

ÉVALUATION D'UN DÉFICIT D'ACTION DES IGF-I CHEZ DES ANIMAUX ATTEINTS DE TREMBLANTE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2006
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Anne-Sophie BOBET

Née, le 31 décembre 1981 à ST-JEAN-D'ANGELY (Charente-Maritime)

Directeur de thèse : **Mme le Docteur Véronique GAYRARD-TROY**

JURY

PRESIDENT :

Mme Marie-Bernadette DELISLE

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :

Mme Véronique GAYRARD-TROY

Mme Nicole HAGEN-PICARD

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

Mlle Catherine VIGUÉ

Docteur Vétérinaire

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	: M.	A. MILON
Directeurs honoraires	M.	G. VAN HAVERBEKE
	M.	J. FERNEY
	M.	P. DESNOYERS
Professeurs honoraires	M.	L. FALIU
	M.	C. LABIE
	M.	C. PAVAU
	M.	F. LESCURE
	M.	A. RICO
	M.	D. GRIESS
	M.	A. CAZIEUX
	Mme	V. BURGAT
	M.	J. CHANTAL
	M.	J.-F. GUELFY
	M.	M. ECKHOUTTE

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M.	BRAUN Jean-Pierre, <i>Physique et Chimie biologiques et médicales</i>
M.	CABANIE Paul, <i>Histologie, Anatomie pathologique</i>
M.	DARRE Roland, <i>Productions animales</i>
M.	DORCHIES Philippe, <i>Parasitologie et Maladies Parasitaires</i>
M.	EUZEBY Jean, <i>Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie</i>
M.	TOUTAIN Pierre-Louis, <i>Physiologie et Thérapeutique</i>

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

M.	AUTEFAGE André, <i>Pathologie chirurgicale</i>
M.	BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy, <i>Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie</i>
M.	DELVERDIER Maxence, <i>Anatomie pathologique</i>
M.	ENJALBERT Francis, <i>Alimentation</i>
M.	FRANC Michel, <i>Parasitologie et Maladies Parasitaires</i>
M.	HENROTEAUX Marc, <i>Médecine des carnivores</i>
M.	MARTINEAU Guy-Pierre, <i>Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour</i>
M.	PETIT Claude, <i>Pharmacie et Toxicologie</i>
M.	REGNIER Alain, <i>Physiopathologie oculaire</i>
M.	SAUTET Jean, <i>Anatomie</i>
M.	SHELCHER François, <i>Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour</i>

PROFESSEURS 2^e CLASSE

Mme	BENARD Geneviève, <i>Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale</i>
M.	BERTHELOT Xavier, <i>Pathologie de la Reproduction</i>
M.	CONCORDET Didier, <i>Mathématiques, Statistiques, Modélisation</i>
M.	CORPET Denis, <i>Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires</i>
M.	DUCOS Alain, <i>Zootéchnie</i>
M.	DUCOS de LAHITTE Jacques, <i>Parasitologie et Maladies parasitaires</i>
M.	GUERRE Philippe, <i>Pharmacie et Toxicologie</i>
Mme	KOLF-CLAUW Martine, <i>Pharmacie - Toxicologie</i>
M.	LEFEBVRE Hervé, <i>Physiologie et Thérapeutique</i>
M.	LIGNEREUX Yves, <i>Anatomie</i>
M.	PICAVET Dominique, <i>Pathologie infectieuse</i>

INGENIEUR DE RECHERCHES

M.	TAMZALI Youssef, <i>Responsable Clinique équine</i>
----	-----------------------------------------------------

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme	MICHAUD Françoise, <i>Professeur d'Anglais</i>
M.	SEVERAC Benoît, <i>Professeur d'Anglais</i>

MAÎTRE DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. JOUGLAR Jean-Yves, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAÎTRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*
M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la Reproduction*
M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
Mme BOUCRAUT-BARALON Corine, *Pathologie infectieuse*
Mlle BOULLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*
Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme BRET-BENNIS Lydie, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie*
Mme CAMUS-BOUCLAINVILLE Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme COLLARD-MEYNAUD Patricia, *Pathologie chirurgicale*
Mlle DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. DOSSIN Olivier, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie du bétail*
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. GUERIN Jean-Luc, *Elevage et Santé Avicoles et Cunicoles*
Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*
M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
Mme MEYNADIER-TROEGELER Annabelle, *Alimentation*
M. MONNEREAU Laurent, *Anatomie, Embryologie*
Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*
Mme RAYMOND-LETRON Isabelle, *Anatomie pathologique*
M. SANS Pierre, *Productions animales*
Mlle TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*

MAÎTRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS

Mlle BIBBAL Delphine, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. CASSARD Hervé, *Pathologie du bétail*
M. DESMAIZIERES Louis-Marie, *Clinique équine*
Mlle LE MINOR Odile, *Epidémiologie*
M. NOUVEL Laurent-Xavier, *Pathologie de la reproduction*
M. REYNOLDS Brice, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. VOLMER Romain, *Infectiologie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

M. CONCHOU Fabrice, *Imagerie médicale*
M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des ruminants*
Mlle LACROUX Caroline, *Anatomie pathologique des animaux de rente*
M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mlle PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*

REMERCIEMENTS

A la présidente de thèse,

Madame le Professeur Marie-Bernadette Delisle

Professeur des Universités

Praticienne hospitalière

Anatomie et cytologie pathologiques

Vous m'avez fait l'honneur de présider le jury de thèse, veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements et de mon profond respect.

Au jury de thèse,

Madame le Docteur Véronique Gayrard-Troy, directrice de thèse

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Physiologie de la reproduction, Endocrinologie

Pour m'avoir proposé ce sujet de thèse, pour m'avoir guidé et soutenu pendant sa réalisation, veuillez accepter l'expression de ma sincère gratitude.

Madame le Docteur Nicole Hagen-Picard

Maître de conférence à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie de la reproduction

Pour m'avoir fait l'honneur de participer au jury de thèse, veuillez recevoir mes hommages respectueux.

Au membre du jury invité

Madame le Docteur Catherine Viguié

Docteur Vétérinaire, chargée de recherche INRA

Physiologie Endocrinologie

Pour avoir encadré ce projet depuis le début, pour avoir participé activement à la réalisation de cette thèse, qu'il me soit permis de vous remercier vivement.

A **mes parents**, pour leur soutien et l'amour qu'ils m'apportent chaque jour. J'ai tant besoin de vous...

A ma **grande sœur** adorée, qui m'est si chère, et à mon **beau frère** Cyril qui m'ont tous les deux bien encouragée ; à mon merveilleux petit filleul Léo-Paul qui a illuminé notre famille le 13 janvier 2006.

A **mamie** et **papi**, des grands-parents exceptionnels que j'aime profondément.

A **pépé** et **mémé**, je pense à vous souvent malgré l'éloignement.

A ma famille toulousaine : tata **Françoise**, **Maurice**, **Mimie**, **Olivier** et **Zabeth** qui sont toujours prêts à me rendre service.

A ma **famille** : mes cousins, cousines, oncles et tantes avec qui j'ai partagé de très bons moments.

A **Carol**, mon amie qui a mis du soleil dans les moments pénibles de la classe préparatoire. Malgré la distance notre profonde amitié perdure, que cela continue.

A **Romain**, mon ami d'enfance avec qui j'ai fait les 400 coups dont une mémorable chute de vélo...et à **Erwan** avec qui j'ai partagé toute ma belle adolescence.

A **Aurélie**, **Julie**, **Juliette** et **Noémie**, en souvenir de tous les moments et les soirées (déguisées ou non...) passés ensemble. Merci pour votre soutien dans les moments difficiles.

A tous mes autres amis de l'école avec qui j'ai partagé toutes ces années : **Cyril**, **Julien**, **Mathieu**, **Valérie**, **Fanny**, **Angy**, **Coco**, **Alien**, **Mélanie**, **Sabrina** et tous les autres...

A tous mes poulots qui m'ont fait passer de supers moments, en particulier : ma petite **Marion**, ma louloutte **Katia**, **Fred**, **Camille**, **Marcho**, **Bubble**, **Rhymbow**, **Rominou**, **Bali** alias Julien de mixx FM, **Deborah**, **Miloute**...

A **Arioso** mon merveilleux cheval qui m'a apporté tant de joie toute ses dernières années (et à son coach **Christophe**, parti trop vite), à mes toutous **Rillette**, **Tiny**, **Vittavi**, et à mes chats **Noisette** et **Minette**.

A **Cyril**, mon petit amour qui me fait voir la vie en rose et avec qui j'aurai grand plaisir à poursuivre ma route le plus loin possible...Merci de m'aimer autant chaque jour et de me surprendre par toutes tes petites attentions. Un grand merci pour ton soutien dans l'élaboration de cette thèse.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS	11
LISTE DES ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION GENERALE	16
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	18
I. LE MODELE DE LA TREMBLANTE	18
I.1 PRESENTATION GENERALE DES ENCEPHALOPATHIES SPONGIFORMES SUBAIGUES TRANSMISSIBLES	18
I.1.1 Les ESST	18
I.1.2 L'agent infectieux	18
I.2 TABLEAU CLINIQUE ET LESIONNEL DE LA TREMBLANTE DU MOUTON. 19	19
I.2.1 Tableau clinique.....	19
I.2.2 Tableau lésionnel	21
I.3 MECANISME DE NEURODEGENERESCENCE	22
II. FONCTION SOMATOTROPE	24
II.1 L'AXE SOMATOTROPE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSAIRE	24
II.2 LES HORMONES DE L'AXE SOMATOTROPE	26
II.2.1 La GHRH.....	26
II.2.2 La SRIH.....	26
II.2.3 La GH	27
II.2.4 L'IGF-I	28
II.3 SCHEMA DE REGULATION.....	30
II.3.1 Rétrocontrôle de l'axe somatotrope.....	30
II.3.2 Facteurs de régulation de la sécrétion de la GH ovine	32
II.4 ROLE ET FONCTION DE L'AXE SOMATOTROPE	34
II.4.1 Fonctions de la GH	34
II.4.2 Fonctions des IGFS	35
III. FONCTION SOMATOTROPE ET SYSTEME NERVEUX CENTRAL.....	36
III.1 FONCTION SOMATOTROPE ET DEVELOPPEMENT DU SNC.....	36
III. 2 FONCTION SOMATOTROPE ET NEUROPROTECTION	36
III.2.1 GH et neuroprotection	36
III.2.2 IGF-I et neuroprotection.....	37

IV. ALTERATION DE LA FONCTION SOMATOTROPE ET TREMBLANTE.....	39
IV.1 MODIFICATION DES CONCENTRATIONS ET SECRETION DE GH CHEZ LES ANIMAUX ATTEINTS DE TREMBLANTE	39
IV.2 ALTERATION DE LA FONCTION DE L'IGF-I ET NEURODEGENERESCENCE DANS LA TREMBLANTE.....	40
OBJECTIF ET HYPOTHESES	41
ETUDE EXPERIMENTALE.....	42
I. MATERIELS ET METHODES	42
I.1 GENERALITES.....	42
I.1.1 Animaux.....	42
I.1.2 Prélèvements de sang et traitement des échantillons	42
I.1.3 Solutions utilisées	43
I.2 PROCEDURE EXPERIMENTALE	43
I.2.1 Suivi des animaux	43
I.2.2 Effet de l'IGF-I sur la sécrétion de la GH.....	44
I.3 METHODE DES DOSAGES	46
I.3.1 Dosage de la GH	46
I.3.2 Dosage du glucose	46
I.3.3 Dosage de l'IGF-I total et libre.....	46
I.4 ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS	47
II. RESULTATS	49
II.1 SUIVIS DES ANIMAUX.....	49
II.1.1 Evolution des poids corporels.....	49
II.1.2 Suivi bi-hebdomadaire des concentrations de GH	50
II.2 EFFET DE L'IGF-I.....	50
II.2.1 Glycémie.....	51
II.2.2 IGF-I total et libre.....	52
II.3 EFFET DE L'IGF-I SUR LES SECRETIONS DE GH BASALES ET INDUITES PAR LA GHRH EN PHASE PRECLINIQUE ET CLINIQUE DE LA MALADIE.....	53
II.3.1 Effet de la perfusion d'IGF-I sur la sécrétion spontanée de GH	53
II.3.2 Effet d'une perfusion d'IGF-I sur les concentrations moyennes en GH induites par la GHRH.....	55
DISCUSSION	59
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	65

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Brebis atteinte de tremblante : cachexie, dépilation, excoriation suite au prurit. (p.19).

Figure 2 : Coupe histologique de cerveau d'ovin atteint de tremblante : vacuolisation du neuropile. (D'après le site internet INRA 2005) (p.20).

Figure 3 : Représentation schématique des mécanismes de neurodégénérescence associés aux encéphalopathies à prion. (D'après Dormont) (p.22).

Figure 4 : Représentation schématique de l'axe somatotrope et régulation de la sécrétion de l'hormone de croissance (GH). (p.24).

Figure 5 : Représentation en 3D de la structure tertiaire des IGFs. (D'après le site internet www.biochem.szote.u.szeged.chu) (p.28).

Figure 6 : Protocole des prélèvements de sang au cours d'une session. (p.44).

Figure 7 : Evolution des poids corporels (moyenne \pm ET) des béliers résistants (ARR, n=5) et sensibles à la tremblante (VRQ, n=5) de 7 à 24 mois. La flèche indique le moment où les premiers signes cliniques ont été observés (Juillet 2004). (p.48).

Figure 8 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques en GH (moyenne \pm ET) chez des béliers, entre 7 mois et 2 ans d'âge, de génotype résistant à la tremblante (ARR) ou sensible (VRQ). Les prélèvements ont été réalisés deux fois par semaine. (p.49).

Figure 9 : Glycémie (moyenne \pm ET) des béliers sensibles (VRQ) ou résistants (ARR) à la tremblante pendant une perfusion de solvant ou d'IGF1 (14 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$) réalisée en phase préclinique (A) ou en phase clinique de tremblante (B) des animaux VRQ. La perfusion de solvant (symboles ouverts) ou d'IGF1 (symboles fermés) a été maintenue pendant 4 heures de $t=0$ min à $t=240$ min (aires grisées). La flèche, à $t=180$ min, indique le moment de l'administration d'un bolus iv de GHRH à la dose de 0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$. (p.50).

Figure 10 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques en IGF-I total (moyenne \pm ET) chez des béliers résistants (ARR) ou sensibles (VRQ) à la tremblante avant et au cours de la perfusion d'IGF-I (14 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$) réalisée en phase clinique de tremblante. La perfusion d'IGF-I (aire grisée) a été maintenue pendant 4 heures de $t=0$ min à $t=240$ min. (p.51).

Figure 11 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques en IGF-I libre (moyenne \pm ET) chez des béliers sains (ARR) et tremblants (VRQ) avant et au cours de la perfusion d'IGF-I (14 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$) réalisée en phase clinique de tremblante. La perfusion d'IGF-I (aire grisée) a été maintenue pendant 4 heures de $t=0$ min à $t=240$ min. (p.51).

Figure 12 : Effet d'une perfusion de solvant ou d'IGF-I recombinante humaine sur les concentrations plasmatiques moyennes (\pm ET) de GH chez des béliers adultes de génotype résistant (ARR) ou sensible (VRQ) à la tremblante. Les perfusions de solvant et d'IGF-I ont été réalisées sur les mêmes animaux à deux reprises par rapport à l'évolution de la maladie chez les animaux VRQ : 1) phase préclinique (A) et 2) début de phase clinique (B). La GH a été dosée dans des prélèvements effectués toutes les 10 minutes, pendant 3 heures avant le début de la perfusion et pendant 3 heures de perfusion de solvant ou d'IGF-I (aires grisées). (p.53).

Figure 13 : Différentiel des concentrations moyennes (\pm ET) de GH en phase préclinique et clinique (moyenne des concentrations en GH après perfusion d'IGF-I ou solvant) – (moyenne des concentrations basales en GH) chez les tremblants (VRQ) et chez les contrôles (ARR) soumis à l'effet des perfusions de solvant ou IGF-I. (p.54).

Figure 14 : Effets d'une perfusion d'IGF-I recombinante humaine sur la sécrétion de GH induite par le GHRH (indiqué par la flèche) ($0.7 \mu\text{g}/\text{kg}$ iv à $t=180 \text{ min}$) chez des béliers contrôles résistants ($n=5$, génotype ARR) ou sensibles ($n=5$, génotype VRQ) à la tremblante. Les béliers ont reçu une perfusion (aires grisées) de solvant ou d'IGF-I ($14 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$) pendant 3 heures précédant l'administration d'un bolus de GHRH ovine ($t=180 \text{ min}$). La GH a été dosée dans des échantillons de sang prélevés toutes les 10 minutes avant la GHRH puis toutes les 5 minutes pendant 30 minutes suivant l'injection de GHRH et toutes les 10 minutes jusqu'à $t=300 \text{ min}$. La perfusion de solvant ou d'IGF-I a été interrompue 1 heure après l'administration de GHRH ($t=240 \text{ min}$). L'expérience a été réalisée durant la phase préclinique (A) et la phase clinique (B) de la maladie des animaux génétiquement sensibles. (p.55).

Figure 15 : Ratio des AUC des concentrations de GH (AUC 1 heure post bolus de GHRH / AUC 1 heure pré bolus de GHRH) sous solvant ou IGF-I en phase préclinique (A) et en phase clinique (B) chez les sains ARR et les tremblants VRQ (p56).

Tableau 1 : Protocole expérimental. (p.43).

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac : Anticorps

AMPc : Adénosine Mono Phosphate cyclique

ARNm : Acide Ribo Nucléique messenger

ATNC : Agent Transmissible Non Conventionnel

AUC : *Area Under the Curve*, aire sous la courbe délimitée par 2 axes, celui du temps et celui des concentrations

ELISA : *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, dosage immunoenzymatique

ESB : Encéphalopathie Spongiforme Bovine

ESST : Encéphalopathie Spongiforme Subaiguë Transmissible

GH : *Growth Hormone*, hormone de croissance

GHRH : *GH Releasing Hormone*

GHRP : *GH Releasing Peptide*

GHRPR : *GHRP Receptor*

GMQ : Gain Moyen Quotidien

icv : intracérébroventriculaire

Ig : Immunoglobuline

IGF-I : *Insulin-like Growth Factor I*

IGFBP : *IGF Binding Protein*

IGFI-R : *IGFI-Receptor*

iv : intraveineux

MCJ : Maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ est le nouveau variant)

Prnp : Gène codant pour la protéine prion

PrP : Protéine prion

PrPc : Protéine du Prion cellulaire

PrPsc : Protéine du Prion “scrapie”, isoforme pathologique de la PrPc

RIA : *Radio Immuno Assay*, dosage radioimmunologique

SNC : Système Nerveux Central

SOCS : *Suppressor Of Cytokine Signaling*, suppresseurs des voies de signalisation des cytokines

SRIH : *Somatotropin Release Inhibiting Hormone*, somatostatine

Génotype ARR : génotype homozygote aux codons 136 (alanine), 154 (arginine) et 171 (arginine) du gène Prnp qui confère le caractère résistant à l'infection par l'agent de la tremblante

Génotype VRQ : génotype homozygote aux codons 136 (valine), 154 (arginine) et 171 (glutamine) du gène Prnp qui confère le caractère très sensible à l'infection par l'agent de la tremblante

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies à prion constituent un enjeu scientifique et économique majeur mais aussi un réel problème de santé publique.

Les Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles (ESST) ont fortement suscité l'intérêt du public et des médias suite à l'émergence de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB), ainsi que sa probable transmission à l'homme sous la forme d'un nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt Jakob (v MCJ).

Malheureusement, ces maladies à prion sont des maladies orphelines sans traitement curatif. Les recherches pour stopper la progression de ces maladies dont l'issue est toujours fatale sont encore insuffisantes. De nombreuses zones d'ombre demeurent dans la connaissance des mécanismes physiopathologiques de ces affections. Une meilleure compréhension de la physiopathologie de ces maladies pourrait ouvrir de nouvelles perspectives pour élaborer des stratégies thérapeutiques et permettre une meilleure prise en charge des malades.

Les altérations endocriniennes, qui existent dans la plupart des pathologies neurodégénératives, font partie des éléments peu ou pas explorés de la physiopathologie des maladies à prion. En particulier, l'impact possible des dysendocrinies sur les phénomènes neurodégénératifs n'a fait l'objet d'aucune étude pour les maladies à prion. Etant donné le rôle important de certains axes endocriniens dans le maintien et la protection du système nerveux central (SNC), il est envisageable que des modifications des fonctions endocriniennes puissent intervenir comme élément clef dans le processus neurodégénératif, que ce soit comme facteur limitant ou *a contrario* comme facteur favorisant. L'étude des troubles neuroendocriniens associés aux maladies neurodégénératives à prion pourrait donc contribuer à une meilleure compréhension du mécanisme neurodégénératif de ces affections, et ainsi servir de base pour de nouvelles approches thérapeutiques.

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à un axe neuroendocrinien reconnu comme un acteur essentiel du maintien de l'intégrité du SNC : l'axe hypothalamo-hypophysaire somatotrope. La tremblante du mouton, une maladie à prion naturelle, a servi de modèle à notre étude. En effet, chez les ovins atteints de tremblante naturelle, on note une augmentation de la sécrétion de l'hormone de croissance (GH), hormone hypophysaire de l'axe somatotrope (Viguié et al., 2004). Aucun mécanisme

expliquant cette augmentation de sécrétion de GH n'a pu être mis en évidence. De même, on ignore sa signification d'un point de vue physiopathologique. L'objectif de ce travail de thèse était de contribuer à la compréhension des mécanismes sous jacents à l'augmentation de la sécrétion de GH. Dans cet objectif, nous avons plus particulièrement exploré deux hypothèses : 1) l'augmentation de la sécrétion de GH chez les animaux atteints de tremblante pourrait être due à une augmentation de la sensibilité hypophysaire à la GHRH hypothalamique (Growth Hormone-Releasing Hormone) et 2) un défaut de rétrocontrôle négatif de l'IGF-I (Insulin-like Growth Factor I) sur la sécrétion de GH pourrait expliquer l'augmentation des concentrations de GH chez les animaux tremblants. Cette dernière hypothèse pourrait se révéler tout particulièrement pertinente sur le plan physiopathologique, dans la mesure où l'IGF-I constitue un facteur majeur de neuroprotection et que tout déficit de ses actions pourrait constituer un facteur aggravant des processus de neurodégénérescence.

Avant de développer notre étude expérimentale, nous présenterons une synthèse bibliographique sur le modèle de la tremblante puis nous exposerons quelques données sur la fonction somatotrope. Nous examinerons enfin les données de la littérature qui concernent l'impact de cette fonction endocrinienne dans les mécanismes de neurodégénérescence.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE MODELE DE LA TREMBLANTE

I.1 PRESENTATION GENERALE DES ENCEPHALOPATHIES SPONGIFORMES SUBAIGUES TRANSMISSIBLES

I.1.1 LES ESST

Les ESST sont des affections neurodégénératives fatales qui touchent l'homme et les animaux. Ce groupe de maladies comprend chez l'animal, la tremblante du mouton, l'encéphalopathie spongiforme bovine, l'encéphalopathie spongiforme féline, l'encéphalopathie spongiforme du vison et le syndrome de dégénérescence chronique des cervidés (« chronic wasting disease »). Chez l'homme, elles sont représentées par le Kuru, la maladie de Creutzfeldt Jakob (MCJ), l'insomnie fatale familiale et le syndrome de Gerstmann Straüssler Scheinker.

Les ESST sont caractérisées par :

- une longue période d'incubation (2 à 5 ans).
- une affection nerveuse d'évolution progressive apyrétique débilante et cachectisante et dont l'issue est toujours fatale.
- des lésions localisées au niveau du SNC : vacuolisation des neurones (spongiose), dégénérescence neuronale et astrocytose.
- une absence de réaction inflammatoire et de réaction immunitaire détectable.
- le dépôt dans le système nerveux d'une isoforme anormale, appelée PrP^{sc} ou protéine du prion « scrapie », d'une protéine endogène, appelée protéine du prion cellulaire (PrP^c) sous forme de fibrilles ou de plaques amyloïdes.

I.1.2 L'AGENT INFECTIEUX

C'est en 1936 que CUILLE et CHELLE ont démontré la transmissibilité de la tremblante. La nature de cet agent n'a pas encore été identifiée avec certitude. Il a été désigné sous l'appellation d'ATNC (Agent Transmissible Non Conventionnel) en raison de sa résistance à la chaleur, aux agents classiques de décontamination et aux radiations. Il diffère des bactéries et virus par sa structure (pas d'acide nucléique) et ses propriétés physicochimiques. Il n'entraîne aucune réaction immunitaire ou inflammatoire systémique.

C'est en 1982 que la nature protéique de l'agent infectieux est définie par PRUSINER. Selon cette théorie, les ESST et donc la tremblante sont dues à un ATNC appelé prion (« proteinaceous infectious particle ») de nature protéique dont le poids moléculaire se situe entre 33 et 35 kDa. Le prion est une isoforme anormale d'une protéine normalement constitutive de l'organisme et fortement exprimée au niveau du SNC: la PrPc ou protéine prion cellulaire.

Selon PRUSINER (1982), la PrPc au contact de l'agent infectieux change de conformation et donne la PrPsc, la protéine pathogène. La différence de conformation se traduit par des modifications de la proportion d'hélices α et de feuillets β dans les structures secondaires (Guilbert., 2001). Ce processus semble facilité par une molécule chaperonne non encore identifiée. Ce changement de conformation confère à la PrP une résistance partielle à la protéolyse par la protéinase K favorisant son accumulation sous la forme d'agrégats de fibrilles et de plaques amyloïdes (Dormont et al., 1995).

I.2 TABLEAU CLINIQUE ET LESIONNEL DE LA TREMBLANTE DU MOUTON

La tremblante est une maladie neurodégénérative enzootique mortelle décrite chez le mouton (*Ovis aries*), la chèvre (*Capra hircus*) et le mouflon (*Ovis musimon*). Elle a été décrite pour la première fois en 1732 en Grande Bretagne. Peu de cas ont été décrits dans l'espèce caprine.

I.2.1 TABLEAU CLINIQUE

De nature neurologique, les symptômes varient en nombre et en intensité selon l'animal et la souche de l'agent infectieux. La tremblante atteint les deux sexes de la même manière.

La forme clinique la plus classique de la tremblante est décrite suivant quatre périodes :

- tout d'abord, on observe une perte de l'instinct grégaire, un prurit localisé à la tête ou à la zone dorsolombaire, une perte de laine due au grattage ainsi que des excoriations par la suite. Quelques jours après l'apparition du prurit, on note une hyperexcitabilité et une hyperesthésie à l'origine d'une agitation anormale s'exprimant par des grincements de dents, des tremblements transitoires de la tête, des troubles de la miction.

- viennent ensuite une aggravation des signes précédents avec incoordination motrice, ataxie et détérioration de l'état général avec conservation de l'appétit. Les tremblements deviennent permanents.

- l'animal est en décubitus transitoire puis permanent avec aggravation des troubles moteurs et des lésions nerveuses.

- enfin, c'est la phase terminale fatale, l'animal cachectique demeure en décubitus latéral. La mort survient dans les heures suivantes.

L'évolution de ce tableau se fait sur 1 à 6 mois sans phase de rémission. La clinique est apyrétique.

Ce tableau clinique d'amaigrissement est associé à un syndrome catabolique marqué (pouvant rappeler le « wasting syndrom » des cervidés). Un tel tableau est compatible avec des troubles métaboliques et/ou endocriniens mettant en jeu des fonctions cruciales pour le maintien de l'homéostasie métabolique telles que les fonctions thyroïdienne et somatotrope.



Figure 1 : Brebis atteinte de tremblante: cachexie, dépilation, excoriation suite au prurit.

I.2.2 TABLEAU LESIONNEL

Les lésions sont retrouvées systématiquement dans la substance grise des centres nerveux supérieurs et tout particulièrement dans le cervelet, les cornes ventrales de la moëlle épinière, le bulbe, le pont, le mésencéphale, le thalamus et l'hypothalamus (Wood et al., 1997).

On note une vacuolisation des neurones à l'origine de la spongiose, une dépopulation neuronale, une gliose astrocytaire ainsi que des dépôts de plaques amyloïdes correspondant à l'accumulation de PrPsc. Il n'existe pas de corrélation apparente entre la sévérité des lésions et la gravité des signes cliniques.

Etant donnée la distribution très large des lésions dans le SNC, les noyaux hypothalamiques, qui concentrent les neurones à neurohormones, ne sont pas épargnés. Il est donc probable qu'un tel tableau lésionnel puisse être associé à des troubles endocriniens d'origine centrale.

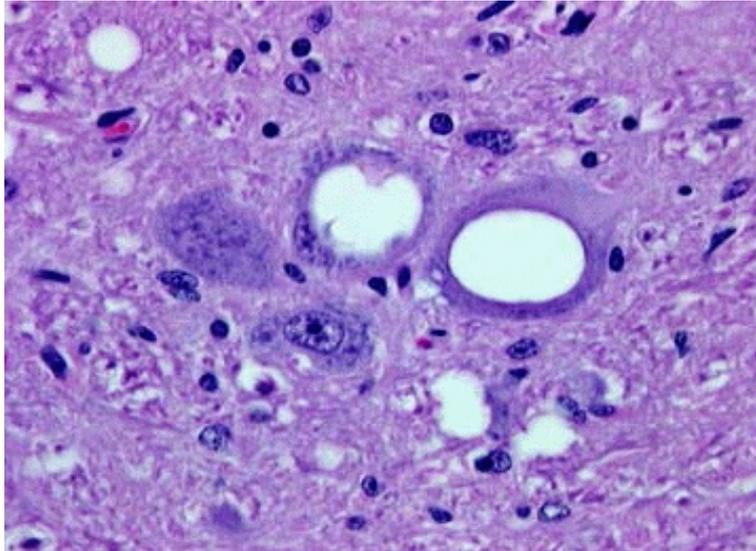


Figure 2 : Coupe histologique de cerveau d'ovin atteint de tremblante : vacuolisation du neuropile. (D'après le site internet de l'INRA 2005).

I.3 MECANISME DE NEURODEGENERESCENCE

L'accumulation intra-cellulaire de PrPsc qui échappe au catabolisme des protéases est le point de départ de la pathogénie de la tremblante. Cette accumulation favorise les fusions entre lysosomes (vésicules riches en enzymes cytolitiques) qui génèrent de larges vacuoles dans le neurone à l'origine de la spongiose. Ainsi, si l'accumulation des prions semble être le point de départ de la dépopulation neuronale, la PrPsc libérée lors des premières morts cellulaires pourrait ensuite activer les cellules gliales et les astrocytes qui par l'intermédiaire de la libération des médiateurs de l'inflammation exacerberaient le processus de neurodégénérescence et d'apoptose des neurones sains (figure 3) (Dormont et al., 2001).

La libération de PrPsc dans les espaces extra-cellulaires est associée à une réaction inflammatoire locale. En effet, l'expression de certains médiateurs de l'inflammation telles que certaines prostaglandines, TNF α et interleukine1 β est augmentée dans le SNC de souris et hamsters infectés expérimentalement (Williams et al., 1994, 1997 ; Kim et al., 1999).

II. FONCTION SOMATOTROPE

L'axe somatotrope contrôle la sécrétion de l'hormone de croissance (GH). Il joue un rôle dans la régulation des métabolismes, la croissance osseuse ainsi que dans les mécanismes de neuroprotection.

II.1 L'AXE SOMATOTROPE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSIAIRE

Chez l'animal adulte, la régulation de l'axe somatotrope est assurée principalement par deux neurohormones hypothalamiques : la GHRH (Growth Hormone Releasing Hormone) et la somatostatine ou SRIH (Somatotropin Release Inhibiting Hormone) (figure 4).

Ces deux neuropeptides, sécrétés directement dans le système porte hypothalamo-hypophysaire au niveau de l'éminence médiane, agissent sur l'hypophyse pour maintenir le rythme de sécrétion de la GH. La GHRH stimule la sécrétion de la GH tandis que la SRIH l'inhibe. Cependant, certains résultats ne sont pas explicables par le seul effet de la GHRH et de la somatostatine. Cela a conduit à suggérer l'existence d'un troisième facteur stimulateur de la sécrétion de GH appelé GHRPs (GH Releasing Peptides). Ce troisième facteur serait un ligand endogène d'un type de récepteur longtemps orphelin appelé GHRPR (GH Releasing Peptide Receptor) connu pour ses puissants effets stimulateurs sur la sécrétion de la GH (Bowers et al., 1980 et 1984). A ce jour, un seul ligand endogène de ce récepteur a été identifié : la ghréline. Au niveau du foie, la GH contrôle la synthèse et la libération de l'IGF-I (Insulin-like Growth Factor I). L'IGF-I exerce un rétrocontrôle négatif sur l'axe somatotrope.

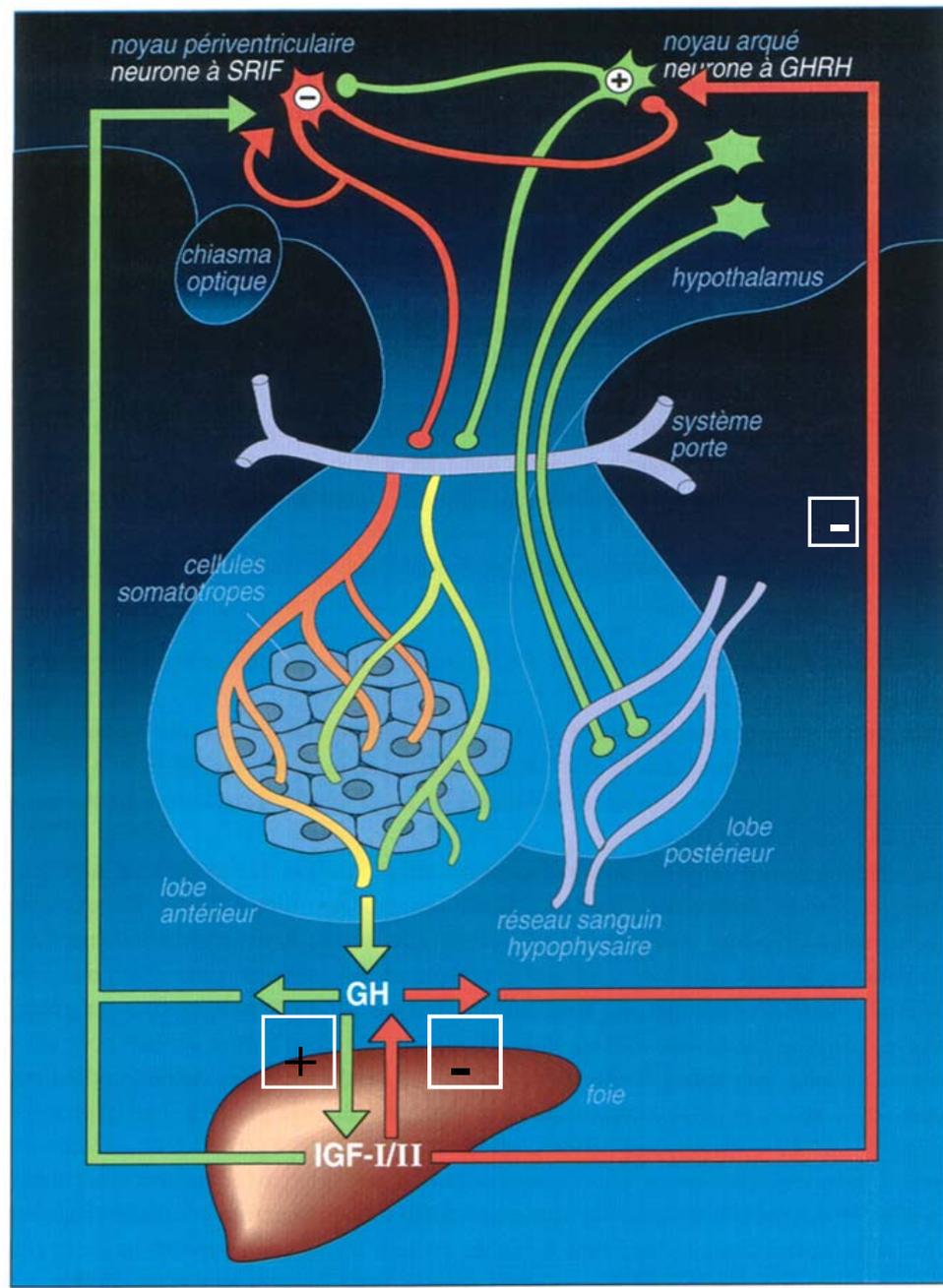


Figure 4 : Représentation schématique de l'axe somatotrope et régulation de la sécrétion de l'hormone de croissance (GH).

Les neurohormones activatrices ((+) vert) ou inhibitrices ((-) rouge) de la sécrétion de GH sont libérées dans le réseau capillaire primaire situé au niveau de l'éminence médiane, collectées par les vaisseaux portes puis déversées dans le réseau capillaire secondaire intrahypophysaire. Ces neurohormones sont alors directement en relation avec les différents types cellulaires de l'hypophyse. La sécrétion de l'hormone de croissance par les cellules somatotropes est inhibée par le SRIF (ou SRIH) produit par les neurones somatostatinerigiques du noyau périvericulaire de l'aire hypothalamique antérieure. En revanche, sa libération est stimulée par la GHRH produite à partir des neurones à GHRH dans le noyau arqué. Les effets de rétrocontrôle (feedback positif en vert (+) ou négatif en rouge (-)) de la GH et des IGFs sont également représentés. (D'après Müller et al., 1999)

II.2 LES HORMONES DE L'AXE SOMATOTROPE

II.2.1 LA GHRH

Chez l'homme, il existe 3 formes de GHRH qui comportent 37, 40 ou 44 acides aminés. La forme la plus longue est la forme active chez l'homme, les 2 autres sont les produits de son catabolisme (Strobl et al., 1994).

La GHRH est synthétisée essentiellement par les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus médiobasal, mais des neurones producteurs de GHRH sont également retrouvés dans le noyau paraventriculaire et la zone ventromédiale de l'hypothalamus. L'hormone est ensuite libérée dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire au niveau de l'éminence médiane.

La GHRH stimule la sécrétion de GH au niveau hypophysaire.

In vitro, sur des cellules hypophysaires d'agneau en culture, en présence de GHRH, la sécrétion de la GH augmente significativement (Silverman et al., 1989., Blanchard et al., 1987). La GHRH augmente la synthèse des ARNm de la GH sur des cultures cellulaires de rats (Barinaga et al., 1983, Gick et al., 1984) et d'agneau (Silverman et al., 1989). *In vivo*, l'administration de GHRH synthétique stimule la libération de GH de façon dose dépendante dans la plupart des espèces dont le mouton (Müller., 1987). Comme dans les autres espèces, les injections répétées de GHRH, chez le mouton adulte, induisent une diminution progressive de la réponse somatotrope (Della-Ferra et al., 1986).

La GHRH exerce son action sur l'hypophyse grâce à des récepteurs membranaires des cellules somatotropes. Le récepteur de la GHRH est couplé aux protéines G qui activent l'adénylate cyclase. Celle-ci catalyse la formation d'AMPc permettant, après une cascade d'activation, de stimuler la transcription du gène de la GH. Le calcium intracellulaire est également un messager essentiel de la transduction du signal des récepteurs de la GHRH (Chen et al., 1994) et donc de la sécrétion de la GH.

II.2.2 LA SRIH

La SRIH est un peptide cyclique de 14 acides aminés (Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys) très largement distribué dans le système nerveux central. Une autre forme de 28 acides aminés existe au niveau du pancréas et du tube digestif, mais celle-ci interviendrait peu dans la régulation de la sécrétion de la GH.

Au niveau du SNC, la SRIH est synthétisée notamment dans les neurones hypophysiotropes du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus. L'hormone est ensuite libérée par les terminaisons nerveuses de ces neurones au niveau de l'éminence médiane dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire. Sa distribution est ubiquitaire. On peut la retrouver dans de nombreux organes périphériques comme le pancréas, l'estomac, l'intestin, la thyroïde, les glandes salivaires, les reins (Taniyama et al., 2005). Sa sécrétion hypothalamique est pulsatile.

La somatostatine est un facteur hypothalamique inhibiteur de la sécrétion de la GH (Davis., 1975). *In vitro*, la SRIH n'a aucun effet sur la transcription du gène de la GH (Barinaga et al., 1985), et n'exerce pas d'effet direct sur la synthèse de GH (Fukata et al., 1985). En revanche, l'incubation de cultures de cellules hypophysaires de rat avec la SRIH entraîne une diminution significative de la sécrétion basale de la GH et de la sécrétion induite par la GHRH (Fukata et al., 1985). *In vivo*, Davis (1975) a montré qu'une perfusion iv de SRIH (1mg/min) pendant 1 heure ne modifiait pas le profil sécrétoire de la GH chez la brebis. En revanche, cette étude a montré qu'une perfusion de SRIH à 5mg/min diminuait la sécrétion basale de GH et la sécrétion de GH induite par la GHRH.

La SRIH agit uniquement sur la sécrétion de la GH en empêchant l'exocytose des granules sécrétoires, contrairement à la GHRH qui agit à la fois sur la synthèse et la sécrétion. La SRIH agit sur la sécrétion de la GH à travers différents mécanismes, incluant l'inhibition du système adénylate cyclase (Michel et al., 1983 ; Bilezikjian et al., 1983) et l'hyperpolarisation des canaux calciques (Yamashita et al., 1986). Calcium et AMPc voient alors leur concentration cellulaire diminuer. Les effets biologiques de la SRIH s'exercent par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques couplés aux protéines Gs.

II.2.3 LA GH

La GH est une hormone polypeptidique de 191 acides aminés comportant 2 ponts disulfures et composée d'une unique chaîne. Chez l'homme et le mouton, il existe 2 formes de GH, provenant toutes deux du même gène : une forme longue majoritaire de 22 Kda et une forme courte. Dans le plasma, la GH est présente sous différentes formes, elle peut être libre, à simple chaîne ou complexée en polymères, ou associée à des protéines de transport (GHBP : Growth Hormone Binding Protein).

L'hormone de croissance est produite par l'antéhypophyse. Elle stimule la libération de l'IGF-I au niveau du foie. La GH a une sécrétion pulsatile chez tous les mammifères y compris l'homme (Müller., 1987 ; Herman-Bonert et al., 1995). Cette sécrétion pulsatile est primordiale pour la plupart des activités biologiques (Hochberg et al., 1991). Chez l'homme et le mouton, contrairement au rat, les pics de concentration de GH ne surviennent pas à des intervalles réguliers et ne sont pas prévisibles (Davis et al., 1977).

La GH a un temps de demi-vie d'environ 43 minutes chez le mouton (Laurentie et al., 1987). Comme la plupart des hormones peptidiques, son catabolisme est hépatique.

Le récepteur de la GH est une glycoprotéine quasi ubiquitaire. Il est présent en très grande quantité dans le foie, mais on le trouve aussi dans les tissus adipeux, les chondrocytes, les thymocytes, les ovaires, le corps jaune, les poumons, le cœur, les reins, les fibroblastes, les lymphocytes et bien sûr dans l'hypothalamus.

II.2.4 L'IGF-I

L'IGF-I est un peptide de 70 acides aminés. Dans la circulation, on peut le trouver libre ou lié de façon réversible à des protéines spécifiques de liaison ou IGF-Binding Proteins (IGFBPs). Il existe 6 IGFBPs chez l'homme qui possèdent des fonctions majeures essentielles pour coordonner et réguler les activités biologiques des IGFs. Elles jouent le rôle de transporteur des IGFs ; elles permettent de prolonger le temps de demi-vie des IGFs entre 5 et 7 heures chez l'agneau (Francis et al., 1988) et de réguler leur clairance métabolique ; elles modulent l'interaction entre les IGFs et leur récepteur et ainsi contrôlent indirectement les actions biologiques des IGFs (Jones et al., 1995). Les IGFBPs possèdent aussi une action directe sur le cycle cellulaire ou l'apoptose, en se liant à un récepteur cellulaire spécifique (Jones et al., 1995 ; Firth et al., 2002 ; Perks et al., 2002 (1) et (2)).

La synthèse d'IGF-I, majoritairement hépatique, est stimulée par la GH. La concentration plasmatique d'IGF-I augmente progressivement avec l'âge. Ainsi, chez les ovins, la sécrétion de GH augmente à partir de 70 jours de gestation (15 ng/ml) jusqu'à la période prépubère où les taux circulants sont maximaux (300 ng/ml) (Blanchard et al., 1988). Sa distribution est ubiquitaire ; on le trouve dans beaucoup de tissus comme le foie, les reins, les muscles squelettiques, les gonades et dans la plupart des zones du cerveau notamment l'hypothalamus, le liquide cébrospinal et l'hypophyse.

Il existe 3 types de récepteurs aux IGFs identifiés. Ces récepteurs sont des hétérotétramères de tyrosine kinase, similaires au récepteur de l'insuline. Après la liaison de l'IGF-I à son récepteur, une autophosphorylation du récepteur (tyrosine) a lieu permettant l'action de l'IGF-I.

Seulement 2 types de récepteur reconnaissent spécifiquement les IGFs (Jones et al., 1995) :

- le récepteur de l'IGF-I (IGFI-R) qui a un haut degré de similitude de structure avec le récepteur à insuline et qui est le seul à assurer les fonctions biologiques de l'IGF-I. Ce récepteur est présent dans la plupart des types cellulaires et notamment au niveau de l'hypophyse et de l'hypothalamus.
- Le récepteur de l'IGF-II (IGFII-R) qui est identique au récepteur cation-indépendant mannose-6-phosphate.

L'IGF-I peut également se fixer sur le récepteur à l'insuline mais avec une moindre affinité.

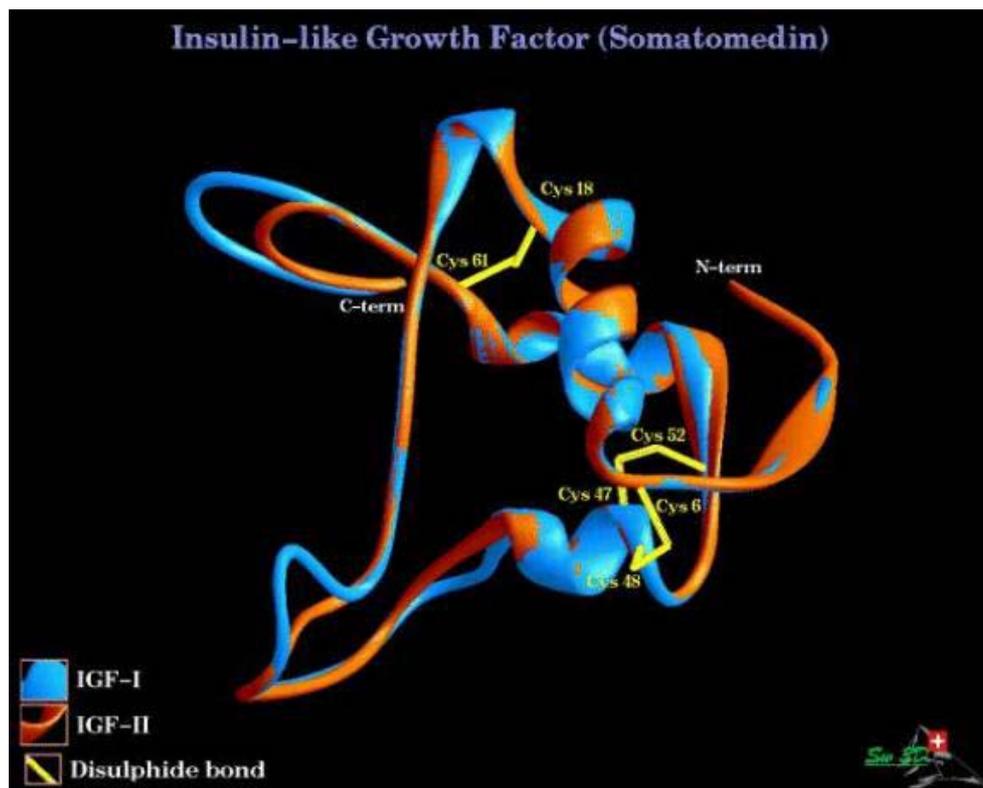


Figure 5 : Représentation en 3D de la structure tertiaire des IGFs. (D'après le site internet www.biochem.szote.u.szeged.chu).

II.3 SCHEMA DE REGULATION

II.3.1 RETROCONTROLE DE L'AXE SOMATOTROPE

1. Intéraction GHRH et SRIH dans l'hypothalamus

Des données neuroanatomiques ont mis en évidence des interactions réciproques entre les neurones à GHRH et à SRIH au niveau hypothalamique. Chez les bovins, les sécrétions de la GHRH et de la SRIH ne sont pas indépendantes (West et al., 1997). Les neurones qui sécrètent la GHRH ont des synapses sur les cellules productrices de la SRIH et inversement. Chez les bovins, il a été montré que la somatostatine agit sur la sécrétion de la GHRH en exerçant un contrôle négatif. Inversement, la GHRH stimule la production de somatostatine (West et al., 1997). Des études ont également montré qu'une administration intraveineuse d'un agoniste de la somatostatine chez le bélier diminuait la libération de GHRH dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire (Magnan et al., 1992). On observe donc un effet interactif complexe entre la GHRH et la SRIH.

2. Rétrocontrôle par les IGFs

Les IGFs exercent un rétrocontrôle négatif sur l'axe somatotrope.

Des cultures de cellules hypophysaires de rat ont permis de montrer que l'IGF-I agissait au niveau hypophysaire en inhibant la sécrétion basale de la GH (Namba et al., 1989), la sécrétion induite par l'hormone thyroïdienne triiodothyronine (T3) (Melmed et al., 1986) et la sécrétion induite par la GHRH (Ceda et al., 1987). A partir d'un modèle de cultures de cellules hypophysaires de chèvre, il a été montré qu'une concentration minimale d'IGF-I (100 ng/ml) était nécessaire pour supprimer la réponse hypophysaire induite par la GHRH (Katoh et al., 2003). De plus, l'IGF-I supprime la transcription du gène de la GH chez le rat (Namba et al., 1989).

Des études *in vitro*, réalisées sur des cultures cellulaires d'hypothalamus de rat, ont mis en évidence la participation de l'IGF-I au rétrocontrôle négatif qui s'exerce au niveau du SNC (Shibasaki et al., 1986, Berelowitz et al., 1981). L'IGF-I stimule la libération de la SRIH et inhibe la libération de la GHRH au niveau hypothalamique. En effet, Sato et al (1993) ont montré qu'une administration intracérébroventriculaire d'IGF-I chez des rats augmentait

l'expression des ARNm de la SRIH et diminuait l'expression des ARNm de la GHRH au niveau hypothalamique. Cependant, pour certains auteurs, l'implication des IGFs dans la régulation centrale de la sécrétion pulsatile de la GH n'a pas été mise en évidence. Il a ainsi été montré qu'une administration centrale d'IGF-I purifié, seul, n'entraînait aucun effet sur la concentration sanguine de GH chez le rat (Zeev Harel et al., 1992). Ce défaut d'action centrale de l'IGF-I est compatible avec les résultats obtenus par Spencer sur le mouton (Spencer et al., 1991). A l'opposé, une étude a montré qu'une administration intracérébroventriculaire d'IGF-I et d'IGF-II induit une suppression marquée de la sécrétion de la GH, 3 à 6 heures après l'injection chez le rat (Zeev harel et al., 1992). Ces derniers résultats suggèrent que le rétrocontrôle central de la sécrétion de la GH pourrait provenir d'une action synergique d'IGF-I et d'IGF-II mais ceci reste encore à vérifier.

Bien qu'une administration intracérébroventriculaire d'IGF-I chez des brebis n'entraîne aucun effet sur la libération de la GH, la perfusion intraveineuse d'IGF-I induit une diminution des concentrations plasmatiques en GH pendant plus de 6 heures (Fletcher et al., 1995).

3. Régulation nerveuse centrale

La régulation de l'axe somatotrope fait aussi intervenir d'autres facteurs centraux. Les noyaux hypothalamiques, qui contiennent les neurones à GHRH et SRIH, reçoivent des afférences nerveuses cholinergiques, noradrénergiques et sérotoninergiques.

Les voies noradrénergiques et cholinergiques sont les 2 voies centrales les plus importantes dans la régulation de sécrétion de la GH.

En ce qui concerne la voie noradrénergique, l'administration de noradrénaline inhibe la sécrétion de GH par l'intermédiaire des récepteurs β adrénergiques tandis que les récepteurs α_2 adrénergiques sont impliqués dans la stimulation de la sécrétion de GH. La stimulation de cette sécrétion par un agoniste des récepteurs α_2 adrénergiques chez le mouton résulte en partie d'une augmentation de sécrétion de la GHRH dans le système porte (Magnan et al., 1994).

L'activation de la voie cholinergique, via ses récepteurs muscariniques, exerce un effet stimulateur sur la sécrétion de la GH par l'intermédiaire de l'augmentation de production de la GHRH chez le mouton (Magnan et al., 1993).

II.3.2 FACTEURS DE REGULATION DE LA SECRETION DE LA GH OVINE

1. Influence de la photopériode

Dans les conditions de photopériode naturelle, l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en GH décroît significativement de janvier à février et augmente significativement d'avril à juin chez le bélier (Barenton et al., 1983). L'utilisation de régimes lumineux artificiels a mis en évidence chez des béliers, un effet significatif positif de la durée d'éclairage quotidien sur les concentrations plasmatiques de GH (Barenton et al., 1987) ; plus la durée d'éclairage est longue plus la sécrétion de GH est importante.

2. Influence du rythme biologique

Des travaux réalisés chez la brebis ont permis de mettre en évidence une augmentation des concentrations plasmatiques de la GH entre les repas ; la prise de nourriture entraînait au contraire une chute des concentrations plasmatiques de la GH (Driver et al., 1981). Chez l'agneau, des concentrations de GH plus élevées sont observées lors des phases de repos en relation avec les phases de sommeil à ondes lentes, en l'absence de prise de nourriture et de rumination et lorsqu'ils sont en position couchée (Laurentie et al., 1989).

3. Influence de l'âge

La sécrétion de la GH diminue avec l'âge chez l'homme (Iranmanesh et al. 1991). Pour l'ensemble des mammifères, la sécrétion maximale de la GH est observée lors des phases de croissance. A l'opposé, la sénescence est accompagnée d'une diminution des concentrations plasmatiques de GH. Plusieurs mécanismes sont proposés : une diminution de sécrétion et/ou d'action de la GHRH, une augmentation d'action et/ou synthèse de la SRIH, une augmentation de la sensibilité au rétrocontrôle négatif de l'IGF-I (Chapman et al., 1997).

4. Régulation métabolique

La sécrétion de GH est plus élevée chez des individus maigres que chez des individus obèses. La restriction alimentaire entraîne une augmentation de la sécrétion de GH chez le

mouton (Driver et al., 1981) alors qu'une prise alimentaire *ad libitum* entraîne une baisse de la concentration en GH plasmatique (Landefeld et al., 1989).

Dès 1972, DAVIS a montré les effets stimulateurs sur la sécrétion de la GH chez le mouton d'un acide aminé en particulier, l'arginine (Davis et al., 1972). Une étude plus récente a confirmé l'effet stimulateur de l'arginine et des acides aminés acidiques en général. L'effet le plus intense sur la sécrétion de GH est attribué à l'acide aspartique (Kuhara et al., 1991).

Les acides gras inhibent la sécrétion de GH dans de nombreuses espèces dont le mouton (Sartin et al., 1988). En effet, une perfusion d'acides gras libres à des brebis pendant 8 heures entraîne une diminution des concentrations plasmatiques de GH et une diminution de la fréquence des pics de sécrétion. Ceci est dû au fait que les acides gras libres augmentent la sécrétion de la SRIH dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire et exercent aussi une action inhibitrice au niveau hypophysaire (Briard et al., 1998).

5. *Modification de la sécrétion de la GH par diverses hormones*

Les hormones androgènes (testostérone) et oestrogènes stimulent la production de la GH. DAVIS (Davis et al., 1977) a montré qu'en traitant des agneaux avec de la testostérone ou des oestrogènes de synthèse, la production de GH était augmentée pendant 12 heures.

In vitro, sur des cultures hypophysaires de mouton, SARTIN a montré que le cortisol inhibe la libération de la GH (Sartin et al., 1994). Cependant, il faut bien différencier un hypercorticisme aigu d'un hypercorticisme chronique. Un stress modéré d'« isolement-contention », imposé à des béliers, entraîne un hypercorticisme aigu conjointement à une élévation des concentrations plasmatiques de GH due à une augmentation de sécrétion de la GHRH (Cataldi et al., 1994). Certains auteurs ont suggéré que cette élévation de la cortisolémie pourrait être à l'origine de la stimulation de l'axe somatotrope. En revanche, lors d'un hypercorticisme chronique, comme dans le syndrome de Cushing chez l'homme, une diminution de la libération de la GH est observée (Wajchenberg et al., 1996).

Des études, menées à l'école vétérinaire de Toulouse, sur la brebis en phase clinique de tremblante ont montré l'existence d'un hypercorticisme chronique de même qu'une augmentation de la sécrétion de GH. Toutefois, aucune relation de cause à effet entre ces deux perturbations endocriniennes n'a été établie.

L'effet de l'insuline sur la sécrétion de GH est très controversé car selon certains auteurs, l'insuline exercerait un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de GH (Dutour et al., 1997). Ce rétrocontrôle est peu efficace car il nécessite de très forte concentration d'insuline. D'autres travaux font état d'une stimulation de la sécrétion de GH par l'insuline chez des brebis en état de jeûne et soumises à de très faibles doses d'insuline (Jaffe et al., 1999).

Les hormones thyroïdiennes stimulent la sécrétion de GH dans de nombreuses espèces (rat, mouton, homme) (Giustina et al., 1995).

La leptine est une hormone produite par les adipocytes. Cette hormone exerce une action positive sur la sécrétion de GH au niveau hypothalamique chez les ovins. (Morrison et al., 2001 ; Nagatani et al., 2000).

II.4 ROLE ET FONCTION DE L'AXE SOMATOTROPE

II.4.1 FONCTIONS DE LA GH (Herman-Bonert et al., 1995)

La GH joue un rôle essentiel dans la croissance du squelette et des tissus mous et participe aux régulations métaboliques. Alors que ses effets sur le métabolisme lipidique et glucidique sont essentiellement directs, ses effets sur la croissance et l'anabolisme protidique sont en grande partie indirects, médiés par l'action de l'IGF-I.

De façon indirecte, la GH augmente l'activité des cartilages de conjugaison et le renouvellement du collagène (hydroxyprolinurie). Elle joue un rôle fondamental sur la croissance staturo-pondérale post natale. La GH possède une importante action anabolisante, elle stimule la synthèse protéique, positive la balance azotée et augmente la masse musculaire.

Par un effet direct, l'administration prolongée de GH entraîne une hyperglycémie et une lipolyse. La GH antagonise l'action de l'insuline à la fois au niveau hépatique et au niveau des tissus périphériques, elle diminue l'utilisation de glucose. Elle augmente la lipolyse et diminue la lipogénèse. Elle stimule la lipase hormonosensible augmentant ainsi le taux d'acides gras libres et de glycérol et elle augmente la cétogénèse. Elle modifie ainsi la composition corporelle augmentant la masse maigre et diminuant la masse grasse.

II.4.2 FONCTIONS DES IGFS

In vitro, les IGFs sont connus pour être des facteurs de progression dans le cycle cellulaire et permettre la synthèse d'ADN et la réplication cellulaire. En effet, une stimulation par l'IGF-I entraîne une réponse mitogène dans la plupart des cellules (chondrocytes, ostéoblastes, kératinocytes, cellules folliculaires thyroïdiennes, cellules musculaires lisses...) (Jones et al., 1995 ; Lowe., 1991). Complémentairement à leur effet sur la prolifération cellulaire, les IGFs peuvent inhiber la mort cellulaire. Cette fonction anti-apoptotique des IGFs est assurée et contrôlée par l'IGFI-R, indépendamment de sa capacité à transmettre les signaux mitogènes. Cette action est surtout mise en évidence sur des cellules hématopoïétiques (Jones et al., 1995). Les IGFs induisent aussi la différenciation cellulaire. Florini et coll (1996) ont démontré que les IGFs sont des inducteurs de la différenciation terminale des myoblastes et que les myoblastes eux-mêmes assuraient leur propre différenciation en synthétisant des IGF-II.

In vivo, l'administration iv d'IGF-I pur entraîne un effet rapide sur les concentrations plasmatiques de glucose comparable à l'insuline. Sur des rats normaux, un bolus de 20 µg d'IGF-I entraîne une hypoglycémie immédiate ainsi qu'une stimulation de la synthèse de glycogène. En revanche, l'administration de 20 µg d'IGF-II a pour effet une hyperglycémie non expliquée (Zapf et al., 1986). Les effets hypoglycémisants de l'IGF-I ne deviennent manifestes que si les protéines spécifiques de transport de l'IGF-I sont saturées, et que les concentrations en IGF-I libres atteignent des concentrations assez importantes pour stimuler les organes cibles de l'insuline. Un bolus de 20 µg d'IGF-I sature temporairement les protéines plasmatiques de transport, l'IGF-I libre agit alors très rapidement sur les récepteurs à insuline et à IGF dans les tissus cibles de l'insuline. En revanche, une perfusion d'IGF-I à 4.3 µg/h sur des rats, n'a pas entraîné d'hypoglycémie, car plus de 96 % de l'IGF-I circulaient sous forme liée (Schoenle et al., 1985).

Un effet anabolique de l'IGF-I sur la synthèse protéique a également été mis en évidence chez le rat (Thomas., 1992).

Enfin, une surexpression de l'IGF-I chez des souris transgéniques a entraîné une diminution de l'expression de la GH de 60% reflétant le rétrocontrôle négatif sur la production pituitaire de GH (Mathews et al., 1988).

L'axe somatotrope joue également un rôle primordial dans le développement et l'homéostasie du SNC que nous allons aborder dans la partie suivante.

III. FONCTION SOMATOTROPE ET SYSTEME NERVEUX CENTRAL

III.1 FONCTION SOMATOTROPE ET DEVELOPPEMENT DU SNC

La GH est impliquée de façon indirecte, via l'IGF-I, dans le développement du cerveau, la myélinisation, l'arborisation neuronale et la différenciation gliale.

L'IGF-I est un facteur neurotrophique favorisant la prolifération neuronale, l'arborisation dendritique, la synaptogénèse ainsi que la différenciation pendant le développement du cerveau. L'IGF-I a des effets trophiques sur les oligodendrocytes, il stimule la myélinisation et régule les mécanismes immunitaires (Jones et al., 1995 ; Lowe, 1991). La surexpression de l'IGF-I dans le cerveau de souris montre un sur-développement du cerveau avec une augmentation de poids de 20 à 85% de son poids normal. Au contraire, l'inhibition de l'expression du gène de l'IGF-I chez des souris conduit à une diminution de 40% de la taille du cerveau adulte. L'IGF-I peut donc influencer le développement du cerveau surtout au niveau du cortex cérébral et du cerebellum.

III.2 FONCTION SOMATOTROPE ET NEUROPROTECTION

III.2.1 GH ET NEUROPROTECTION

Scheepens et coll (2001) ont montré que la GH était impliquée dans la neuroprotection durant les accidents cérébraux entraînant hypoxie et ischémie. En effet, la concentration de GH augmente dans le cerveau chez le rat dans les jours suivant l'accident.

L'administration icv de GH est capable de réduire la perte de cellules liée à l'accident ischémique. Dans ce cas, la GH a une action directe ne dépendant pas de l'IGF-I.

Un traitement à la GH lors d'accident ou de brûlure sévère peut induire l'expression de suppresseurs des voies de signalisation des cytokines (SOCS) surtout pendant la phase aiguë. La GH induit, par l'intermédiaire de l'augmentation de l'expression des SOCS, une inhibition de la synthèse protéique (notamment les cytokines) caractéristique de la réponse hépatique lors d'accidents (Wu et al., 2003). *In vitro*, l'incubation de fibroblastes de souris avec la GH induit préférentiellement l'expression rapide et transitoire des ARNm des SOCS 3. Ceci est

aussi observé *in vivo* sur des foies de souris après injection intra péritonéale de GH (Adams et al., 1998).

La GH pourrait donc aider, par l'expression de SOCS 3, à contenir les effets délétères d'une exposition prolongée du cerveau aux cytokines.

III.2.2 IGF-I ET NEUROPROTECTION

L'IGF-I a un rôle neuroprotecteur majeur. A ce titre, il intervient comme facteur de survie dans plusieurs conditions ou maladies neurodégénératives comme des traumatismes crâniens, la maladie d'Alzheimer ou encore la sclérose multiple (Ostlund et al., 2001, Dore et al., 1997). L'effet neuroprotecteur de l'IGF-I a été mis en évidence sur des cultures neuronales de rats. En effet, l'IGF-I inhibe la neurotoxicité induite par le dépôt de β amyloïde, en bloquant certaines étapes de l'apoptose et/ou nécrose cellulaire, et permet la survie neuronale (Dore et al., 1997).

L'IGF-I module la neurogénèse chez des rats adultes et augmente l'excitabilité neuronale (Aberg et al., 2000).

In vitro, l'IGF-I protège les neurones de l'apoptose induite entre autre par le stress oxydatif (Heck et al., 1999). Le stress oxydatif, initié par les prostaglandines et cytokines pro inflammatoires, contribue à la mort cellulaire dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Horsburgh et al., 1994 ; Sagara et al., 1998).

De plus, avec l'âge, on assiste à une réduction des concentrations de l'IGF-I dans le sérum et le cerveau, ce qui constitue un facteur de risque pour les maladies neurodégénératives. Associé à cette diminution des concentrations d'IGF-I, on observe une augmentation du dépôt des amas β amyloïde dans le cerveau (Arvat et al., 2000). Ces données peuvent suggérer l'existence d'une relation entre la diminution des concentrations d'IGF-I et l'accumulation de plaques amyloïdes caractéristique de certaines maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. En accord avec cette hypothèse, une diminution de 60% des concentrations circulantes d'IGF-I, obtenue par manipulation génétique, est associée à un dépôt important de plaques amyloïdes chez des souris mutantes (Carro et al., 2002). De même, la quantité d'amyloïdes dans le cerveau de souris âgées a pu être diminuée par l'administration d'IGF-I (Carro et al., 2002). Cette relation entre IGF-I et plaques de β amyloïde suggère que l'IGF-I est capable d'induire l'élimination des amas amyloïdes hors

du cerveau. L'IGF-I pourrait agir au niveau de la barrière cérébrospinale en améliorant sa perméabilité aux protéines ligands de β amyloïdes comme l'albumine et la transthyréine et ainsi favoriser le transport de ces amas amyloïdes hors du cerveau (Carro et al., 2002).

Cependant, cet effet neuroprotecteur de l'IGF-I peut être altéré par le $\text{TNF}\alpha$, une cytokine pro-inflammatoire neurotoxique intervenant dans les mécanismes de neurodégénérescence impliqués dans différentes pathologies du SNC, dont la maladie d'Alzheimer, la sclérose multiple ou l'ischémie cérébrale... (Venters et al., 1999). Une faible quantité de cette cytokine diminue la survie induite par l'IGF-I, de cultures neuronales de rats (Venters et al., 1999). Le $\text{TNF}\alpha$ empêcherait donc les effets neuroprotecteurs de l'IGF-I et en particulier l'élimination des amas β amyloïdes. Cette cytokine agit en bloquant le passage de la barrière cérébrospinale de l'albumine et de la transthyréine (Carro et al., 2002). Plus généralement, les prostaglandines et les cytokines pro-inflammatoires, qui augmentent avec l'âge (Bruunsgaard et al., 2001), participent à l'amyloïdose (Brugg et al., 1995) et accélèrent la neurodégénérescence en modulant et antagonisant l'action neuroprotectrice de l'IGF-I (Carro et al., 2002).

L'axe somatotrope est largement impliqué dans des mécanismes de neuroprotection et de maintien de l'homéostasie du SNC. L'altération de cet axe, rapportée dans les maladies à prion, pourrait donc avoir une signification physiopathologique très importante.

IV. ALTERATION DE LA FONCTION SOMATOTROPE ET TREMBLANTE

IV.1 MODIFICATION DES CONCENTRATIONS ET SECRETION DE GH CHEZ LES ANIMAUX ATTEINTS DE TREMBLANTE

La tremblante est associée à des altérations de sécrétion de GH.

La concentration moyenne de la GH plasmatique est 2 à 3 fois plus élevée chez les ovins tremblants que chez les ovins sains (Viguié et al., 2004). Cette augmentation des concentrations de GH résulte en partie d'une augmentation de la fréquence des pulses de GH. Ce dernier résultat suggère l'implication de mécanismes nerveux centraux. En revanche, ni l'amplitude des pulses ni la moyenne des pulses n'étaient différentes entre les groupes (Viguié et al., 2004).

Une stimulation de la sécrétion de GH est souvent observée durant les phases initiales des maladies aiguës. L'augmentation des concentrations de GH, dans les pathologies associées à un sévère catabolisme et une malnutrition, serait une des composantes clefs de la réponse endocrine initiale au stress. Par exemple, la stimulation de la sécrétion de GH dans les maladies aiguës entraîne une lipolyse directe, un antagonisme de l'effet de l'insuline et une stimulation de l'immunité (Van Den Berghe., 2002).

L'altération de la sécrétion de la GH peut résulter d'un dysfonctionnement des mécanismes de régulation de l'axe somatotrope, en particulier au niveau des interactions entre la GH et l'IGF-I. Ainsi, dans certaines pathologies associées à un catabolisme sévère, les régulations de la sécrétion de GH et d'IGF-I semblent être dissociées du fait de l'instauration d'un état de résistance à la GH. Ainsi, la sécrétion de l'IGF-I échapperait à la stimulation de la GH et il en résulterait une diminution des concentrations d'IGF-I. Une réduction du rétrocontrôle négatif de l'IGF-I sur la sécrétion de GH pourrait alors intervenir entraînant une augmentation des concentrations de GH (Van Den Berghe., 2002). Chez la brebis atteinte de tremblante, on ne note pas de diminution des concentrations plasmatiques de l'IGF-I caractéristique de cet état de résistance acquise à la GH (Viguié et al., 2004). Cependant, les concentrations d'IGF-I ne sont pas plus élevées chez les brebis tremblantes présentant une augmentation de fréquence des pulses de GH. Ces résultats suggèrent un certain degré de

dissociation entre la sécrétion de la GH et de l'IGF-I chez les animaux tremblants. En l'absence d'évaluation directe de la réponse de l'IGF-I à l'action stimulatrice de la GH, l'hypothèse de résistance acquise à la GH chez les ovins tremblants, ne peut pas être totalement écartée.

Une autre hypothèse qui pourrait expliquer ces résultats serait une diminution de l'efficacité du rétrocontrôle négatif de l'IGF-I et plus généralement une perte d'action de l'IGF-I. Certains résultats *in vitro*, présentés dans la partie suivante, sont cohérents avec ce déficit d'action de l'IGF-I et donc avec l'hypothèse d'une diminution des effets neuroprotecteurs de l'IGF-I chez les animaux tremblants.

IV.2 ALTERATION DE LA FONCTION DE L'IGF-I ET NEURODEGENERESCENCE DANS LA TREMBLANTE

Certains résultats (Ostlund et al., 2001) suggèrent qu'une altération de l'expression et/ou de la fonction des récepteurs à l'IGF-I, qui contribuent à la survie neuronale, pourrait favoriser la neurodégénérescence observée dans la tremblante.

Des expériences, menées sur des lignées de neuroblastomes infectés par la tremblante pour étudier l'expression et la fonction du récepteur à l'IGF-I (IGFI-R), ont mis en évidence une altération de ce récepteur. L'infection des cellules par la PrPsc entraîne une augmentation de l'expression du gène du récepteur, se traduisant par une augmentation des ARNm de l'IGFI-R. Malgré l'augmentation de l'expression du récepteur, on peut observer une diminution de 80% de fixation de l'IGF-I à son récepteur. La diminution de la liaison avec le récepteur a été attribuée à une diminution de l'affinité du récepteur pour l'IGF-I. Ostlund et coll (2001) ont aussi montré la possibilité d'une altération du signal de transduction de la cellule une fois l'IGF-I lié à son récepteur. Ces résultats suggèrent qu'une altération du récepteur à IGF-I (expression et affinité de liaison) et une altération du signal de transduction de l'IGFI-R pourraient être observées au niveau du SNC de béliers atteints de tremblante, et pourraient favoriser le processus de neurodégénérescence par un déficit des effets neuroprotecteurs médiés par l'IGF-I.

OBJECTIF ET HYPOTHESES

L'étroite relation entre homéostasie endocrinienne et intégrité du SNC a motivé notre intérêt pour l'étude des altérations endocriniennes dans les pathologies neurodégénératives à prion. Cette étude a été menée dans le but de mieux comprendre la physiopathologie de ces affections.

Afin de mener à bien ce projet, un axe endocrinien devait être choisi avec pertinence. Notre choix s'est porté sur la fonction somatotrope étant donné son rôle primordial à la fois comme facteur clé de l'équilibre métabolique, potentiellement très perturbé dans les pathologies neurodégénératives chroniques, et comme acteur important pour le maintien et la protection du SNC. De plus, nous savions que cette fonction était altérée chez les animaux atteints d'une encéphalopathie à prion naturelle : la tremblante. Une nette augmentation de la sécrétion de GH, procédant en partie de mécanismes nerveux centraux, a en effet pu être mise en évidence chez des ovins atteints de tremblante naturelle, sans qu'aucun mécanisme n'ait pu être démontré.

L'objectif de ce travail était donc de contribuer à la compréhension des mécanismes sous-jacents de la stimulation de la sécrétion de GH chez les animaux tremblants.

L'IGF-I est un maillon clé de la régulation de l'axe somatotrope, il exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de GH. Une altération des fonctions de régulation de l'IGF-I pourrait donc être à l'origine de l'augmentation des concentrations de GH. De plus, l'IGF-I joue un rôle neuroprotecteur très important. Tout déficit de ces actions pourrait donc constituer un facteur aggravant des processus de neurodégénérescence observés dans les maladies à prion.

Cette thèse constitue la phase initiale d'une série d'expérimentations visant à vérifier l'hypothèse générale selon laquelle l'augmentation de sécrétion de GH serait due à un défaut d'action de l'IGF-I. En corollaire, une autre hypothèse a été émise : l'augmentation de sécrétion de la GH pourrait être due à une sensibilité hypophysaire accrue à la GHRH.

Afin de vérifier notre hypothèse principale, des explorations fonctionnelles *in vivo* ont permis d'évaluer le degré d'altération de l'efficacité de l'IGF-I. Pour cela, le rétrocontrôle négatif de l'IGF-I sur la sécrétion de GH a été étudié comme marqueur de l'action de l'IGF-I, sur des béliers sains et tremblants.

ETUDE EXPERIMENTALE

I. MATERIELS ET METHODES

I.1 GENERALITES

I.1.1 ANIMAUX

Les expériences ont été réalisées avec dix béliers de race Romanov provenant de la station expérimentale INRA 65 (domaine de Langlade) : 5 béliers homozygotes VRQ/VRQ aux codons 136, 154 et 171 du gène Prnp, très sensibles à la tremblante et 5 béliers de génotype résistant ARR/ARR. En général, pour cette souche de tremblante et cette race d'ovin, la maladie se déclare vers 18 mois. Les animaux, nés au printemps 2003, sont arrivés à l'ENVT vers l'âge de 7-9 mois pour l'expérimentation. A ce moment là, les animaux ne présentaient pas de signe clinique. Les symptômes chez les animaux malades, de génotype sensible, se sont déclarés vers juillet 2004. L'entrée en phase clinique était mise en évidence par l'observation de prurit persistant.

Les animaux ont été hébergés par groupe de 5 dans des boxes collectifs et ont reçu une ration d'entretien (concentré 200g par animal 2 fois par jour + eau et foin *ad libitum*). Le régime alimentaire a été mis en place au minimum 2 semaines avant l'expérimentation. La distribution de concentré a été effectuée à la même heure chaque jour. Les animaux étaient exposés à la photopériode naturelle.

Les béliers ont été euthanasiés à la fin des expériences, et le diagnostic de tremblante chez les animaux sensibles a été confirmé par histopathologie.

Toutes ces manipulations ont été réalisées au sein de l'UMR181, sous l'agrément du ministère de l'agriculture numéro 001889.

I.1.2 PRELEVEMENTS DE SANG ET TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

Pour les séances de prélèvements, les animaux étaient placés la veille dans des boxes individuels. Ils étaient mis à jeun au moins 24 heures avant l'expérimentation afin de stimuler la sécrétion de GH.

Les encolures étaient tondues la veille pour la mise en place des cathéters stériles (Vygon) et héparinés (Héparine Roche) dans chacune des veines jugulaires.

Les prélèvements étaient réalisés avec des seringues de 2 ml à usage unique. Le cathéter était rincé après chaque prélèvement avec 1 ml de sérum physiologique. Le sang était récupéré dans des tubes sur héparinate de lithium et dans des tubes secs pour le dosage des IGF-I.

Les tubes étaient ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 3000 g.

Les plasmas étaient répartis en fractions aliquotes de 500 µl. Les aliquots étaient conservés à -20°C jusqu'au moment de la réalisation des dosages.

En ce qui concerne l'évolution des concentrations de GH en fonction du temps, les prélèvements bi-hebdomadaires étaient réalisés par ponction veineuse sur héparinate de lithium.

I.1.3 SOLUTIONS UTILISEES

L'IGF-I utilisée était une IGF-I recombinante humaine perfusée par voie iv à l'aide d'une pompe portable placée sur le dos de l'animal. L'IGF-I était fournie gracieusement par Genentech (San Fransisco, USA) sous forme d'une solution mère à 10 mg/ml. Cette solution était diluée extemporanément dans du sérum physiologique pour atteindre une concentration de 160 µg/ml. Le débit de la pompe était ajusté au poids de l'animal de façon à délivrer 14 µg d'IGF-I/kg/h.

Le solvant utilisé était le solvant de la solution mère selon la composition fournie par Genentech et dilué dans les mêmes proportions dans du sérum physiologique.

La GHRH, sous forme de poudre (Bachem ovine-caprine), a été reconstituée extemporanément dans du sérum physiologique stérile et apyrogène, pour obtenir une solution mère à 1 mg/ml. La solution à injecter était obtenue par dilution au 1/100 de cette solution mère donnant alors une solution à 10 µg/ml. La dose administrée était de 0.7 µg/kg.

I.2 PROCEDURE EXPERIMENTALE

I.2.1 SUIVI DES ANIMAUX

1. Evolution des poids corporels

Tous les animaux ont été pesés dès leur arrivée (le 15/10/2003) puis régulièrement avec des intervalles compris entre 15 jours et 1 mois jusqu'à la fin de l'expérience.

2. Suivi bihebdomadaire des concentrations plasmatiques de GH

Tous les animaux ont fait l'objet de prélèvements de sang, obtenu par ponction directe de la veine jugulaire, recueilli sur héparinate de lithium, 2 fois par semaine dès leur arrivée en octobre 2003 (période préclinique) et jusqu'en février 2005, pour un suivi de l'évolution des concentrations plasmatiques de GH.

I.2.2 EFFET DE L'IGF-I SUR LA SECRETION DE LA GH

Les 10 béliers ont été répartis en 3 lots équilibrés contenant chacun autant d'animaux tremblants que de sains. Chaque bélier a reçu les deux traitements (IGF-I, solvant) à deux semaines d'intervalle et selon un plan en cross-over (tableau 1).

Béliers	Statut	Session 1	Session 2	
1	tremblant	Solvant	IGF-I	} Lot 1
2	sain	Solvant	IGF-I	
3	tremblant	IGF-I	Solvant	
4	sain	IGF-I	Solvant	
5	tremblant	Solvant	IGF-I	} Lot 2
6	sain	Solvant	IGF-I	
7	tremblant	IGF-I	Solvant	
8	sain	IGF-I	Solvant	
9	tremblant	Solvant	IGF-I	} Lot 3
10	sain	Solvant	IGF-I	

Tableau 1: Protocole expérimental.

Ce plan expérimental a été appliqué aux mêmes animaux à deux périodes :
 (1) en période préclinique, au mois de mars, sur des animaux âgés de 12-14 mois et (2) en période clinique des animaux sensibles (VRQ), au mois d'octobre, sur des animaux âgés d'environ 19-21 mois.

Au cours de chaque session, des prélèvements de sang ont été réalisés toutes les 10 minutes, pendant 3 heures, avant la mise en place de la perfusion, puis toutes les 10 minutes pendant les 3 heures de perfusion (IGF-I ou solvant). Après les 3 premières heures de perfusion, les animaux ont reçu un bolus iv de GHRH à la dose de 0,7 µg/kg. Cette dose induit un pic de GH d'ordre physiologique. La perfusion a été maintenue pendant 1 heure de plus après l'administration de GHRH. Les prélèvements ont été effectués toutes les 5 minutes pendant 30 minutes après le bolus de GHRH. Enfin, les prélèvements se sont poursuivis toutes les 10 minutes jusqu'à 1 heure après l'arrêt de la perfusion (figure 6).

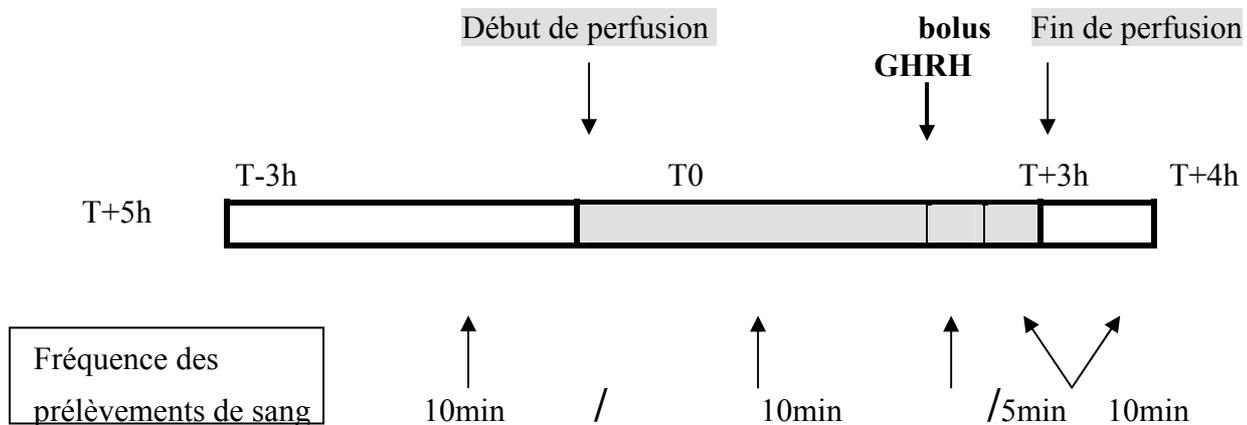


Figure 6 : Protocole des prélèvements de sang au cours d'une session.

Pendant cette expérience, la glycémie a été évaluée 3 fois durant la période contrôle ; 1, 2 et 3 heures après le début de la perfusion ; aux temps 15min, 30min, 60 min après le bolus de GHRH et 1 heure après arrêt de la perfusion.

I.3 METHODE DES DOSAGES

I.3.1 DOSAGE DE LA GH

Le dosage de la GH a été réalisé par une technique radio immunologique (RIA ou Radio Immuno Assay) par compétition. Deux anticorps ont été utilisés : un anticorps de lapin anti GH ou Ac1 (NIH) et un sérum anticorps ou anti Ac1 (SMAL, INRA Nouzilly) contenant des immunoglobulines de mouton anti IgG de lapin. La limite de détection était de 0.5 ng/ml. Le coefficient moyen de variation intra dosage était de 4.9% et le coefficient de variation inter dosage était de 10.5%.

I.3.2 DOSAGE DU GLUCOSE

La glycémie a été évaluée sur sang total. Elle a été mesurée extemporanément sur bandelette à l'aide d'un glucomètre portable (Glucotrend®).

I.3.3 DOSAGE DE L'IGF-I TOTAL ET LIBRE

La concentration en IGF-I total a été évaluée toutes les heures de T= -120 min à T= 300 min. Les concentrations sériques d'IGF-I ont été évaluées par ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) à l'aide d'un kit commercial (DSL-10-5600 ACTIVE ELISA®). Ce test est un immunodosage de type sandwich qui comporte une étape avec révélation enzymatique. Le dosage comprend une étape d'extraction simple en milieu acide, au cours de laquelle l'IGF-I est séparé de ses protéines de transport dans le sérum. Dans ce dosage, chaque standard, contrôle et échantillon à doser est mis en incubation avec des anticorps anti-IGF-I marqués à la peroxydase de Raifort dans des puits de microtitration recouverts d'un deuxième anticorps anti-IGF-I. Après incubation et lavage, les puits sont incubés avec un substrat de la peroxydase, la tétraméthylbenzidine (TMB) donnant lieu à une réaction colorée. La densité optique, mesurée à 450 nm après ajout d'une solution d'arrêt, est directement proportionnelle à la concentration d'IGF-I présent.

La concentration en IGF-I libre a été évaluée de T= -120 min à T= 0 min pour établir le niveau de base puis toutes les heures de T= 0 min à T= 300 min. Un kit commercial Elisa

sans extraction préalable a été utilisé pour doser les concentrations en IGF-I libre. La limite de quantification était de 0.5 ng/ml et le coefficient de variation intra dosage était de 20%.

I.4 ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS

La variable analysée pour étudier l'effet de la perfusion de l'IGF-I sur la sécrétion spontanée de GH est le différentiel des concentrations moyennes (\pm ET) de GH (moyenne [GH] perfusion – moyenne [GH] base).

Tous les résultats sont présentés sous la forme de moyenne \pm écart-type. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SYSTAT 10.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

Les interactions entre statut pathologique, période et traitement ont été analysées par une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées. Nous avons utilisé un modèle linéaire avec les individus comme facteur aléatoire et le statut, la période, la session, le traitement, la séquence d'administration des traitements et leurs interactions comme facteurs fixes. Le modèle d'analyse (modèle 1) ainsi établi est décrit par l'équation suivante :

Modèle 1

$$Y = \mu + \text{statut}_i + \text{séquence}_j + \text{synthétique}_k + \text{individu}_l (\text{synthétique})_k + \text{période}_m + \text{session}_n (\text{période})_m + \text{traitement}_n + (\text{traitement*statut})_{ni} + (\text{traitement*période})_{nm} + (\text{traitement*période*statut})_{nmi} + \varepsilon$$

La variable synthétique est égale à statut*séquence. L'interaction séquence*traitement n'est pas incluse dans l'analyse car cet effet est confondu avec celui de la session.

La variable analysée pour étudier l'effet de la perfusion de l'IGF-I sur la sécrétion de GH induite par la GHRH est le ratio des AUC des concentrations moyennes de GH obtenu respectivement au cours de l'heure suivant l'administration de GHRH et au cours de l'heure précédent l'administration. Le même modèle statistique (modèle 1), a été appliqué pour analyser l'effet du statut pathologique, de la période et du traitement sur la réponse de la GH au GHRH.

Une fois ces analyses de variances effectuées, les interactions significatives ont été analysées à l'aide de la méthode des comparaisons multiples avec la méthode de Fisher.

Le modèle statistique décrit précédemment (modèle 1) a également été utilisé pour analyser l'effet du statut pathologique, de la période et du traitement sur la glycémie.

L'effet du statut pathologique et du temps sur l'évolution des poids corporels a été analysé par une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées. Nous avons utilisé un modèle linéaire avec les individus comme facteur aléatoire et le statut, le temps et leur interaction comme facteurs fixes. Le modèle d'analyse (modèle 2) est décrit par l'équation suivante :

Modèle 2

$$Y = \mu + \text{statut}_i + \text{temps}_j + \text{individu}_k (\text{statut})_i + (\text{temps*statut})_{ji} + \varepsilon$$

Le même modèle a été appliqué pour analyser l'effet du statut pathologique et du temps sur l'évolution des concentrations moyennes de GH.

II. RESULTATS

II.1 SUIVIS DES ANIMAUX

II.1.1 EVOLUTION DES POIDS CORPORELS

L'évolution des poids corporels au cours du temps est décrite sur la figure 7.

Les animaux sains et tremblants en croissance prennent du poids jusqu'à fin juillet 2004. On observe que, d'octobre 2003 à avril 2004, les courbes sont confondues. Au cours de cette période, les GMQ (Gain Moyen Quotidien) \pm ET sont similaires : $93.9\text{g} \pm 60\text{g/j}$ pour les ovins sains et $94.4\text{g} \pm 81\text{g/j}$ pour les ovins tremblants. A partir du mois de mai, les courbes divergent.

Ainsi, l'évolution des poids corporels des animaux au cours du temps est significativement différente (interaction pathologie*temps, $P < 0.05$) en fonction du statut pathologique.

A partir d'août 2004, la moyenne des poids corporels des animaux sains et tremblants tend à diminuer, reflétant probablement les variations saisonnières. Les courbes évoluent en parallèle avec des poids plus faibles pour les tremblants.

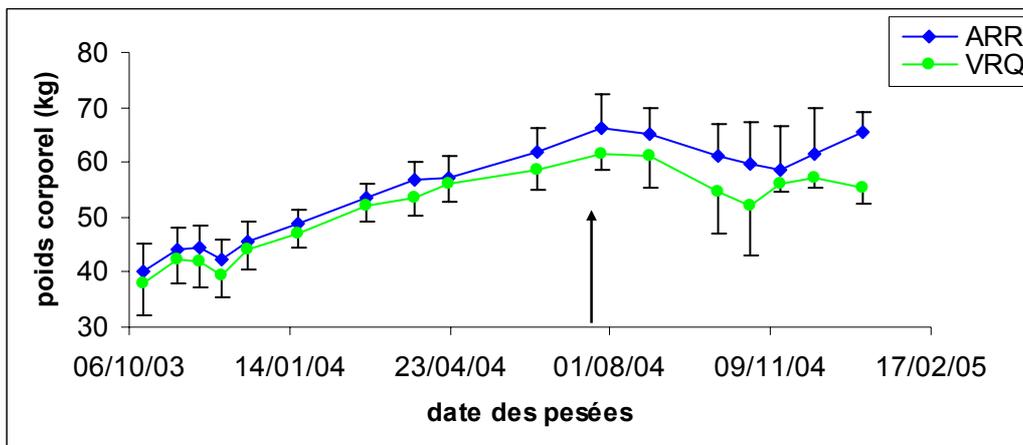


Figure 7 : Evolution des poids corporels (moyenne \pm ET) des béliers résistants (ARR, n=5) et sensibles à la tremblante (VRQ, n=5) de 7 à 24 mois. La flèche indique le moment où les premiers signes cliniques ont été observés (Juillet 2004).

II.1.2 SUIVI BI-HEBDOMADAIRE DES CONCENTRATIONS DE GH

Lvolution des concentrations plasmatiques moyennes de la GH au cours du temps chez les ovins sains et tremblants est représentée par la figure 8.

Lvolution temporelle des concentrations de GH diffère significativement en fonction de ltat pathologique (interaction pathologie*temps, $P < 0.01$).

À linspection visuelle, les deux courbes sont quasiment superposables jusquà approximativement fin septembre 2004 cest à dire au moins 2 mois après lapparition des premiers signes cliniques. Pendant cette période, on ne note pas daugmentation des concentrations de GH. Par la suite, vers le 31/10/2004, la figure fait apparaître une augmentation transitoire des concentrations plasmatiques de GH chez les béliers tremblants.

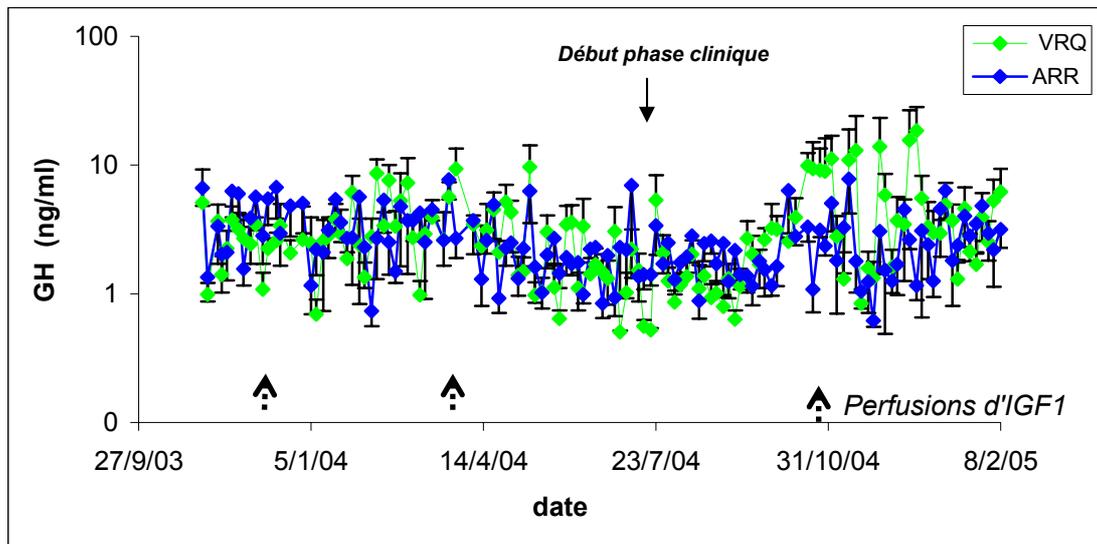


Figure 8 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques en GH (moyenne \pm ET) chez des béliers, entre 7 mois et 2 ans dge, de génotype résistant à la tremblante (ARR) ou sensible (VRQ). Les prélèvements ont été réalisés deux fois par semaine.

II.2 EFFET DE LIGF-I

II.2.1 GLYCEMIE

L'effet d'une perfusion d'IGF-I ou de solvant, associée à un bolus iv de GHRH, sur la glycémie est illustré par la figure 9.

La perfusion de solvant n'entraîne aucune modification de concentration en glucose par rapport à la période de base (-120 à 0 min). En revanche, la perfusion d'IGF-I induit une augmentation progressive de la glycémie (effet traitement $P=0.003$) quels que soient le statut et la période. Il n'existe pas d'interaction avec le statut.

De façon assez surprenante, on observe un léger effet hyperglycémiant de l'IGF-I (augmentation de 1% de la glycémie) chez les béliers tremblants et sains et aux deux périodes de l'étude.

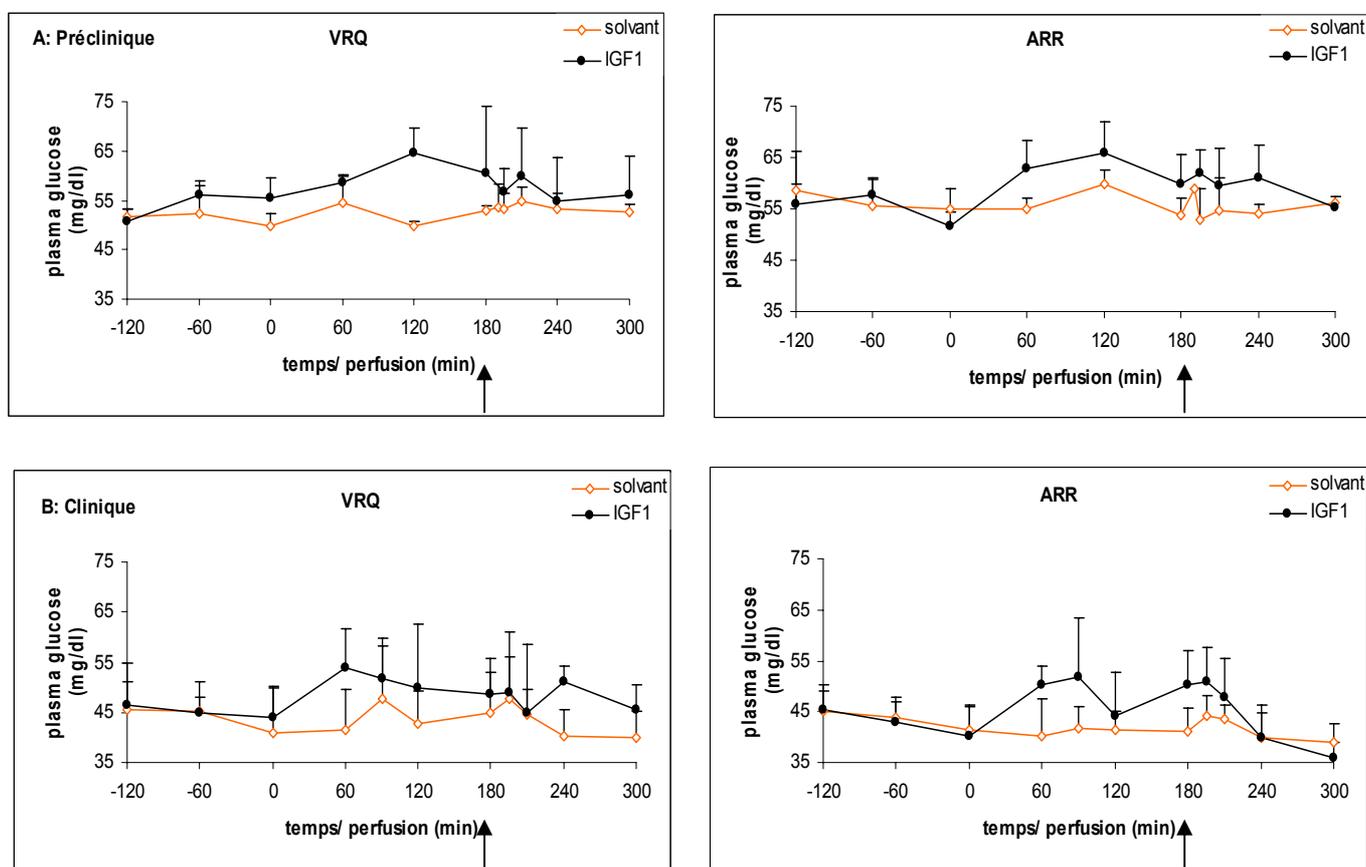


Figure 9 : Glycémie (moyenne \pm ET) des béliers sensibles (VRQ) ou résistants (ARR) à la tremblante pendant une perfusion de solvant ou d'IGF1 ($14 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$) réalisée en phase préclinique (A) ou en phase clinique de tremblante (B) des animaux VRQ. La perfusion de solvant (symboles ouverts) ou d'IGF1 (symboles fermés) a été maintenue pendant 4 heures de $t=0$ min à $t=240$ min (aires grisées). La flèche, à $t=180$ min, indique le moment de l'administration d'un bolus iv de GHRH à la dose de $0.7 \mu\text{g}/\text{kg}$.

II.2.2 IGF-I TOTAL ET LIBRE

La figure 10 représente la concentration en IGF-I total chez les béliers sains et tremblants en période clinique.

Après le début de la perfusion d'IGF-I (à $t=0$ min), les concentrations en IGF-I total ont doublé par rapport aux concentrations basales ($t=-120$ min à $t=0$ min) quel que soit le statut de l'animal. Cette augmentation est survenue dans l'heure qui a suivi le début de la perfusion d'IGF-I. Ensuite, les concentrations en IGF-I total sont restées stables tout au long de la perfusion.

La figure 11 représente les concentrations en IGF-I libre chez les béliers sains et tremblants en période clinique. On ne note pas de différence entre les concentrations libres d'IGF-I des béliers tremblants et sains. Etant donné que les concentrations totales et concentrations libres en IGF-I sont similaires chez les animaux sains et tremblants, la fraction libre n'est pas non plus différente entre les béliers sains et les tremblants.

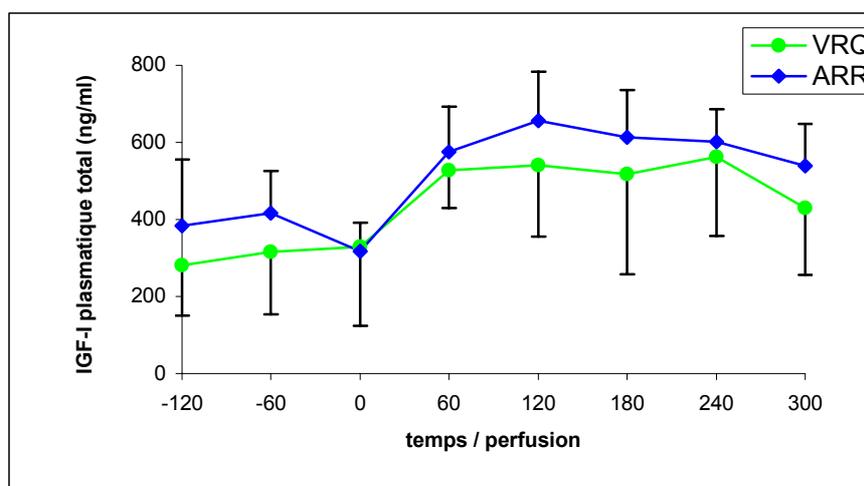


Figure 10 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques en IGF-I total (moyenne \pm ET) chez des béliers résistants (ARR) ou sensibles (VRQ) à la tremblante avant et au cours de la perfusion d'IGF-I ($14 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$) réalisée en phase clinique de tremblante. La perfusion d'IGF-I (aire grisée) a été maintenue pendant 4 heures de $t=0$ min à $t=240$ min.

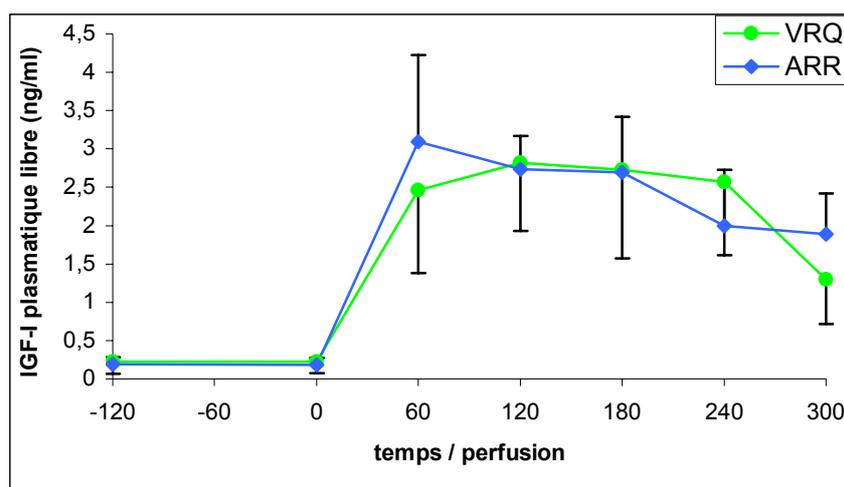


Figure 11 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques en IGF-I libre (moyenne \pm ET) chez des béliers sains (ARR) et tremblants (VRQ) avant et au cours de la perfusion d'IGF-I (14 μ g/kg/h) réalisée en phase clinique de tremblante. La perfusion d'IGF-I (aire grisée) a été maintenue pendant 4 heures de t=0 min à t=240 min.

II.3 EFFET DE L'IGF-I SUR LES SECRETIONS DE GH BASALES ET INDUITES PAR LA GHRH EN PHASE PRECLINIQUE ET CLINIQUE DE LA MALADIE

II.3.1 EFFET DE LA PERFUSION D'IGF-I SUR LA SECRETION SPONTANEE DE GH

La figure 12 représente les concentrations plasmatiques moyennes (\pm ET) de GH des béliers sains et tremblants, avant et pendant la perfusion d'IGF-I ou de solvant et au cours de la phase précliniqu e et clinique.

La figure 13 représente la différence entre les concentrations moyennes après la perfusion et les concentrations moyennes basales chez les béliers sains et tremblants en phase précliniqu e et clinique.

La perfusion de solvant n'a induit aucun effet significatif sur les concentrations en GH quel que soit le groupe ou la période.

Les concentrations moyennes en GH sous perfusion de solvant (t=0 min à t=180 min) n'ont pas différé entre béliers sains et tremblants durant la période précliniqu e (7.4 ± 3.5 ng/ml vs. 7.8 ± 3.4 ng/ml). En revanche, lors de la période clinique, les concentrations plasmatiques moyennes en GH (moyenne base + perfusion de solvant) ont été quasiment 2

fois plus élevées chez les animaux tremblants que chez les animaux sains (14.3 ± 2.4 vs. 7.2 ± 1.6 ng/ml).

La perfusion d'IGF-I a diminué significativement les concentrations basales de GH quels que soient le statut et la période (effet traitement $P < 0.001$).

Il existe un effet période ($P=0.045$). La réponse de la sécrétion de GH à l'IGF-I a été plus importante en période clinique qu'en période préclinique. Les animaux tremblants répondent mieux à la perfusion d'IGF-I en phase clinique qu'en phase préclinique.

Une interaction significative a été observée entre statut*période*traitement ($P=0.008$). L'effet traitement diffère suivant le statut pathologique mais de façon dépendante de la période. En fait, l'effet de l'IGF-I sur la sécrétion de GH (différentiel perfusion – base) a été plus important chez les animaux tremblants que chez les animaux contrôles en période clinique uniquement ($P=0.022$).

L'effet séquence n'a pas été significatif.

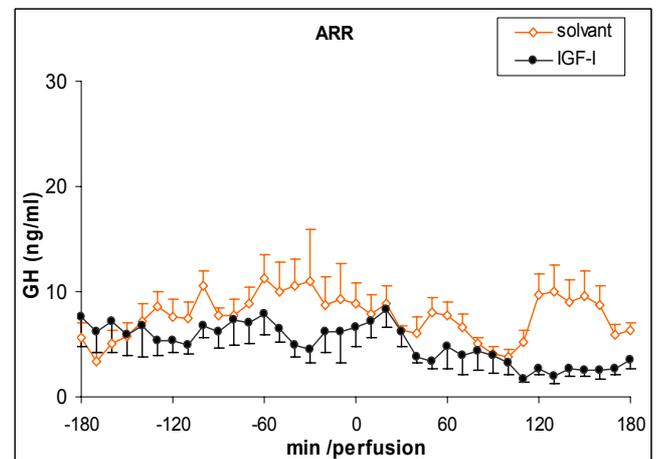
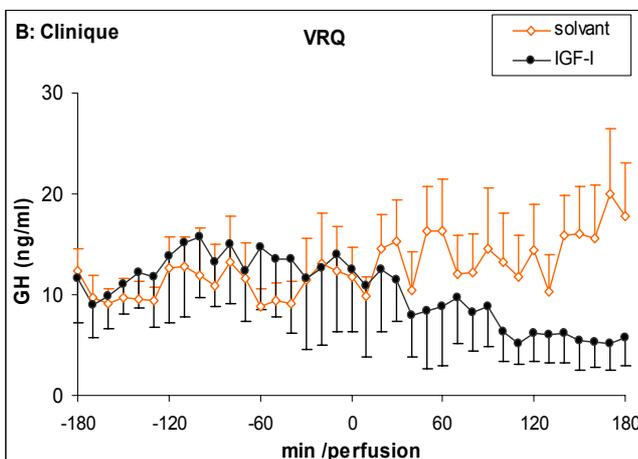
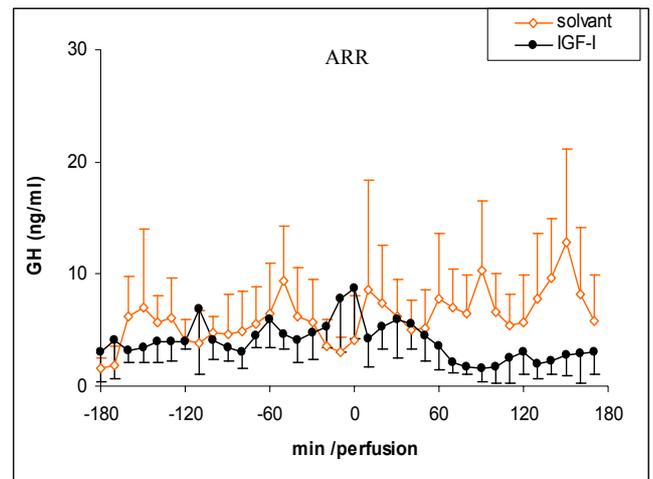
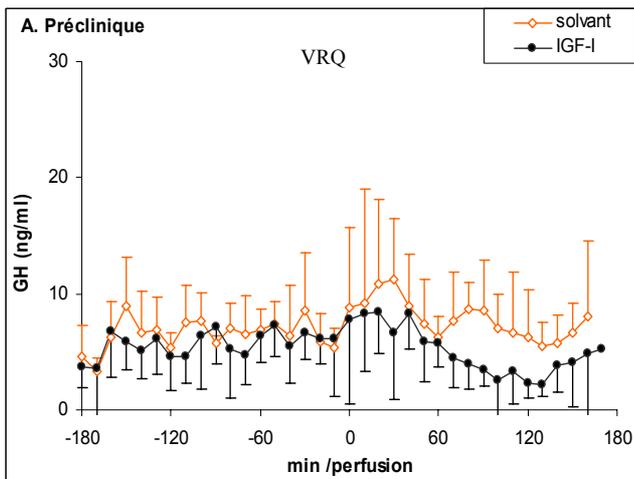


Figure 12 : Effet d'une perfusion de solvant ou d'IGF-I recombinante humaine sur les concentrations plasmatiques moyennes (\pm ET) de GH chez des béliers adultes de génotype résistant (ARR) ou sensible (VRQ) à la tremblante. Les perfusions de solvant et d'IGF-I ont été réalisées sur les mêmes animaux à deux reprises par rapport à l'évolution de la maladie chez les animaux VRQ : 1) phase préclinique (A) et 2) début de phase clinique (B). La GH a été dosée dans des prélèvements effectués toutes les 10 minutes, pendant 3 heures avant le début de la perfusion et pendant 3 heures de perfusion de solvant ou d'IGF-I (aires grisées).

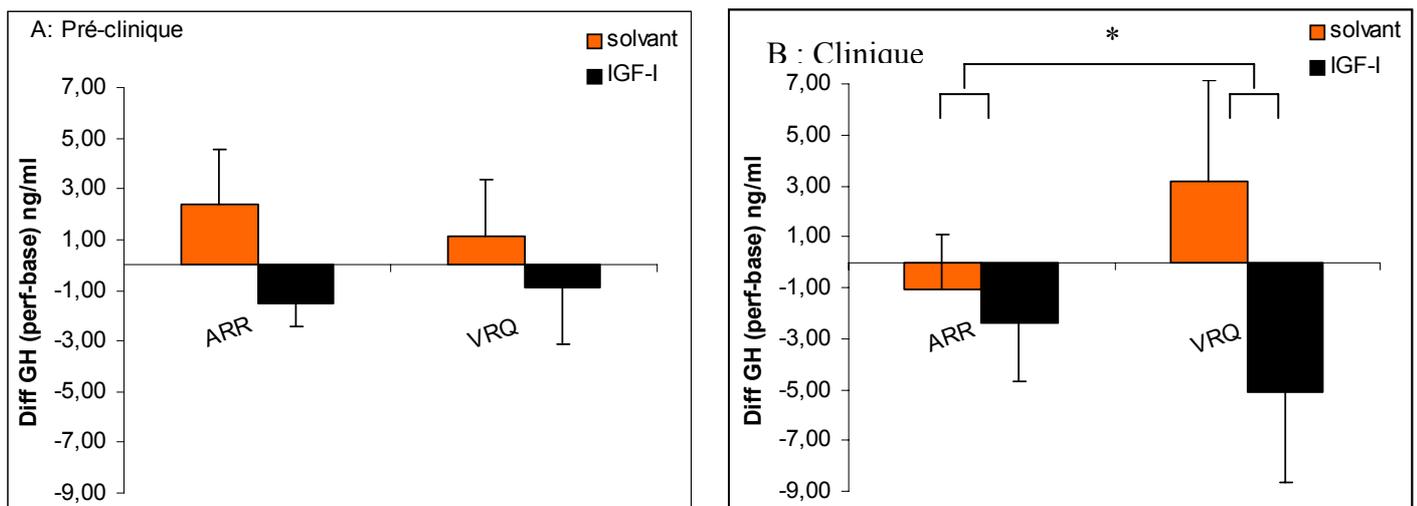


Figure 13 : Différentiel des concentrations moyennes (\pm ET) de GH en phase préclinique et clinique (moyenne des concentrations en GH après perfusion d'IGF-I ou solvant) – (moyenne des concentrations basales en GH) chez les tremblants (VRQ) et chez les contrôles (ARR) soumis à l'effet des perfusions de solvant ou IGF-I.

II.3.2 EFFET D'UNE PERFUSION D'IGF-I SUR LES CONCENTRATIONS MOYENNES EN GH INDUITES PAR LA GHRH

La figure 14 représente l'évolution des concentrations plasmatiques moyennes (\pm ET) en GH des béliers ARR et VRQ, sous perfusion de solvant ou d'IGF-I, 1 heure avant le bolus de GHRH puis 2 heures après ce bolus.

Avant le bolus de GHRH, les concentrations en GH lors de la perfusion d'IGF-I étaient plus faibles que lors de la perfusion de solvant quels que soient le groupe et la période. Ceci correspond aux résultats précédents.

L'injection de GHRH a entraîné un pic physiologique de GH net, immédiat et bref que l'animal soit sous perfusion de solvant ou d'IGF-I. Les concentrations de GH ont ensuite diminué progressivement pour revenir dans l'heure qui suivait aux concentrations initiales. Les béliers sensibles et résistants, en phase préclinique ou clinique ont répondu de façon similaire au bolus de GHRH.

La figure 15 représente le ratio (\pm ET) des AUC des concentrations moyennes de GH (AUC 1 heure post bolus GHRH / AUC 1 heure pré bolus de GHRH), sous perfusion de solvant et d'IGF-I pour les animaux sains et tremblants. Sous solvant, quelle que soit la période, la réponse de GH à cette dose de GHRH n'est pas modifiée par le statut pathologique. L'effet statut pathologique n'est donc pas significatif.

De même, il n'existe ni d'effet traitement, ni d'effet période significatif.

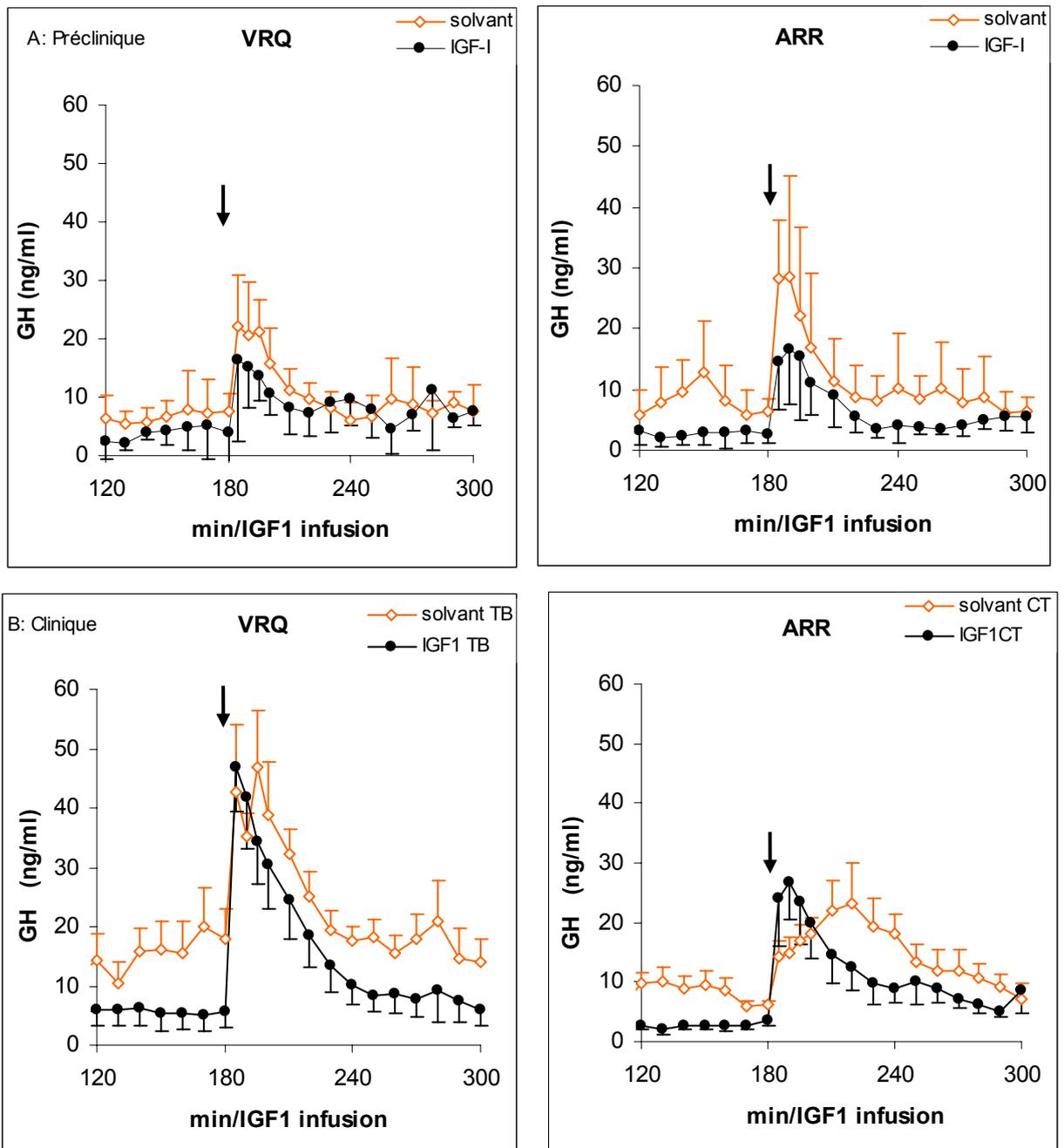


Figure 14 : Effets d'une perfusion d'IGF-I recombinante humaine sur la sécrétion de GH induite par le GHRH (indiqué par la flèche) ($0.7 \mu\text{g/kg}$ iv à $t=180 \text{ min}$) chez des béliers contrôles résistants ($n=5$, génotype ARR) ou sensibles ($n=5$, génotype VRQ)) à la tremblante. Les béliers ont reçu une perfusion (aires grisées) de solvant ou d'IGF-I ($14 \mu\text{g/kg/h}$) pendant 3 heures précédant l'administration d'un bolus de GHRH ovine ($t=180 \text{ min}$). La GH a été dosée dans des échantillons de sang prélevés toutes les 10 minutes avant la GHRH puis toutes les 5 minutes pendant 30 minutes suivant l'injection de GHRH et toutes les 10 minutes jusqu'à $t=300 \text{ min}$. La perfusion de solvant ou d'IGF-I a été interrompue 1 heure après l'administration de GHRH ($t=240 \text{ min}$). L'expérience a été réalisée durant la phase préclinique (A) et la phase clinique (B) de la maladie des animaux génétiquement sensibles.

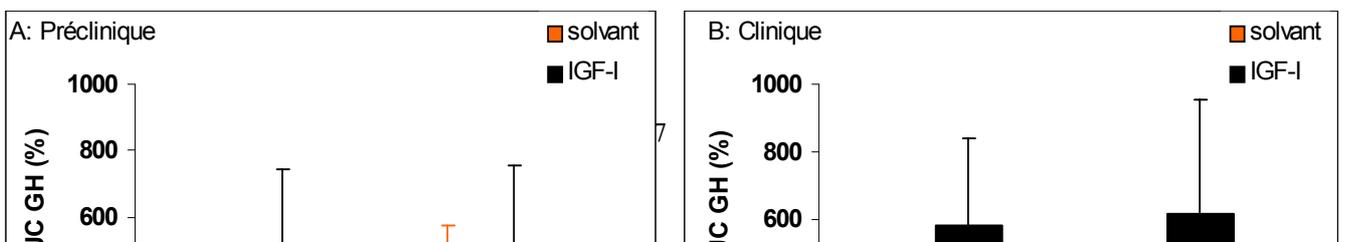


Figure 15 : Ratio des AUC des concentrations de GH ($\text{AUC 1 heure post bolus de GHRH} / \text{AUC 1 heure pré bolus de GHRH}$) sous solvant ou IGF-I en phase préclinique (A) et en phase clinique (B) chez les sains ARR et les tremblants VRQ.

DISCUSSION

L'équilibre endocrinien joue un rôle majeur dans le maintien et la protection du SNC. Il est donc envisageable que des altérations des fonctions endocriniennes participent au processus de neurodégénérescence dans les maladies à prion.

L'axe hypothalamo-hypophysaire somatotrope a retenu notre attention pour ce travail de thèse pour deux raisons :

1) cet axe neuroendocrinien est reconnu comme acteur essentiel dans les mécanismes de neuroprotection du SNC,

2) les concentrations circulantes en GH sont augmentées chez des ovins tremblants (Viguié et al., 2004).

Ce dernier résultat, dont on ignore la signification d'un point de vue physiopathologique, suggère l'implication de l'axe somatotrope dans la physiopathologie de la tremblante, et plus généralement dans les maladies neurodégénératives.

L'objectif de notre travail était d'appréhender l'origine de l'augmentation de GH chez les ovins tremblants. Pour cela, nous avons étudié deux mécanismes pouvant expliquer cette augmentation de GH : une diminution de l'efficacité du rétrocontrôle négatif exercé par l'IGF-I sur l'axe hypothalamo-hypophysaire somatotrope et/ou une sensibilité accrue de l'hypophyse à la GHRH. Compte tenu des activités biologiques de neuroprotection de l'IGF-I (action anti-apoptotique, modulation de l'excitation neuronale, amélioration du métabolisme des cellules nerveuses), il est plausible qu'une altération des effets de l'IGF-I, évaluée dans cette thèse par un déficit du rétrocontrôle négatif sur l'axe somatotrope, contribue au processus de neurodégénérescence des maladies à prion. Cependant, nos travaux n'ont pas permis de révéler une diminution de l'action de l'IGF-I ni une sensibilité accrue à la GHRH. L'augmentation des concentrations de GH chez les animaux tremblants n'a toujours pas d'explication mécanistique.

Nos résultats ne permettent pas de mettre en évidence un déficit d'action de l'IGF-I sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. En effet, l'IGF-I inhibe les sécrétions spontanées de GH sur des béliers à jeun, qu'ils soient sains ou tremblants. Un rétrocontrôle négatif efficace existe donc sur la synthèse et/ou libération de la GH, que l'animal soit malade ou non. En outre, ce rétrocontrôle négatif est plus important pour les animaux tremblants en phase clinique que pour les animaux sains contemporains.

Le maintien du rétrocontrôle négatif de l'IGF-I sur la sécrétion de GH chez les tremblants ne nous permet pas d'exclure l'hypothèse d'un déficit d'action de l'IGF-I au niveau central dans les maladies neurodégénératives. En effet, notre étude peut présenter certaines limites dont le choix du marqueur (rétrocontrôle négatif de l'IGF-I sur la sécrétion de GH) pour évaluer l'efficacité de l'IGF-I au niveau central. La littérature affirme l'existence du rétrocontrôle de l'IGF-I au niveau hypophysaire notamment sur la réponse au GHRH. En revanche, l'exercice de ce rétrocontrôle au niveau hypothalamique est controversé chez le mouton (Spencer et al., 1991 ; Fletcher et al., 1995). Ainsi, l'efficacité de l'IGF-I, mise en évidence sur la sécrétion spontanée de GH, ne reflète peut-être pas les effets de l'IGF-I au niveau central. L'hypothèse d'un déficit d'action de l'IGF-I au niveau central chez les animaux tremblants ne peut donc pas être totalement exclue. Un tel déficit est en effet suggéré par les travaux d'Ostlund et coll (2001). Cette équipe a montré que l'infection de neuroblastomes (cellules nerveuses en cultures) par de la PrPsc entraîne des altérations de l'expression du gène du récepteur à l'IGF-I (IGFI-R) et de sa fonctionnalité. Ces derniers auteurs observent une augmentation de l'expression du gène de l'IGFI-R associée à une diminution de l'affinité du récepteur pour l'IGF-I entraînant une diminution de la liaison de l'IGF-I à son récepteur. Ils ont également observé une altération du signal de transduction de la cellule après la fixation de l'IGF-I à son récepteur. Ce dysfonctionnement central de l'IGFI-R pourrait participer à la physiopathologie des maladies neurodégénératives, en rendant les cellules plus sensibles à la mort neuronale du fait de la diminution des effets neuroprotecteurs de l'IGF-I.

Les résultats de notre étude révèlent un effet inhibiteur plus marqué de l'IGF-I sur l'axe hypothalamo-hypophysaire somatotrope en phase clinique chez les béliers tremblants. On peut s'interroger sur les mécanismes sous-jacents à cette augmentation de réponse à l'IGF-I chez les béliers tremblants, ainsi que sur sa signification sur la physiopathologie de la tremblante.

L'IGF-I a la particularité de posséder un système de protéines de transport spécifiques et complexes : les IGF-BPs. Ces protéines modulent la liaison de l'IGF-I à son récepteur jouant alors un rôle déterminant dans la régulation des fonctions de l'IGF-I (Jones et al., 1995). L'affinité de l'IGF-I pour ces protéines de liaison (BP) est meilleure que pour son propre récepteur. Les concentrations en IGF-I libre (forme active) dépendent de sa liaison avec les BPs. La différence d'effet de l'IGF-I, observée chez les animaux tremblants en phase

clinique, pourrait être liée à une modification des protéines de transport comme cela est décrit dans diverses pathologies neurodégénératives telles que la neuropathie diabétique chez le rat (Busiguina et al., 1996) ou encore des accidents cérébraux ischémiques chez l'homme (Schawb et al., 1997). Nos résultats montrent que les concentrations en IGF-I libres circulantes ne diffèrent pas entre les groupes, que ce soient les concentrations de base ou sous perfusion, suggérant que la tremblante, même en phase terminale, n'est pas associée à de profondes modifications des IGFBPs. Cependant, l'expression et la régulation des IGFBPs dépendent des tissus (Busiguina et al., 1996). Ainsi, l'absence de différence des concentrations plasmatiques d'IGF-I libres entre animaux sains et tremblants n'est pas nécessairement représentative de la régulation tissulaire. Il n'est donc pas exclu qu'une modification tissulaire des BPs soit l'un des mécanismes sous-jacents de l'action plus importante de l'IGF-I chez les animaux tremblants.

Etant donné les effets neuroprotecteurs de l'IGF-I, une augmentation des effets de l'IGF-I au niveau central pourrait intervenir comme un mécanisme compensateur de l'affection neurodégénérative, similaire à celui décrit en cas d'hypoxie (Wang et al., 2004 ; Guan et al., 2003). Dans le cas d'hypoxie-ischémie chez le rat, une surexpression des ARNm de l'IGF-I dans les cellules neuronales du cortex et de l'hippocampe permet d'augmenter la survie neuronale (Wang et al., 2004). *In vitro*, la dégénérescence neuronale, liée à l'hypoxie, est ralentie par l'administration d'IGF-I exogène. L'augmentation de la transcription du gène de l'IGF-I est une des réponses d'adaptation métabolique à l'hypoxie (Wang et al., 2004). Guan observe le même phénomène avec une induction plus importante de l'IGF-I, de ses BPs et de ses récepteurs dans les régions cérébrales endommagées par une hypoxie-ischémie (Guan et al., 2003). De même, la surexpression du gène de l'IGF-I-R chez des patients infectés par le virus d'immunodéficience humain de type 1, améliore l'effet neuroprotecteur de l'IGF-I et limite l'étendue des lésions neuronales (Ying Wang., 2003). Dans la maladie d'Alzheimer chez l'homme, l'IGF-I interviendrait aussi comme un facteur neuroprotecteur en favorisant l'élimination hors du cerveau de certaines molécules qui participent à la neurodégénérescence : les amas β amyloïde (Carro et al., 2002).

Il est possible qu'un autre type de mécanisme compensateur non lié au SNC mais au statut métabolique intervienne pour limiter les effets délétères de la maladie.

Etant donné le rôle primordial de l'IGF-I dans le métabolisme protéique (Le Roith., 2001), l'augmentation de la réponse à l'IGF-I observée en phase terminale de tremblante pourrait refléter le développement de mécanismes compensateurs visant à limiter le syndrome catabolique. Cette hypothèse est aussi évoquée par Crown et coll chez l'homme atteint de

cancer (Crown et al., 2002). Ils ont observé une importante protéolyse des IGFBP-III lors de cachexie d'origine cancéreuse. Le degré de protéolyse est inversement proportionnel à la perte de masse musculaire et au développement de la cachexie. Cette protéolyse des IGFBPs pourrait donc apparaître comme un mécanisme compensateur protecteur, en augmentant la biodisponibilité de l'IGF-I pour les tissus et les muscles (Crown et al., 2002).

De même que l'augmentation des concentrations de GH n'est vraisemblablement pas la conséquence d'un déficit d'action de l'IGF-I, nos résultats suggèrent que cette augmentation de GH n'est pas non plus la conséquence d'une sensibilité accrue à la GHRH. On observe en effet, sous perfusion de solvant, une augmentation similaire des concentrations de GH en réponse à une dose physiologique de GHRH, chez les animaux tremblants et sains quelle que soit la période. Cependant, en l'absence d'une évaluation de type dose/effet, il nous était impossible de caractériser correctement la réponse au GHRH de l'axe hypothalamo-hypophysaire somatotrope. En effet, une approche de dose unique de GHRH, telle que celle mise en œuvre dans notre étude, ne permet pas de déterminer les 3 paramètres caractérisant la réponse en terme de sécrétion de GH au GHRH : Emax (efficacité maximale de la réponse), EC50 qui traduit la puissance de la réponse et sensibilité qui correspond à la pente de la courbe dose-réponse. On peut observer pour une dose donnée, une réponse identique chez les béliers sains et tremblants alors qu'un ou plusieurs de ces paramètres sont modifiés. Ainsi, la réponse à une dose unique de GHRH ne permet pas de conclure définitivement à l'absence d'une sensibilité accrue à la GHRH chez les animaux tremblants.

Indépendamment de la problématique de la tremblante, on observe de façon très surprenante une absence de rétrocontrôle négatif de l'IGF-I sur la sécrétion de GH induite par la GHRH, alors même que la sécrétion spontanée de GH était fortement inhibée par l'IGF-I. Cette absence d'effet de l'IGF-I sur la sécrétion de GH induite par la GHRH est contradictoire avec les données de la littérature. En effet, l'adjonction d'IGF-I à des cultures cellulaires hypophysaires d'ovin entraîne une diminution de la sécrétion induite par la GHRH (Silverman et al., 1989). Cependant, cette absence de modification de la réponse au GHRH par l'IGF-I a également été décrite *in vivo* chez la femme (Jaffe et al., 1998).

L'effet du GHRH sur l'augmentation des concentrations de GH, correspond essentiellement à des mécanismes hypophysaires modulés par l'action inhibitrice de la SRIH, comme cela est décrit sur des cultures hypophysaires d'ovin (Silverman et al., 1989 ;

Blanchard et al., 1988). Nos résultats suggèrent donc que l'IGF-I, chez l'ovine, n'interviendrait pas au niveau hypophysaire du moins sur la GHRH et la SRIH, contrairement à ce que suggère la littérature (Silverman et al., 1989). Il reste néanmoins une voie potentielle qui pourrait être modulée par l'IGF-I au niveau hypophysaire : la voie des GHRPs, stimulateur de la sécrétion de GH. Alternativement, on peut imaginer la possibilité d'une action centrale de l'IGF-I chez le mouton, étant donné les nombreux arguments en faveur de cette hypothèse dans différentes espèces et pour différents modèles :

1- L'action centrale de l'IGF-I a déjà été mise en évidence chez d'autres espèces comme chez le rat. Tout d'abord, Berelowitz et coll observent, sur des cultures hypothalamiques de rat, une stimulation de la libération de la SRIH lors d'incubation avec l'IGF-I (Berelowitz et al., 1981). Puis, Shibasaki et coll montrent que l'adjonction de concentrations croissantes d'IGF-I, à des cultures de cellules hypothalamiques de rat, entraîne une diminution de plus en plus importante de la libération de la GHRH (Shibasaki et al., 1986). Enfin, la perfusion icv d'IGF-I chez des rats a montré une diminution de l'expression des ARNm de la GHRH et une augmentation de l'expression des ARNm de la SRIH au niveau hypothalamique (Sato et al., 1993). Ces données scientifiques mettent en évidence l'existence d'une action centrale de l'IGF-I chez le rat.

2- Il existe une distribution ubiquitaire des récepteurs de l'IGF-I dans le SNC. Chez le rat, de très nombreux sites spécifiques de liaison de l'IGF-I se trouvent dans le plexus choroïde du 3ème ventricule, dans le thalamus ainsi que dans l'hippocampe. L'hypothalamus présente une quantité modérée de récepteurs à l'IGF-I dans les noyaux supraoptiques, suprachiasmatiques et paraventriculaires et une quantité beaucoup plus importante dans l'éminence médiane (Bohannon et al., 1988), site de libération de la GHRH et de la SRIH.

3- L'IGF-I passe la barrière hémato-méningée par un système de transport spécifique chez les souris (Yu et al., 2006). Une perfusion d'IGF-I radioactif par l'artère carotidienne sur des rats, a montré l'accumulation d'IGF-I marqué dans les zones où les récepteurs à l'IGF-I sont les plus nombreux (thalamus antérieur, noyaux paraventriculaires et supraoptiques). L'accumulation de l'IGF-I dans le parenchyme cérébral se fait par transcytose à travers l'endothélium des capillaires cérébraux (Reinhardt et al., 1994). Si tel est le cas chez l'ovine, et que le passage de la barrière hémato-méningée est essentiel à l'action centrale de l'IGF-I,

alors l'administration icv d'IGF-I n'est peut-être pas un bon moyen d'atteindre les récepteurs cibles dans le SNC, contrairement à une administration systémique.

L'absence d'effet de l'IGF-I sur un mécanisme hypophysaire clé (réponse en terme de GH au GHRH), conjointement à un effet sur la sécrétion spontanée de GH suggère l'existence d'effets centraux de l'IGF-I chez l'ovine.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre étude expérimentale a montré un effet plus important de l'IGF-I chez les animaux tremblants en phase clinique, suggérant que des mécanismes compensateurs IGF-I dépendant pourraient être développés dans la tremblante, et peut-être plus généralement dans les maladies neurodégénératives. Notre hypothèse de déficit d'action de l'IGF-I chez les animaux tremblants n'est donc pas validée.

De même, l'augmentation des concentrations de GH ne peut être expliquée par une sensibilité accrue à la GHRH.

Ainsi, notre étude n'a pas permis d'identifier l'origine de l'augmentation des sécrétions de GH chez les animaux tremblants. Cependant, il reste deux voies majeures de la régulation de la sécrétion de GH qui n'ont pas été explorées dans les maladies à prion : le système de la SRH et les ligands des GH Releasing Peptide-Recepteurs (GHRP-R).

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

Mlle BOBET Anne-Sophie

a été admis(e) sur concours en : 2001

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : **06 JUIL. 2006**

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussignée, V. GAYRARD-TROY, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, autorise la soutenance de la thèse de :

Mlle BOBET Anne-Sophie

intitulée :

« Evaluation d'un déficit d'action des IGF-I chez des animaux atteints de tremblante. »

**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Véronique GAYRARD-TROY**



**Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON**



**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Marie-Bernadette DELISLE**



**Vu le : 10 JUIL. 2006
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Jean-François SAUTEREAU**



BIBLIOGRAPHIE

1. ABERG, MA., HABERG, ND., HEDBACKER, H., OSCARSSON, J., ERIKSSON, PS. Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci.*, 2000, **20**, 8, 2896-2903.
2. ADAMS, TE., HANSEN, JA., STARR, R., NICOLA, NA., HILTON, DJ., BILLESTRUP, N. Growth hormone preferentially induces the rapid, transient expression of SOCS-3, a novel inhibitor of cytokine receptor signaling. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 3, 1285-1287.
3. ARVAT, E., BROGLIO, F., GHIGO, E. Insulin Like Growth Factor-I: implications in aging. *Drugs Aging*. 2000, **16**, 1, 29-40.
4. BARENTON, B., PELLETIER, J., ORTAVANT, R. Demonstration of the influence of the photoperiod on the plasma concentration of the growth hormone in the ram. *C R Seances Acad Sci III.*, 1983, **297**, 6, 327-330.
5. BARENTON, B., CHABANET, C., PELLETIER J. Influence of photoperiod and protein diet on growth hormone secretion in rams. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, 1987, **185**, 312-317.
6. BARINAGA, M., YAMONOTO, G., RIVIER, C., VALE, W., EVANS, R., ROSENFELD, MG. Transcriptional regulation of growth hormone gene expression by growth hormone-releasing factor. *Nature*, 1983, **306**, 5938, 84-85.
7. BARINAGA, M., BILEZIKJIAN, L.M., VALE, W., ROSENFELD, M.G., EVANS, R.M. Independent effects of growth hormone releasing factor on growth hormone release and gene transcription. *Nature*, 1985, **314**, 279-281.
8. BERELOWITZ, M., SZABO, M., FROHMAN, LA., FIRESTONE, S., CHU, L., HINTZ, RL. Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. *Science*, 1981, **212**, 4500, 1279-1281.
9. BILEZIKJIAN, LM., VALE, WW. Stimulation of adenosine 3', 5'-monophosphate production by growth hormone-releasing factor and its inhibition by somatostatin in anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology*, 1983, **113**, 5, 1726-1731.
10. BLANCHARD, MM., GOODYER, CG., CHARRIER, J., BARENTON, B. In vitro regulation of growth hormone (GH) release from ovine pituitary cells during fetal and neonatal development : effects of GH-releasing factor, somatostatin, and insulin-like growth factor I. *Endocrinology*, 1988, **122**, 5, 2114-2120.
11. BLANCHARD, MM., GOODYER, CG., CHARRIER, J., DULOR, JP., BARENTON, B. Effects of hypothalamic hormones (GRF, TRH, somatostatin) and insulin-like growth factor I on growth hormone secretion from prepubertal male lamb pituitary cultures. *Reprod Nutr Dev*, 1987, **27**, 2B, 471-480.
12. BOHANNON, NJ., CORP, ES., WILCOX, BJ., FIGLEWICZ, DP., DORSA, DM., BASKIN, DG. Localization of binding sites for insulin-like growth factor-I (IGF-I) in the

- rat brain by quantitative autoradiography. *Brain Res*, 1988, **444**, 2, 205-213.
13. BOWERS, CY., MOMANY, F., REYNOLDS, GA., CHANG, D., HONG, A., CHANG, K. Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology*, 1980, **106**, 3, 663-667.
 14. BOWERS, CY., MOMANY, FA., REYNOLDS, GA., HONG, A. On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology*, 1984, **114**, 5, 1537-1545.
 15. BRIARD, N., RICO-GOMEZ, M., GUILLAUME, V., SAUZE, N., VUAROQUEAUX, V., DADOUN, F., LE BOUC, Y., OLIVIER, C., DUTOUR, A. Hypothalamic mediated action of free fatty acid on growth hormone secretion in sheep. *Endocrinology*, 1998, **139**, 12, 4811-4819.
 16. BRUUG, B., DUBREUIL, YL., HUBER, G., WOLLMAN, EE., DELHAYE-BOUCHAUD, N., MARIANI, J. Inflammatory processes induce beta-amyloid precursor protein changes in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1995, **92**, 7, 3032-5.
 17. BRUUNSGAARD, H., PEDERSEN, M., PEDERSEN BK. Aging and proinflammatory cytokines. *Curr Opin Hematol.*, 2001, **8**, 3, 131-136. Review
 18. BUSIGUINA, S., CHOWEN, JA., ARGENTE, J., TORRES-ALEMAN, I. Specific alterations of the insulin-like growth factor I system in the cerebellum of diabetic rats. *Endocrinology*, 1996, **137**, 11, 4980-4987.
 19. BUSIGUINA, S., FERNANDEZ, AM., BARRIOS, V., CLARK, R., TOLBERT, DL., BERCIANO, J., TORRES-ALEMAN, I. Neurodegeneration is associated to changes in serum insulin-like growth factors. *Neurobiol Dis*, 2000, **7**, 657-665.
 20. CARRO, E., TREJO, JL., GOMEZ-ISLA, T., LEROITH, D., TORRES-ALEMAN, I. Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med*, 2002, **8**, 12, 1390-1397.
 21. CATALDI, M., MAGNAN, E., GUILLAUME, V., DUTOUR, A., SAUZE, N., MAZZOCCHI, L., CONTE-DEVOLX, B., OLIVIER, C. Acute stress stimulates secretion of GHRH and somatostatin into hypophysial portal blood of conscious sheep. *Neurosci. Lett*, 1994, **178**, 1, 103-106.
 22. CEDA, GP., DAVIS, RG., ROSENFELD, RG., HOFFMAN, AR. The growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH)-GH-somatostatin axis : evidence for rapid inhibition of GHRH-elicited GH release by insulin-like growth factors I and II. *Endocrinology*, 1987, **120**, 4, 1658-1662.
 23. CHAPMAN, IM., HARTMAN, ML., PEZZOLI, SS., HARRELL, FE JR., HINTZ, RL., ALBERTI, KG., THORNER, MO. Effect of aging on the sensitivity of growth hormone secretion to insulin-like growth factor-I negative feedback. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, **82**, 9, 2996-3004.
 24. CHEN, C., VINCENT, JD., CLARKE, IJ. Ion channels and the signal transduction pathways in the regulation of growth hormone secretion. *TEM*, 1994, **5**, 227-233.
 25. CROWN, AL., COTTLE, K., LIGHTMAN, SL., FALK, S., MOHAMED-ALI, V., ARMSTRONG, L., MILLAR, AB., HOLLY, JM. What is the role of the insulin-like growth factor system in the pathophysiology of cancer cachexia, and how is it regulated? *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2002, **56**, 6, 723-733.
 26. CUIILLÉ, J., CHELLÉ, PL. Pathologie animale : la maladie dite tremblante du mouton

- est-elle inoculable? *C.R. Acad.Sci*, 1936, **26**, 552-1554.
27. DAVEY, HW., MCLACHLAN, MJ., WILKINS, RJ., HILTON, DJ., ADAMS, TE. STAT5b mediates the GH-induced expression of SOCS-2 and SOCS-3 mRNA in the liver. *Mol Cell Endocrinol*, 1999, **158**, 1-2, 111-116.
 28. DAVIS, SL., OHLSON, DL., KLINDT, J., ANFINSON, MS. Episodic growth hormone secretory patterns in sheep : relationship to gonadal steroid hormones. *Am. J. Physiol*, 1977, **233**, 519-523.
 29. DAVIS, SL., OHLSON, DL., KLINDT, J., EVERSON, DO. Estimates of repeatability in the temporal patterns serum growth hormone (GH), prolactin (PRL) and thyrotropin (TSH) in sheep. *J. Anim. Sci*, 1979, **49**, 724-728.
 30. DAVIS, SL., BORGER, ML. Dynamic changes in plasma prolactin, luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized ewes. *J Anim Sci*, 1974, **38**, 4, 795-802.
 31. DAVIS, SL. Plasma levels of prolactin, growth hormone and insulin in sheep following the infusion of arginine, leucine and phenylalanine. *Endocrinology*, 1972, **91**, 2, 549-555
 32. DAVIS, SL. Somatostatin : its influence on plasma levels of growth hormone, prolactin and thyrotropin in sheep. *J Anim Sci*, 1975, **40**, 5, 911-916.
 33. DELLA-FERA, MA., BUONOMO, FC., BAILE, CA. Growth hormone secretory responsiveness to multiple injection of growth hormone-releasing factor in sheep. *Domest. Anim. Endocrinol*, 1986, **3**, 153-164.
 34. D'ERCOLE, AJ., YE, P., CALIKOGLU, AS., GUTIERREZ-OSPINA, G. The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. *Mol Neurobiol*, 1996, 13, 3, 227-255.
 35. DORE, S., KAR, S., QUIRION, R. Insulin-like growth factor I protects and rescues hippocampal neurons against beta-amyloid and human amylin-induced toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, **94**, 9, 4772-4777.
 36. DORMONT, D. La nature et les propriétés physico-chimiques et biologiques des agents transmissibles non conventionnels ou prions : conséquences pour la santé publique. *pathol.biol*, 1995, **43**, 2, 124-136.
 37. DORMONT, D. Les mécanismes de la mort neuronale. *Biofutur*, hors-série, 2001, 22-25.
 38. DRIVER, PM., FORBES, JM. Episodic growth hormone secretion in sheep in relation to time of feeding, spontaneous meals and short term fasting. *J. Physiol (Lond)*, 1981, **317**, 413-424.
 39. DUTOUR, A., BRIARD, N., GUILLAUME, V., MAGNAN, E., CATALDI, M., SAUZE, N., OLIVER, C. Another view of GH neuroregulation : lessons from the sheep. *Eur J Endocrinol*, 1997, **136**, 6, 553-565.
 40. FIRTH, SM., BAXTER, RC. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev*, 2002, **23**, 6, 824-854.
 41. FLETCHER, TP., THOMAS, GB., DUNSHEA, FR., MOORE, LG., CLARKE, IJ. IGF feedback effects on growth hormone secretion in ewes : evidence for action at the pituitary but not the hypothalamic level. *J. Endocrinol*, 1995, **144**, 323-331.
 42. FLORINI, JR., EWTON, DZ., COOLICAN, SA. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev*, 1996, **17**, 5, 481-517.
 43. FUKATA, J., DIAMOND, DJ., MARTIN, JB. Effects of rat growth hormone (rGH)-

- releasing factor and somatostatin on the release and synthesis of rGH in dispersed pituitary cells. *Endocrinology*, 1985, **117**, 2, 457-467.
44. GATFORD, KL., FLETCHER, TP., RAO, A., EGAN, AR., HOSKING, BJ., CLARKE, IJ. GH, GH-releasing factor and somatostatin in the growing lambs : sex differences and mechanisms for sex differences. *J. Endocrinol*, 1997, **152**, 1, 19-27.
 45. GICK, GG., ZEYDIN, FN., BRAZEAU, P., LING, NC., ESCH, FS., BANCROFT, C. Growth hormone-releasing factor regulates growth hormone mRNA in primary cultures of rat pituitary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984, **81**, 5, 1553-5.
 46. GIUSTINA, A., WEHREBERG, WB. 1995, Influence of thyroid hormones on the regulation of growth hormone secretion. *Eur. J. Endocrinol*, **133**, 646-653
 47. GUAN, J., BENNET, L., GLUCKMAN, PD., GUNN, AJ. Insulin-like growth factor-1 and post-ischemic brain injury. *Prog Neurobiol*, 2003, **70**, 6, 443-62.
 48. GUILBERT, C. La dynamique du prion. *Biofutur*, hors-série, 2001, 30-33.
 49. HECK, S., LEZOUALCH, F., ENGERT, S., BEHL, C. Insulin-like growth factor-1-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with activation of nuclear factor kappaB. *J Biol Chem*, 1999, **274**, 14, 9828-35.
 50. HERMAN-BONERT, VS., PRAGER, D., MELMED, S. Growth hormone. The pituitary Ed. Melmed S., Blackwell Science., 1995.
 51. HOCHBERG, Z., BICK, T., AMIT, T., YOPUDIM, MBH. Regulation of growth hormone (GH) receptor turnover by GH pulsation in Molecular and Clinical Advances in Pituitary Disorders Current issues in Endocrinology and Metabolism. Melmed S, Robbins R.J., Eds Blackwell scientific Publications, Boston, 1991, 171-176.
 52. IRANMANESH, A., LIZARRALDE, G., VELDHUIS, JD. Age and relative adiposity are specific negative determinants of the frequency and amplitude of growth hormone (GH) secretory bursts and the half-life of endogenous GH in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab*, 1991, **73**, 5, 1081-1088.
 53. JACOB, R., BARRETT, E., PLEWE, G., FAGIN, KD., SHERWIN, RS. Acute effects of insulin-like growth factor I on glucose and amino acid metabolism in the awake fasted rat. Comparison with insulin. *J Clin Invest*, 1989, **83**, 5, 1717-1723.
 54. JAFFE, CA., HUFFMAN, BW., DEMOTT-FRIBERG, R. Insulin hypoglycemia and growth hormone secretion in sheep : a paradox revisited. *Am J Physiol*, 1999, **277**, 253-258.
 55. JAFFE, CA., OCAMPO-LIM, B., GUO, W., KRUEGER, K., SUGAHARA, I., DEMOTT-FRIBERG, R., BERMAN, M., BARKAN, AL. Regulatory mechanisms of growth hormone secretion are sexually dimorphic. *J Clin Invest*, 1998, **102**, 1, 153-164.
 56. JONES, JL., CLEMMONS, DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins : biological actions. *Endocr Rev*, 1995, **16**, 1, 3-34.
 57. KATOH, K., SHIMOGUCHI, R., ISHIWATA, H., OBARA, Y. Rapid suppressing action of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on GH release from anterior pituitary cells of goats. *Domest Anim Endocrinol*, 2004, **26**, 3, 177-188.
 58. KIM, JI., JU, WK., CHOI, JH., CHOI, E., CARP, RI., WISNIEWSKI, HM., KIM, YS. Expression of cytokine genes and increased nuclear factor-kappa B activity in the brains of scrapie-infected mice. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999, **73**, 1-2, 17-27.

59. KUHARA, T., IKEDA, S., OHNEDA, A., SASAKI, Y. Effects of intravenous infusion of 17 amino acids on the secretion of GH, glucagon, and insulin in sheep. *Am J Physiol*, 1991, **260**, 21-26.
60. FROHMAN, LA., DOWNS, TR., CLARKE, IJ., THOMAS GB. Measurement of growth hormone-releasing hormone and somatostatin in hypothalamic-portal plasma of unanesthetized sheep. Spontaneous secretion and response to insulin-induced hypoglycemia. *J Clin Invest*, 1990, **86**, 1, 17-24.
61. LANDEFELD, TD., EBLING, FJP., SUTTIE, JM., VANNERSON, LA., PADMANABHAN, V., BEITINS, IZ., FOSTER, DL. Metabolic interfaces between growth and reproduction. II. Characterization of changes in messenger ribonucleic acid concentrations of gonadotropin subunits, growth hormone, and prolactin in nutritionally growth-limited lambs and the differential effects of increased nutrition. *Endocrinology*, 1989, **125**, 351-356.
62. LAURENTIE, MP., BARENTON, B., CHARPIER, J., GARCIA-VILLAR, R., MARNET, PG., BLANCHARD, M., TOUTAIN, PL. Instantaneous secretion rate of growth hormone in lambs : relation ships with sleep, food intake an posture. *Endocrinology*, 1989, **125**, 2, 642-651.
63. LAURENTIE, MP., DUCLOS, M., TOUTAIN, PL., CHARRIER, J., BLANCHARD, M., DULOR, JP., MARNET, PG., BARENTON, B. Secretory profiles and production rate of growth hormone in ruminant lambs. *Reprod Nutr Dev*, 1987, **27**, 2B, 525-532.
64. LE ROITH, D., BONDY, C., YAKAR, S., LIU, JL., BUTLER, A. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev*, 2001, **22**, 1, 53-74.
65. LOWE, WL. Biological actions of the insulin6like growth factors. In: LeRoith D (eds) *Insulin-like Growth factors : Molecular and Cellular Aspects*. CRC Press, Boca Raton, 1991, 49-85.
66. MAGNAN, E., CATALDI, M., GUILLAUME, V., MAZZOCCHI, L., DUTOUR, A., CONTE-DEVOLX, B., GIRAUD, P., OLIVER, C. Neostigmine stimulates growth hormone-releasing hormone release into hypophysial portal blood of conscious sheep. *Endocrinology*, 1993, **132**, 3, 1247-51.
67. MAGNAN, E., CATALDI, M., GUILLAUME, V., CONTE-DEVOLX, B., GRAZIANI, N., FIGAROLI, JC., THOMAS, F., CHIHARA, K., OLIVIER, C. Acute changes in growth hormone-releasing hormone secretion after injection of BIM 23014, a long acting somatostatin analog, in rams. *Life Sci*, 1992, **51**, 11, 831-838.
68. MAGNAN, E., CATALDI, M., GUILLAUME, V., MAZZOCCHI, L., DUTOUR, A., RAZAFINDRAIBE, H., SAUZE, N., RENARD, M., OLIVIER, C. Role of GHRH and somatostatin in the mediation of clonidine-induced GH release in sheep. *Endocrinology*, 1994, **134**, 2, 562-567.
69. MELMED, S., YAMASHITA, S. Insulin-like growth factor-I action on hypothyroid rat pituitary cells: suppression of triiodothyronine-induced growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology*, 1986, **118**, 4, 1483-90.
70. MICHEL, D., LEFEVRE, G., LABRIE, F. Interactions between growth hormone-releasing factor, prostaglandin E2 and somatostatin on cyclic AMP accumulation in rat adenohypophysial cells in culture. *Mol Cell Endocrinol*, 1983, **33**, 2-3, 255-264.
71. MORRISON, CD., DANIEL, JA., HOLMBERG, BJ., DJIANE, J., RAVER, N., GERTLER, A., KEISLER, DH. Central infusion of leptin into well-fed and

- undernourished ewe lambs : effects on feed intake and serum concentrations of growth hormone and luteinizing hormone. *J. Endocrinol*, 2001, **168**, 2, 317-324.
72. MÜLLER, EE. Neural control of somatotropic function. *Physiol.Rev*, 1987, **67**, 962-1053.
 73. NAGATANI, S., ZENG, Y., KEISLER, DH., FOSTER, DL., JAFFE, CA. Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and growth hormone secretion in the sheep. *Endocrinology*, 2000, **141**, 11, 3965-75.
 74. NAMBA, H., MORITA, S., MELMED, S. Insulin-like growth factor-I action on growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels : interaction with somatostatin. *Endocrinology*, 1989, **124**, 4, 1794-9.
 75. OSTLUND, P., LINDEGREN, H., PETTERSSON, C., BEDECS, K. Up-regulation of functionally impaired insulin-like growth factor-1 receptor in scrapie-infected neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 2001, **276**, 39, 36110-5.
 76. PERKS, CM., MCCAIG, C., CLARKE, JB., CLEMMONS, DR., HOLLY, JM. A non-IGF binding mutant of IGFBP-3 modulates cell function in breast epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **294**, 5, 988-994.
 77. PERKS, CM., MCCAIG, C., CLARKE, JB., CLEMMONS, DR., HOLLY, JM. Effects of a non-IGF binding mutant of IGFBP-5 on cell death in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **294**, 5, 995-1000.
 78. PRUSINER, S. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 1982, **216**, 136-144.
 79. REINHARDT, RR., BONDY, CA. Insulin-like growth factors cross the blood-brain barrier. *Endocrinology*, 1994, **135**, 5, 1753-1761.
 80. SARTIN, JL., KEMPPAINEN, RJ., COLEMAN, ES., STEELE, B., WILLIAMS, JC. Cortisol inhibition of growth hormone-releasing hormone-stimulated growth hormone release from cultured sheep pituitary cells. *J. Endocrinol*, 1994, **141**, 515-525.
 81. SARTIN, JL., BARTOL, FF., KEMPPAINEN, RJ., DIEBERG, G., BUXTON, D., SOYOOLA, E. Modulation of growth hormone releasing factor stimulated growth hormone secretion by plasma glucose and free fatty acid concentrations in sheep. *Neuroendocrinology*, 1988, **48**, 627-633.
 82. SATO, M., FROHMAN, LA. Differential effects of central and peripheral administration of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor on hypothalamic GH-releasing hormone and somatostatin gene expression in GH-deficient dwarf rats. *Endocrinology*, 1993, **133**, 2, 793-799.
 83. SCHEEPENS, A., SIRIMANNE, ES., BREIER, BH., CLARK, RG., GLUCKMAN, PD., WILLIAMS, CE. Growth hormone as a neuronal rescue factor during recovery from CNS injury. *Neuroscience*, 2001, **104**, 3, 677-687.
 84. SCHOENLE, E., ZAPF, J., HAURI, C., STEINER, T., FROESCH, ER. Comparison of in vivo effects of insulin-like growth factors I and II and of growth hormone in hypophysectomized rats. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1985, **108**, 2, 167-174.
 85. SCHWAB, S., SPRANGER, M., KREMPIEN, S., HACKE, W., BETTENDORF, M. Plasma insulin-like growth factor I and IGF binding protein 3 levels in patients with acute cerebral ischemic injury. *Stroke*, 1997, **28**, 9, 1744-1748.
 86. SHIBASAKI, T., YAMAUCHI, N., HOTTA, M., MASUDA, A., IMAKI, T., DEMURA, H., LING, N., SHIZUME, K. In vitro release of growth hormone-releasing factor from rat

- hypothalamus : effect of insulin-like growth factor-1. *Regul Pept*, 1986, **15**, 1, 47-53.
87. SILVERMAN, BL., BETTENDORF, M., KAPLAN, SL., GRUMBACH, MM., MILLER, WL. Regulation of growth hormone (GH) secretion by GH-releasing factor, somatostatin, and insulin-like growth factor I in ovine fetal and neonatal pituitary cells in vitro. *Endocrinology*, 1989, **124**, 1, 84-89.
 88. SPENCER, GS. Basal secretion of growth hormone in sheep is not influenced by GH feed back. *Comp Biochem. Physiol., C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol*, 1997, **118**, 1, 1-4.
 89. SPENCER, GS., BASS, JJ., HODGKINSON, SC., EDGLEY, WH., MOORE, LG. Effect of intracerebroventricular injection of IGF-I on circulating growth hormone concentrations in the sheep. *Domest Anim Endocrinol*, 1991, **8**, 1, 155-160.
 90. STROBL, JS., THOMAS, MJ. Human Growth hormone. *Pharmacological reviews*, 1994, **46**, 1-34.
 91. TANIYAMA, Y., SUZUKI, T., MIKAMI, Y., MORIYA, T., SATOMI, S., SASANO, H. Systemic distribution of somatostatin receptor subtypes in human : an immunohistochemical study. *J. Endocr*, 2005, **52**, 5, 605-611.
 92. TOMAS, FM., KNOWLES, SE ., OWENS, PC., CHANDLER, CS., FRANCIS, GL., READ, LC., BALLARD, FJ. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and especially IGF-I variants are anabolic in dexamethasone-treated rats. *Biochem J.*, 1992, **282**, 91-97.
 93. VAN DEN BERGHE, G. Dynamic neuroendocrine responses to critical illness. *Neuroendocrinol*, 2002, **23**, 4, 370-391.
 94. VAN DEN BERGHE, G. Neuroendocrine pathobiology of chronic critical illness. *Crit Care Clin*, 2002, **18**, 3, 509-528.
 95. VENTERS, HD., TANG, Q., LIU, Q., VANHOY, RW., DANTZER, R., KELLEY, KW. A new mechanism of neurodegeneration: a proinflammatory cytokine inhibits receptor signaling by a survival peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, **96**, 17, 9879-9884.
 96. VIGUIE, C., CHILLIARD, Y., GAYRARD, V., PICARD-HAGEN, N., MONGET, P., DUTOUR, A., TOUTAIN, PL. Alterations of somatotropic function in prion disease in sheep. *J Endocrinol*, 2004, **183**, 2, 427-435.
 97. WAJCHENBERG, BL., LIBERMAN, B., GIANNELLA NETO, D., MOROZIMATO, MY., SEMER, M., BRACCO, LO., SALGADO, LR., KNOEPFELMACHER, M., BORGES, MHS., PINTO, ACAR., KATER, CE., LENGYEL, AMJ. Growth hormone axis in cushing's syndrome. *Horm. Res*, 1996, **45**, 99-107.
 98. WANG, X., DENG, J., BOYLE, DW., ZHONG, J., LEE, WH. Potential role of IGF-I in hypoxia tolerance using a rat hypoxic-ischemic model : activation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Pediatr Res*, 2004, **55**, 3, 385-394.
 99. WEHRENBURG, WB., GIUSTINA, A. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion. *Neuroend Physiol. And Med* (P.M CONN, M.E FREEMAN, Humana Press Inc. Totowa).
 100. WEST, CR., LOOKINGLAND, KJ., TUCKER, HA. Regulation of growth hormone-releasing hormone and somatostatin from perfused, bovine hypothalamic slices. III. Reciprocal feedback between growth hormone-releasing hormone and somatostatin. *Domest Anim Endocrinol*, 1997, **14**, 5, 358-366.
 101. WILLIAMS, A ., VAN DAM, AM., RITCHIE, D ., EIKELENBOOM, P., FRASER, H. Immunocytochemical appearance of cytokines, prostaglandin E2 and lipocortin-1 in

- the CNS during the incubation period of murine scrapie correlates with progressive PrP accumulations. *Brain Res*, 1997, **754**, 1-2, 171-180.
102. WILLIAMS, A., VAN DAM, AM., MAN-A-HING, WK., BERKENBOSCH, F., EIKELBOOM, P., FRASER, H. Cytokines, prostaglandins and lipocortin-1 are present in the brains of scrapie-infected mice. *Brain Res*, 1994, **654**, 2, 200-206.
103. WOOD, JL., MCGIL, L. S., DONE, SH., BRADLEY, R. Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991. *Vet Res*, 1997, **140**, 7, 167-174.
104. WU, X., HERNDON, DN., WOLF, SE. Growth hormone down-regulation of Interleukin-1beta and Interleukin-6 induced acute phase protein gene expression is associated with increased gene expression of suppressor of cytokine signal-3. *Shock*, 2003, **19**, 4, 314-320.
105. YAMASHITA, N., SHIBUYA, N., OGATA, E. Hyperpolarization of the membrane potential caused by somatostatin in dissociated human pituitary adenoma cells that secrete growth hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, **83**, 16, 6198-6202.
106. YING WANG, J., PERUZZI, F., LASSAK, A., DEL VALLE, L., RADHAKRISHNAN, S., RAPPAPORT, J., KHALILI, K., AMINI, S., REISS, K. Neuroprotective effects of IGF-I against TNFalpha-induced neuronal damage in HIV-associated dementia. *Virology*, 2003, **305**, 1, 66-76.
107. YU, Y., KASTIN, AJ., PAN, W. Reciprocal Interactions of Insulin and IGF1 in Receptor-Mediated Transport across the BBB. *Endocrinology*, 2006.
108. ZAPF, J., HAURI, C., WALDVOGEL, M., FROESCH, ER. Acute metabolic effects and half-lives of intravenously administered insulinlike growth factors I and II in normal and hypophysectomized rats. *J Clin Invest*, 1986, **77**, 6, 1768-1775.

Toulouse, 2006

NOM : BOBET

PRENOM : ANNE-SOPHIE

TITRE : EVALUATION D'UN DEFICIT D'ACTION DES IGF-I CHEZ DES ANIMAUX ATTEINTS DE TREMBLANTE.

RESUME :

L'étude des dysendocrinies associées aux maladies neurodégénératives, pourrait contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de ces affections. Dans la tremblante, pathologie neurodégénérative liée au prion, une augmentation de GH est observée. L'objectif de cette étude est d'explorer deux mécanismes possibles sous-jacents à l'augmentation de GH : un déficit d'action de l'IGF-I et/ou une augmentation de réponse à la GHRH. Nos résultats suggèrent qu'aucun de ces deux mécanismes n'est impliqué. Au contraire, on observe un effet potentialisé de l'IGF-I chez les animaux tremblants en période clinique, suggérant le développement de mécanismes compensateurs du processus pathologique. Ainsi, l'origine de l'augmentation de GH chez les animaux tremblants, reste encore à déterminer.

MOTS-CLES : TREMBLANTE / PRION/ OVIN / DYSENDOCRINIES / IGF-I / RETROCONTROLE NEGATIF / GHRH / NEUROPROTECTION /GH

TITLE: EVALUATION OF IGF-I ACTIVITY IN SCRAPIE-AFFECTED RAMS.

ABSTRACT:

The study of neurodegenerative disease-associated dysendocrinies could contribute to a better understanding of the pathophysiology of these disorders. In scrapie, a prion-associated neurodegenerative pathology, GH secretion is increased. The aim of this study is to test the hypothesis that scrapie associated GH increase results from a deficit of IGF-I action and/or an increased responsiveness of the pituitary to GHRH. Our results suggest that none of these two mechanisms is involved. In contrast, IGF-I negative feedback on GH secretion is higher in scrapie sensitive animals during the clinical stage of the disease than in healthy controls. This result suggests the development of compensatory mechanisms involving the somatotropic axis. Finally, further investigations are required to determine the mechanisms underlying the increase in GH secretion in scrapie.

KEY WORDS : SCRAPIE / PRION/ SHEEP/ DYSENDOCRINIES/ IGF-I / NEGATIVE FEEDBACK / GHRH / NEUROPROTECTION / GH

