une jument grasse risque donc d'avoir plus facilement des doubles ovulations. Par ailleurs, un traitement avec de la GH exogène pourrait constituer un pré traitement efficace pour la superovulation en vue du transfert d'embryon comme cela est envisagé en médecine humaine (Alvigi *et al* 2009).

Remerciements

Nous remercions Dr AF Parlow NHPP pour la fourniture de l'anticorps anti eLH et de la eLH et de la eGH purifiée et Mr J Bernard pour son aide durant l'expérimentation animale.

Références

- Alvigi C, Humaidan P, Howles CM, Tredway D, Hillier SG. 2009. Biological versus chronological ovarian age: implications for assisted reproductive technology *Reproductive Biology and Endocrinology* 7:101
- De Kock SS, Rodgers JP, Swanepoel BC, Guthrie AJ, 2001. Administration of bovine, porcine and equine growth hormone to the horse: effect on insulin-like growth factor-I and selected IGF binding proteins. *J. Endocrinol.* 171:163-171.
- Gahete MD, Durán-Prado M, Luque RM, Martínez-Fuentes AJ, Quintero A, Gutiérrez-Pascual E, Córdoba-Chacón J, Malagón MM, Gracia-Navarro F, Castaño JP. 2009. Understanding the multifactorial control of growth hormone release by somatotropes: lessons from comparative endocrinology. *Ann N Y Acad Sci.* 1163:137-53.
- Gastal MO, Gastal EL, Spinelli V, Ginther OJ, 2004. Relationships between body condition and follicle development in mares. *Anim. Reprod.* 1:115-121.
- Guillaume D, Chaboche S, Salazar-Ortiz J, Leveau M, Monget P, 2008. GH-IGF system and insulin in plasma and preovulatory follicles of well-fed or restricted mares. *International Congress Animal Reproduction 2008-07-13 2008-07-17 Budapest Hungary. Reproduction in domestic animals* 43 Supplement 3 Abst. P230.
- INRA, HN & IE 1997 Notation de l'état corporel des chevaux de selle et de sport. Guide pratique. Eds Institut Elevage Publishing 149 rue de Bercy 75595 Paris, France.
- Mazerbourg S, Bondy CA, Zhou J, Monget P, 2003. The Insulin-like Growth Factor System: a Key Determinant Role in the Growth and Selection of Ovarian Follicles? A Comparative Species Study. *Reprod. Dom. Anim.* 38:247-258.
- Radcliff RP, McCormack BL, Keisler DH, Crooker BA, Lucy MC. 2006. Partial Feed Restriction Decreases Growth Hormone Receptor 1A mRNA Expression in Postpartum Dairy Cows *J. Dairy Sci.* 89:611-619.
- Salazar-Ortiz J, Audouin E, Delpuech T, Monget P, Guillaume D. 2004. Effet du niveau d'alimentation sur la croissance folliculaire et certains taux hormonaux plasmatiques de la jument. 30^{ème} Journée de la Recherche Equine, 3 mars, Paris, édition : Les Haras Nationaux 16 rue Claude Bernard 75231 Paris Cedex 11-18. 3 mars; 15-27
- Salazar-Ortiz, J., 2006. PhD These: "Bilan des effets du niveau d'alimentation sur la reproduction de la jument." Université des Sciences de Tours December the 26th 2006.