TABLE DES ABREVIATIONS

°C	degré Celcius
µg	microgramme
A.M.M.	autorisation de mise sur le marché
ABP	androgene binding protein
Ac	acéthyl
ACTH	adrenocorticotropic hormone
Ala	alanine
AMPc	adénosine monophosphorique cyclique
Arg	arginine
ARNm	acide ribonucléique messager
Ca^{2+}	ion calcium
Cit	citrulline (acide 2-amino-5-ureidopentanoïque)
CRH	corticotropin releasing hormone
D-Cit	D-citrulline
D-Cit(Et)	D-*N*^{oméga}-éthylcitrulline
D-Hci	D-homocitrulline
D-Hci(Et)	D-*N*^{oméga}-éthylhomocitrulline
D-Nal(2)	D-3-(2-naphthyl)-alanine
D-Phe(*p*CL)	D-4-chlorophénylalanine
E_2	oestradiol
EGF	epidermal growth factor
FSH	Follicle Stimulating Hormone
FSHRH	Follicle Stimulating Hormone Releasing Hormone
GH	growth hormone
GHRH	growth hormone releasing hormone
Glu	glutamine
Gly	glycine
GnRH	gonadotrophine releasing hormone
h	heure

hCG	human chorionic gonadotropine
Hist	histidine
hMG	human menauposal gonadotropine
HRH	hormone releasing hormone
IGF	insulin growth factor
IP3	inositol triphosphate
KCl	chlorure de potassium
L	litre
L.A.	leuprolide acétate
Leu	leucine
LH	Luteinizing Hormone
LHRH	luteinizing hormone releasing hormone
LHRH-R	récepteur à la LHRH
ln	logarithme népérien
log	logarithme décimal
mg	milligramme
min	minute
mL	millilitre
mm	millimètre
mRNA	cf ARNm
N.V.M.	noyau ventral médian
ng	nanogramme
nM	nanomole
pg	picogramme
Phe	phénylalanine
pLH	porcine Luteinizing Hormone
pmol	picomole
PRL	prolactine
Pro	proline
®	Registered = nom déposé
RT/PCR	reverse transcriptase poly cyclic recombinaison
Ser	sérine
STI	Short Term Implant = implant de courte durée
TRH	TSH-releasing hormone

Trp	tryptophane
TSH	thyreo stimulating hormone
Tyr	tyrosine
U/L	unité par litre
UI	unité internationale

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Structure moléculaire de la GnRH des mammifères, poule, saumon, lamproie (Brugère, 1998). 33

Figure 2 : Séquence en acides aminés de la GnRH et sa formule semi développée (Brugère, 1998). 34

Figure 3 : Les noyaux hypothalamiques régulant la sécrétion de la GnRH (Brugère, 1998). 36

Figure 4 : Neurones et médiateurs hypothalamiques modulant la libération de GnRH par l'hypothalamus (Brugère, 1998). 38

Figure 5 : Structure du récepteur humain à la GnRH avec ses différents sites de mutation identifiés (Kottler et al., 1999). 41

Figure 6 : Concentration en LH d'extraits d'antéhypophyses bovines soumises à une stimulation continue de 4ng/ml de GnRH en fonction du temps (Zolman, 1985a). On observe une augmentation par paliers successifs de la concentration en LH de l'hypophyse en réponse à une administration de GnRH. 43

Figure 7 : Liaison de GnRH marquée à l'iode aux récepteurs en fonction du temps (Zolman, 1985a). 44

Figure 8 : Représentation schématique des changements de structure du récepteur à la GnRH. Seule l'agrégation initiale a été démontrée expérimentalement, les réarrangements suivants sont hypothétiques. Function = niveau de stimulation de la cellule par la GnRH (Zolman, 1985a). 44

Figure 9 : Modèle dynamique du fonctionnement du récepteur à la GnRH (Zolman, 1985a). 45

Figure 10 : Modèle proposé des déplacements intracellulaires des récepteurs à la GnRH (Hazum et Conn, 1988). 46

Figure 11 : Effet de la dose de GnRH sur la variation biphasique de la concentration intracellulaire en calcium et sur la libération de LH (Stojilkovic et al., 1992) 49

Figure 12 : Représentation schématique de la transduction du signal par les récepteurs à la GnRH (Clayton, 1989). 50

Figure 13 : Relation entre l'activité électrique de l'hypothalamus (courbe du bas) et la concentration plasmatique de LH (courbe du haut en mg/mL) chez le macaque rhésus femelle ovariectomisée (Plant, 1986). 54

Figure 14 : Relation entre la libération de LH-RH (GnRH) par l'hypothalamus et la concentration plasmatique de LH chez une brebis ovariectomisée (Levine et al., 1982). 55

Figure 15 : Suppression des concentrations plasmatiques de LH et de FSH après perfusion continue de GnRH (1 µg /min à partir du jour 0) chez des singes rhésus femelles ovariectomisées d'après Knobil (1980). 55

Figure 16 : Effets sur la concentration intracellulaire en calcium de stimulations par 4 nM de CRH, GnRH, GHRH ou par 100 nM de TRH sur quatre types (A,B,C,D) de cellules hypophysaires.(Villalobos et al., 1997). 57

Figure 17 : Pourcentage de cellules hypophysaires de chaque type répondant aux différents facteurs hypothalamiques de stimulation (Villalobos et al., 1997). 58

Figure 18 : Effet de la stimulation électrochimique de l'éminence médiane de l'hypothalamus combinée avec un traitement antagoniste de la GnRH sur la concentration sérique en LH (A) et FSH (B) sur des rates ovariectomisées 60 min avant et 10 puis 60 min après stimulation. Les barres pleines représentent les témoins ne recevant que le solvant de l'antagoniste. Les barres hachurées représentent les animaux traités. Les barres creuses représentent le témoin électrode inactive. *P<0,05; **P<0,01 par rapport au témoin électrode inactive. +P<0,05; ++P<0,01 par rapport au témoin solvant (Koppan et al., 1998). 60

Figure 19 : Régulation endocrinienne de la fonction sexuelle mâle (Brugère, 1998). 61

Figure 20 : Régulation endocrinienne de la fonction sexuelle femelle pendant les phase de maturation folliculaire et d'ovulation (Brugère, 1998). 63

Figure 21 : Relations multiples entre l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire et l'environnement hormonal et sensoriel (NVM : noyau ventro médian)(Brugère, 1998). 64

Figure 22 : Le GnRH natif et les sites fonctionnels de la molécule (Lecomte, 1984). 71

Figure 23 : Courbes comparées de libération de LH et de FSH chez des rats mâles immatures après stimulation par la LH-RH, la D-Ala6-LH-RH et la Des-Gly-10-D-Ala6-LH-RH EA (LH-RH éthylamide) (Arimura et al., 1974). 75

Figure 24 : Désensibilisation des cellules gonadotropes par un traitement continu à doses croissantes d'agonistes de la GnRH chez les rats mâles castrés. Après 6 jours de traitement, les hypophyses sont récupérées pour analyse de (a) la quantité de récepteurs à la GnRH, (b) LH sérique, (c) quantité de LH contenue dans l'hypophyse (Clayton, 1989). 81

Figure 25 : Mesure des taux d'ARNm des sous unités de la LH dans les hypophyses de rats mâles castrés et non castrés après 28 jours de traitement avec un agoniste de la GnRH (Clayton, 1989). 82

Figure 26 : Taux de LH, FSH et E2 obtenus dans 3 sous groupes (n=4) pendant les 48 premières heures post injection de Decapeptyl CR® chez la femme (Broekmans et al., 1993). 84

Figure 27 : a. Amplitude des pulses de LH. b. Fréquence des pulse de LH. Avant et pendant les 48 premières heures suivant l'injection de Decapeptyl CR®. En barres pleines l'analyse des pulses selon la méthode de Scheele et Lambalk, en barres creuses selon Merriam et Watcher (Broekmans et al., 1993). 85

Figure 28 : Réponse en sécrétion de LH (barres pleines) et FSH (barres creuses) à la stimulation par 100µg de GnRH par voie intraveineuse avant et de la semaine 4 à la semaine 9 après injection de Decapeptyl CR® (Broekmans et al., 1993). 86

Figure 29 : Effets de l'administration chronique de Cetrorelix® chez des rattes non ovariectomisées pendant un traitment de 10 jours avec un dépôt de pamoate de Cetrorelix délivrant 100 µg d'antagoniste par jour, sur le taux d'ARNm des récepteurs à la GnRH (A) et sur la concentration sérique en LH (B). **p<0.01 vs contrôle (Kovacs et al., 2001). 88

Figure 30 : Concentrations sériques en LH (A), FSH (B) et testostérone (C) chez des rats après une injection intramusculaire de 20 mg de microcapsules de SB-75, un antagoniste de la GnRH. * P<0.005 ; ** P<0.001 vs témoins (control) (Pinski et al., 1993). 89

Rapport-Gratuit.com

utilisant le Cetrorelix® (Olivennes et al., 1994). 103

Figure 38 : Taux d'œstradiol après la première injection de D-Trp-6-LH-RH en microcapsules en fonction du temps en jours. L'aire grisée indique la plage de variation des valeurs des patientes 1 à 7. La courbe 1 représente la moyenne des valeurs. La courbe 2 représente les valeurs de la patiente 8 (Zorn et al., 1986).

109

Figure 39 : Pourcentage de la taille initiale de la prostate en fonction du temps chez des patients atteints d'hypertrophie bénigne de la prostate et traités pendant 6 mois avec un agoniste de la GnRH (acétate de nafaréline) (Peters et al., 1987).

111

Figure 40 : Diminution du volume prostatique mesuré par échographie chez 11 patients atteints d'hypertrophie bénigne de la prostate après administration de 500 µg d'antagoniste SB-75 toutes les 12h pendant 4 semaines (Gonzalez-Barcena et al., 1994).

111

Figure 41 : Pourcentage de suppression des taux de phosphatases acide (en hachuré) et alcaline (en grisé) chez des patients atteints de carcinomes prostatiques de stades C et D pendant un traitement avec un analogue de la GnRH. Les chiffres à l'intérieur des colonnes sont les nombres de patients testés (Tolis et al., 1982).

113

Figure 42 : Volume des leiomyomes utérins mesurés par échographie, exprimés en pourcentage de leur volume initial. (//) dernière injection de Decapeptyl®. Les cercles pleins indiquent le volume durant le traitement, les astérisques après arrêt du traitement (George et al., 1989).

114

Figure 43 : Effet protecteur de l'acétate de leuprolide (agoniste de la GnRH) sur l'action cancérigène du DMBA sur des souris en phase d'initiation et de

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

sur l'action cancérigène du DMBA sur des souris en phase d'initiation et de promotion tumorale (DMBA = 7,12-diméthylbenz(a)anthracène)(Inada et al., 1996).

117

Figure 44 : Volume de tumeurs OV 1063 (cancer épithélial de l'ovaire humain) transplantées sur des souris Nude traitées avec l'antagoniste SB 75 ou l'agoniste D-Trp-6-LHRH en microcapsules injectables. *p<0,05 (Yano et al., 1994).

119

Figure 45 : Concentrations sériques moyennes en testostérone et météréline (agoniste GnRH) chez le chien après implantation de bâtonnets dosés à 7mg (Hudon et al., 1997).

127

Figure 46 : Concentrations sériques moyennes en testostérone et météréline (agoniste de la GnRH) chez le chien après implantation de bâtonnets dosés à 10mg (Hudon et al., 1997).

127

Figure 47 : Absorption in vivo de leuprolide après une administration sublinguale chez le chien (0,45 mg/kg), le singe (0,45 mg/kg), l'homme (1,125 ; 2,25 et 4,5 mg) (Qiu et al., 1999).

129

Figure 48 : Relation entre la concentration en Cetrorelix® (ronds vides) et en testostérone (ronds pleins) suite à une injection intraveineuse ou sous cutanée de 0,1 mg/kg de Cétrorelix® (Schwahn et al., 2000b)

131

Figure 49 : Concentrations plasmatiques moyennes en testostérone en ng/mL chez des Beagles mâles adultes 2 à 4h après les injections quotidiennes de 10 µg/kg de D-Nal(2)6-LHRH (Vickery et al., 1983).

133

Figure 50 : Réversibilité de l'effet de 13 injections quotidiennes de 10 µg/kg de D-Nal(2)6-LHRH sur le taux de testostérone plasmatique, le volume de l'éjaculât, le nombre total des spermatozoïdes éjaculés, la motilité des

spermatozoïdes chez des chiens Beagle, mâles, adultes (ronds vides). Le groupe témoin recevant l'excipient (ronds pleins) (Vickery et al., 1983)

134

Figure 51 : Volume de l'éjaculât, nombre total de spermatozoïdes éjaculés, pourcentages de spermatozoïdes vivants et anormaux chez des chiens mâles adultes après une injection sous cutanée de microcapsules d'acétate de leuprolide à la dose de 0,1 mg/kg (triangles), 1 mg/kg (ronds peins) ; témoins (ronds vides). *p<0,01.(Inaba et al., 1996).

136

Figure 52 : Concentration en LH et testostérone chez des chiens mâles adultes après une injection sous cutanée de microcapsules d'acétate de leuprolide à la dose de 0,1 mg/kg (triangles), 1 mg/kg (ronds pleins) ; témoins (ronds vides).*p<0,01.(Inaba et al., 1996)

137

Figure 53 : Poids de la prostate de chiens mâles adultes recevant des injections sous cutanées quotidiennes pendant 44 jours de 0,5 µg/kg ; 2.0 µg/kg d'acétate de nafaréline. *p<0.05 (Vickery et al., 1985a).

139

Figure 54 : Concentration plasmatique en progestérone et dates d'apparition de saignements vaginaux et cornification vaginale pendant et après le traitement continu de chiennes Beagles cyclées adultes aux doses de (a) 2 µg/j d'acétate de nafaréline, (b) 8 µg/j, (c) 32µg/j. (d) témoin excipient (McRae et al., 1985).

141

Figure 55 : Concentrations plasmatiques en œstradiol (ronds pleins) et progestérone (ronds vides) chez des chiennes Beagles matures après une

progestérone (ronds vides) chez des chiennes Beagles matures après une injection sous cutanée d'acétate de leuprolide en microcapsules (100 µg/kg). Toutes les chiennes ont été traitées par une injection intramusculaire de fertiréline (3 µg/kg) au premier jour de l'œstrus induit. Valeurs +/- écart type (Inaba et al., 1998).

147

Figure 56 : Concentrations plasmatiques en œstradiol (ronds pleins) et progestérone (ronds vides) chez des chiennes Beagles prépubères après une injection sous cutanée d'acétate de leuprolide en microcapsules (100 µg/kg). Toutes les chiennes ont été traitées par une injection intramusculaire de fertirélin (3 µg/kg) au premier jour de l'oestrus induit. Valeurs +/- écart type (Inaba et al., 1998).

148

Figure 57 : Effets de la goséréline sur les animaux traités (T) et non traités (NT) 360 et 540 jours après le début du traitement sur la mortalité (Deaths), les métastases dans les nœuds lymphatiques locaux (Diffusion) et dans d'autres organes (Metastases). Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'incidence *p<0.05 ; **p<0.001 (Lombardi et al.,1999).

153

Figure 58 : Concentration tissulaire en récepteurs à la GnRH chez le rat, le bovin, l'ovin et le porcin, mise en évidence par la liaison de GnRH marquée (Brown et al., 1983).

158

Figure 59 : Concentration plasmatique moyenne en LH chez le groupe contrôle (ronds creux) et chez les génisses traitées par un implant (minipump) délivrant 2,5 µg/h de busséréline (ronds pleins). Le premier implant est laissé en place 28 jours, et est remplacé par un second retiré après 20 jours. Les flèches indiquent les manifestations de chaleurs chez le

lot témoin (Gong et al., 1996)

159

Figure 60 : Concentration plasmatique moyenne en FSH chez le groupe contrôle (ronds creux) et chez les génisses traitées par un implant (minipump) délivrant 2,5 µg/h de busséréline (ronds pleins). Le premier implant est laissé en place 28 jours, et est remplacé par un second retiré après 20 jours. Les flèches indiquent les manifestations de chaleurs chez le lot témoin (Gong et al., 1996)

160

Figure 61 : Résumé schématique de la dynamique folliculaire chez les génisses traitées par 2 implants délivrant 2,5 µg/h de busséréline. Le premier implant est laissé en place 28 jours, et est remplacé par un second retiré après 20 jours. Résultats obtenus par examen échographique quotidien des ovaires. (PG = prostaglandine) (Gong et al., 1996).

162

Figure 62 : Croissance et régression de la seconde vague de croissance folliculaire (A) chez les animaux traités avec de la busséréline (8 µg) ou de la desloréline (implants dosés à 700 et 2100 µg). Le traitement est administré au jour 5. Croissance de la troisième vague folliculaire chez ces mêmes animaux (B) (Rajamahendran et al., 1998).

163

Figure 63 : Effets de différentes doses d'un antagoniste de la GnRH, injecté par voie intraveineuse à des génisses Prim'Holstein 48 et 60 h après une injection de cloprosténol, sur la date de l'œstrus, les pics de concentration en œstradiol, en LH et FSH et sur la date de l'ovulation. *p<0,05 comparé au groupe témoin (Rieger et al., 1989).

165

Figure 64 : Effets de différentes doses d'un antagoniste de la GnRH, injecté par voie intraveineuse à des génisses Prim'Holstein 48 et 60 h après une injection de cloprosténol : sur les intervalles entre la 1ère injection d'antagoniste et le pic de concentration en œstradiol, le pic de concentration en œstradiol et le pic de LH, le pic de LH et l'ovulation. *p<0,05 comparé avec le groupe témoin (Rieger et al., 1989).

165

Figure 65 : Concentration plasmatique moyenne en progestérone chez le groupe témoin (ronds creux) et chez les génisses traitées par des implants (minipump) délivrant 2,5 µg/h de busséréline (ronds pleins). Le premier implant est laissé en place 28 jours, il est remplacé par un second retiré après 20 jours (Gong et al., 1996).

168

Figure 66 : Concentrations plasmatiques en LH et FSH dans le groupe témoin (ronds creux) et dans le groupe de bouvillons traité avec un implant de desloréline (Aspden et al., 1996).

170

Figure 67 : Concentration pituitaire en ARNm des sous unités béta et alpha de LH et FSH chez les bouvillons traités par un implant de desloréline par rapport au lot témoin (Aspden et al., 1996).

170

Figure 68 : Concentrations plasmatiques en LH dans le groupe témoin (ronds creux) et dans le groupe de taurillons traité avec un implants de desloréline (Bergfeld et al., 1996a).

172

Figure 69 : Concentrations plasmatiques en testostérone chez des taureaux témoins (ronds pleins) et chez des taureaux traités par un implant de desloréline (ronds vides). Résultats en moyenne +/- SEM (n=5) (D'Occhio et al., 1996a).

173

Figure 70 : Traitement de superovulation chez la chèvre utilisant une insémination à heure fixe et un antagoniste de la GnRH (Antarelix®)(Baril et al., 1996). 175

Figure 71 : Protocole de superovulation utilisant un implant d'un agoniste de la GnRH chez la génisse (implant auriculaire de desloréline). Stimulation folliculaire par deux injections intramusculaires quotidiennes de FSH aux doses de 40 mg à J0, 30 mg à J1, 20 mg à J2, 10 mg à J3 (D'Occhio et al., 1997). 179

Figure 72 : Intervalles entre l'injection d'un implant d'un agoniste de la GnRH (desloréline STI = Short Term Implant) et l'ovulation chez des jument traitées et témoins (Placebo implants) ($p<0,02$ pour toutes les valeurs) (Jöchle et Trigg, 1994). 189

INDEX DES TABLEAUX

Tableau I : Récapitulatif des auteurs ayant mis en évidence la GnRH dans les différents ordres et classes de mammifères (Pelletier, 1971). 35

Tableau II : Principaux agonistes du GnRH (Perrin et al., 1980 ; Hsueh et al., 1983). 73

Tableau III : Séquence en acide aminés, potentiel d'activité biologique et temps de demi vie des principaux agonistes de la GnRH utilisés en médecine humaine (Chien, 1992). 74

Tableau IV : Activité antiovulatoire des analogues du GnRH [Ac-R1, D-Phe(*p*Cl)2, D-Trp3, R6, D-Ala10] chez le rat (R : résidu) (Bajusz et al., 1988). 77

Tableau V : Activité anaphylactique d'antagonistes de la GnRH [Ac-R1, D-Phe(*p*Cl)2, D-Trp3, R6, D-Ala10]LHRH et d'un de ses analogues Arg5 (Bajusz et al. 1988). 78

Tableau VI : Poids corporel, poids des testicules, de la prostate ventrale et des vésicules séminales chez des rats témoins et chez des rats traités avec l'antagoniste de la GnRH SB-75 sous forme encapsulée ou non, évalués 30 et 140 jours après injection (Pinski et al., 1992). 94

Tableau VII : Résultats de fécondation in vitro et de transferts embryonnaires d'un protocole utilisant un antagoniste et d'un autre utilisant un agoniste de la GnRH (Olivennes et al., 1994). 104

Tableau VIII : Durée moyenne de l'intervention chirurgicale, pertes sanguines per opératoires, besoin de sang pour transfusion et durée d'hospitalisation avec ou sans administration préalable d'un agoniste de la GnRH (Golan et al. 1993). 115

Tableau IX : Taux de pénétration des spermatozoïdes des éjaculâts des chiens après une injection sous cutanée de microcapsules d'acétate de leuprolide à la dose de 1 mg/kg (Inaba et al., 1996). 137

Tableau X : Comparaison des durées des différentes phases du cycle de reproduction en cas d'œstrus induits ou spontanés chez des chiennes Beagles matures. Induction de l'œstrus par une injection sous cutanée d'acétate de leuprolide à la dose de 100 µg/kg et stimulation de l'ovulation par une injection de fertiréline (3 µg/kg) au premier jour des chaleurs observées (Inaba et al., 1998). 145

Tableau XI : Comparaison des durées d'œstrus induits ou spontanés chez des chiennes Beagles prépubères. Induction de l'œstrus par une injection sous cutanée d'acétate de leuprolide à la dose de 100 µg/kg et stimulation de l'ovulation par une injection de fertiréline (3 µg/kg) au premier jour des chaleurs observées (Inaba et al., 1998). 146

Tableau XII : Concentration en récepteurs aux œstrogènes (ER) et à la progestérone (PR) (fentomoles/mg de protéine) avant le début du traitement et taille de la tumeur (diamètre moyen en cm) 30, 180, 360 et 540 jours après le début du traitement avec de la goséréline (60 µg/kg en injections sous cutanées tous les 21 jours pendant 12 mois) (Lombardi et al., 1999). 152

Tableau XIII : Développement d'ovocytes *in vivo* 8 jours après l'injection sous cutanée (SC) de 0,5 mg d'AntarelixND réalisée aux début de l'œstrus sur des brebis. Différence entre a et b significative à p<0,0001 (Oussaid et al., 1999). 167

Tableau XIV : Nombre d'embryons collectés et nombre de noyaux par embryon par stade de développement embryonnaire sur des embryons collectés après traitement de superovulation de routine ou

Rapport-Gratuit.com

incluant un antagoniste de la GnRH (AntarelixND) chez la chèvre (Baril et al., 1996). 176

Tableau XV : Nombre et caractéristiques des embryons et états des ovaires suite à deux types de protocole de superovulation chez la génisse. Protocole du groupe A, classique (implant de progestagène, stimulations à la FSH et insémination sur chaleurs observées), protocole du groupe B utilisant en plus un implant de desloréline (agoniste de la GnRH), une injection de LH pour déclencher l'ovulation et trois inséminations à heure fixe (D'Occhio et al., 1997). 178

Tableau XVI : Proportion cumulée de génisses ayant ovulé après un traitement avec de la FSH de J0 à J3, une injection de prostaglandine à J2 (7h) et retrait de l'implant de norgestomet à J2 (6h) pour le groupe témoin. Les génisses du groupe traité ont un implant de desloréline depuis J-7, un traitement FSH et prostaglandine identique mais une injection de LH à J4 (4h) (D'Occhio et al., 1998). 180

Tableau XVII : Ovulations simples ou doubles et gestations confirmées 28 jours après insémination chez des vaches en lactation à 2,25 de note d'état avec un traitement soit cystoréline-cystoréline, soit cystoréline-implant de desloréline et insémination 16h après la dernière injection (Ambrose et al., 1998). 182

Tableau XVIII : Nombre de jours post partum jusqu'au premier œstrus et jusqu'à l'insémination fécondante chez des vaches allaitantes Angus traitées au 5ème jour post partum avec un agoniste de la GnRH en microcapsules (Roberge et al., 1992). 184

Tableau XIX : Paramètres de reproduction de génisses observées après un traitement de 12 mois par des implants sous cutanés de desloréline. Génisse de 26 mois d'âge au début du traitement et en élevage extensif en présence de taureaux pendant toute la durée du

traitement (D'Occhio et al., 2000). 186

Tableau XX : Concentrations plasmatiques moyennes en testostérone, delta-4 androstènedione et poids des testicules chez des porcelets : mâles castrés, non castrés, non castrés et traités avec un implants d'agonistes de la GnRH. Ces résultats ont été obtenus après abattage des animaux, après 116 jours de traitement pour les animaux traités (Reid et al., 1996).

193

Tableau XXI : Pourcentage de viande dans la carcasse et épaisseur de gras dorsal chez des porcs mâles : castrés, non castrés, non castrés et traités avec un implant d'un agoniste de la GnRH (Reid et al., 1996). 193

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

INTRODUCTION

La possibilité de comprendre les mécanismes régulateurs de la fonction de reproduction a permis un ensemble de progrès en médecine humaine et vétérinaire. Au sommet de l'organigramme de régulation de la fonction de reproduction se place l'axe hypothalamo-hypophysaire et la gonadolibérine, GnRH (Gonadotropine Releasing Hormone), responsable de la libération des gonadotrophines hypophysaires, LH (Luteinizing Hormone) et FSH (Follicle Stimulating Hormone). Ces deux gonadotrophines modulent l'activité des organes sexuels et la production par ceux-ci des hormones stéroïdes sexuelles chez le mâle comme chez la femelle. Les interventions de stimulations de l'hypophyse par la GnRH permettent, par l'intermédiaire des gonadotrophines et des stéroïdes sexuels, une modification de l'ensemble des régulations de la fonction de reproduction chez l'homme et l'animal. Les buts recherchés dans les modifications de cette fonction de reproduction sont d'une part de stimuler celle-ci afin d'accroître des paramètres de fertilité et de stimuler le déroulement des cycles reproducteurs et d'autre part d'inhiber cette fonction afin de limiter la stimulation du fonctionnement des organes reproducteurs à des fins thérapeutiques ou de maîtrise des cycles de reproduction. Pour ces interventions, la GnRH naturelle, décapeptide de faible demi-vie, principalement présente dans le système porte hypophysaire, a été avantageusement remplacée par des analogues de synthèse au catabolisme retardé et aux affinités accrues pour les récepteurs hypophysaires à la GnRH. Ces analogues sont d'une part des agonistes stimulant la libération des gonadotrophines par l'hypophyse et d'autre part, des antagonistes inhibant cette sécrétion. Mais l'administration chronique des agonistes de la GnRH montre un effet inhibiteur paradoxal par désensibilisation de l'hypophyse qui aboutit à un arrêt de la sécrétion des gonadotrophines chez différentes espèces. Suivant les modalités d'administration, agonistes et antagonistes peuvent donc assurer les mêmes rôles d'inhibition de la sécrétion des gonadotrophines et donc de la fonction de reproduction chez différentes espèces.

L'objet de cette étude bibliographique est de réaliser un bilan des connaissances concernant les analogues de la GnRH : agonistes en administration chronique et antagonistes chez différentes espèces animales. Une première partie traite des aspects fondamentaux des analogues de la GnRH. La place de la GnRH naturelle

dans la physiologie de la fonction de reproduction, les objectifs de synthèse des analogues de la GnRH et leur comportement avec leurs récepteurs aboutissant au phénomène de désensibilisation de l'hypophyse y sont abordés. Une seconde partie traite des utilisations actuelles et envisagées de ces analogues en administration chronique en médecine humaine et vétérinaire dans des indications thérapeutiques et de maîtrise de la reproduction. En médecine vétérinaire, les carnivores domestiques, les ruminants, les équidés et les porcins sont détaillés dans les particularités de leurs réponses expérimentales face aux administrations chroniques des analogues de la GnRH et dans les utilisations envisagées de protocoles de traitement intégrant ces analogues.

PREMIERE PARTIE

ASPECTS FONDAMENTAUX CONCERNANT LES ANALOGUES DE LA GnRH

I.Rappel du rôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire dans la régulation des fonctions de reproduction.

Dans cette première partie, nous rappellerons les interactions hormonales des fonctions de reproduction toutes espèces confondues. Le but est de dégager les grandes similitudes de fonctionnement. Les différences de physiologie et de pharmacologie entre les espèces étudiées seront abordées plus précisément dans la deuxième partie de cette thèse.

A.La GnRH naturelle dans le système hypothalamo-hypophysaire.

1.Nature biochimique de la GnRH et sa synthèse par l'organisme

L'identification du facteur hypothalamique stimulant la sécrétion de FSH et de LH par l'hypophyse a été menée par deux équipes scientifiques différentes, d'une part celle de Schally (USA) d'autre part par celle de Guillemin (France) en 1971. Ils mirent en évidence un décapeptide de faible poids moléculaire, peu antigénique, commun à différentes espèces, de demi-vie courte : environ quatre minutes. Sa synthèse était plus aisée que celle des gonadotrophines (figure 2). Cette molécule a été identifiée dans tout le règne animal (Pelletier, 1971 ; tableau I).

La synthèse de la GnRH a lieu dans les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus médiobasal antérieur. La GnRH est libérée au niveau de l'imminence médiane par exocytose dans le système vasculaire porte qui lie cette partie de l'hypothalamus aux cellules hypophysaires. L'existence de ce système porte et la faible demi vie de la GnRH naturelle sont en liaison avec la pulsatilité de la libération

de la GnRH et la pulsatilité de la réponse hypophysaire par libération de la LH. Les applications qui en découlent seront abordées dans les paragraphes suivants. Les concentrations sanguines périphériques de la GnRH sont infimes par rapport à celle dans le système porte hypophysaire.

Ce décapeptide est synthétisé suivant un mode commun à d'autres médiateurs peptidiques. Il y a d'abord production d'une pro-hormone de poids moléculaire important, puis clivage enzymatique et maturation dans les granules de sécrétion avant exocytose.

Ce processus de base est commun à de nombreuses espèces du règne animal, mais à la différence de la TRH (Thyroide Releasing Hormone) qui possède une structure identique dans tout le règne animal, il existe différentes GnRH. La GnRH des mammifères est identique chez les bovins, ovins, porcins, primates, chien, homme (Beattie, 1982) ainsi que chez les amphibiens (King et Millar, 1980). La figure 1 montre les différences entre les GnRH des mammifères, des poissons et les deux types de GnRH découverts chez la poule.

Les premières recherches visant à isoler les facteurs de libération des gonadotrophines supposaient l'existence d'un facteur provoquant la sécrétion de LH (une LHRH) et d'un facteur provoquant la sécrétion de FSH (une FSHRH). La découverte de la GnRH comme unique facteur impliqué dans la libération de la LH et de la FSH a éliminé cette hypothèse. Mais de récents travaux que nous aborderons dans la suite évoquent l'existence de neurones sécréteurs de FSHRH de même que l'existence de plusieurs GnRH naturelles sécrétées par les organismes (Yu et al., 1997 ; White et al., 1998).

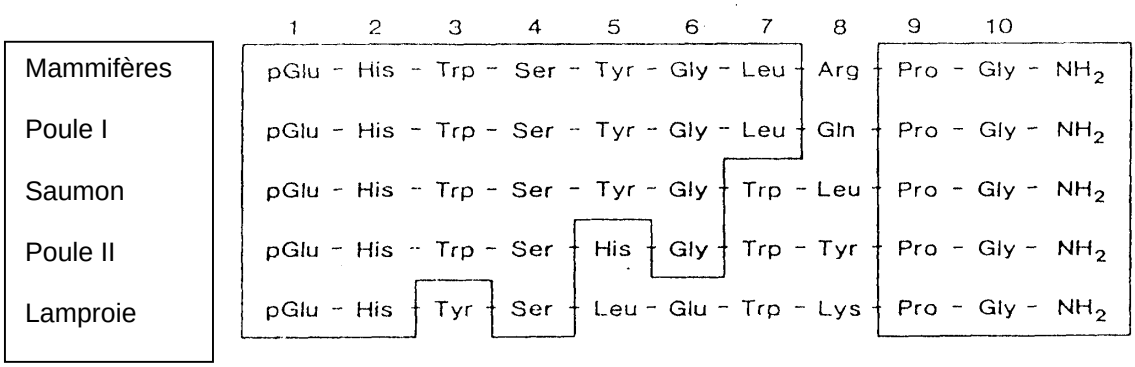


Figure 1 : Structure moléculaire de la GnRH des mammifères, poule, saumon, lamproie (Brugère, 1998).

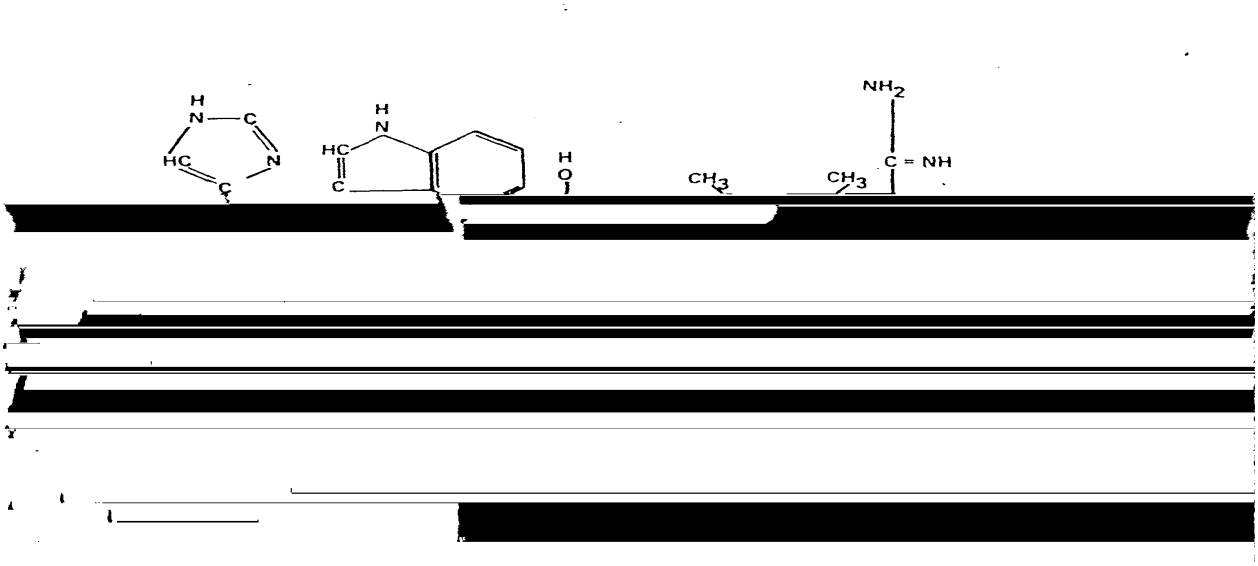


Figure 2 : Séquence en acides aminés de la GnRH et sa formule semi développée (Brugère, 1998).

Tableau I : Récapitulatif des auteurs ayant mis en évidence la GnRH dans les différents ordres et classes de mammifères (Pelletier, 1971).

Ordre	**Espèce**	**Auteurs**	**Année**
Carnivores	Chien	Yamashita	1966
Ongulés	Porc	Schally et al.	1965
	Mouton	Courrier et al. Campbell Pelletier et Ortavant	1962 1964 1968
	Bœuf	Schally et Bowers Ramirez et al.	1964
Lagomorphes	Lapin	Campbell	1964
Rongeurs	Rat	Mc Cann et al. Nikitovitch et Winner	1960 1962
	Cobaye	Barry et al. Cleftheion	1967
	Peromyscus		
Primates	Rhésus	Campbell	1964
	Homme	Schally et al.	1967

2. Mode de sécrétion de la GnRH

Les structures de l'hypothalamus qui contrôlent l'antéhypophyse sont dites « hypophysiotropes ». En ce qui concerne les fonctions gonadiques, elles agissent en régulant la sécrétion des organes gonadotropes. Leur influence peut être continue (tonique) ou circonstancielle, discontinue (phasique). Pour le contrôle tonique des hormones gonadotropes, l'activation exercée par les structures hypothalamiques concerne surtout la sécrétion de FSH et secondairement celle de LH. Il s'ensuit une stimulation de la sécrétion d'œstrogènes chez les organismes femelles. La zone de ce centre « tonique » est située dans la partie postérieure des noyaux ventro-médians et des noyaux prémamillaires, ainsi que dans les noyaux arqués.

Le contrôle phasique des hormones gonadotropes permet la décharge phasique de LH, et à un moindre degré de FSH. La région concernée est située dans la zone préoptique et suprachiasmatique. La figure 3 représente les relations anatomiques des différentes structures évoquées.

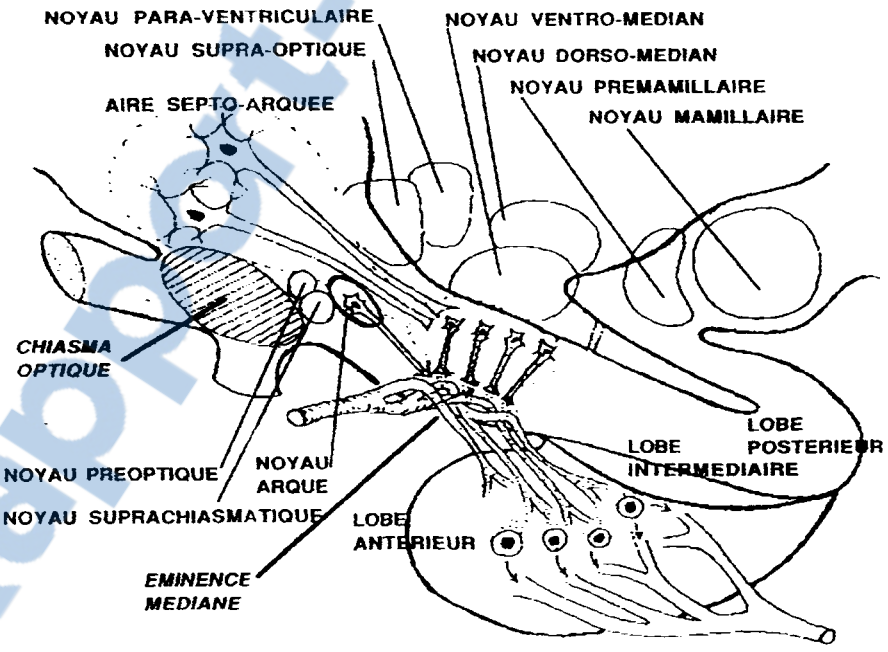


Figure 3 : Les noyaux hypothalamiques régulant la sécrétion de la GnRH (Brugère, 1998).

La pulsatilité de la sécrétion de GnRH a été mise en évidence dans de nombreuses espèces de mammifères. Voici un ordre de grandeur de la période entre chaque pic de sécrétion dans des espèces différentes :

Rapport-Gratuit.com

-50 min chez la ratte intacte (Levine et Ramirez, 1980)

-50 min chez la brebis (Caraty et al., 1982)

-120 min chez l'homme (Schaison, 1982).

Nunez et al. (1998) ont récemment démontré que la pulsatilité de la sécrétion se retrouve au niveau de la transcription même du gène codant pour la GnRH. Celle-ci suit en effet les mêmes variations que la sécrétion au niveau d'un neurone. C'est l'apparition de cette sécrétion pulsatile de GnRH qui semble être le facteur déclenchant du début de la puberté chez les mammifères (Forest et Levasseur, 1991). La régulation de la fréquence de la sécrétion pulsatile de GnRH est dictée par l'ensemble des connexions nerveuses qu'entretiennent les neurones de l'hypothalamus qui sécrètent la GnRH. Ce sont ces mêmes connections qui semblent intervenir dans le déclenchement de la puberté chez l'homme et l'animal. De nombreuses études expérimentales ont mis en évidence que ces neurones étaient en connexion via plusieurs neuromédiateurs avec de nombreuses afférences sensorielles de l'hypothalamus. La figure 4 est un récapitulatif simplifié de celles-ci.

L'association des nombreuses connections qu'a le système nerveux central avec les neurones hypothalamiques produisant la GnRH et la sécrétion pulsatile de cette hormone a abouti à différentes hypothèses tentant d'expliquer l'origine de la pulsatilité de la sécrétion. Le rythme de la sécrétion peut être expliqué : par la présence d'un pace-maker, dont la localisation et le fonctionnement ne sont pas encore précisés, et par la synchronisation des neurones libérant la GnRH. Différentes hypothèse existent, elles combinent l'existence d'une structure déterminant le rythme des sécrétions qui est soit externe, soit intégrée au sein de chaque neurone sécrétant et d'une synchronisation due soit aux relations entre les neurones, soit à un synchronisateur externe. Le résultat de cette organisation aboutirait à un profil de sécrétion de base qui serait modulé dans la fréquence et l'amplitude de ses pulses par l'intégration des stimulations internes et externes à l'organisme (Caldani et al., 1991).

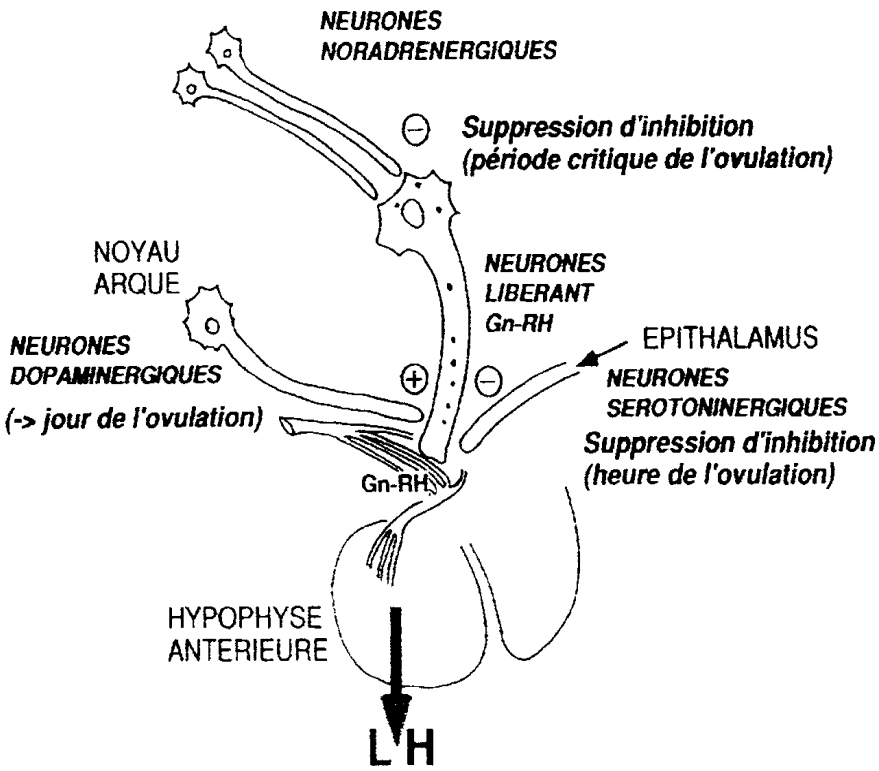


Figure 4 : Neurones et médiateurs hypothalamiques modulant la libération de GnRH par l'hypothalamus (Brugère, 1998).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

3. Catabolisme de la GnRH naturelle.

Le catabolisme de la GnRH a principalement lieu dans le système porte hypothalamo-hypophysaire (Handelsman et Swerdloff, 1986). La rapidité de ce catabolisme ainsi que l'absence de liaison à des protéines de transport de cette hormone explique le fait qu'elle ne soit présente qu'à des concentrations infimes dans la circulation générale. Plusieurs peptidases ont été isolées et sont responsables du clivage de la molécule et de sa perte d'activité. Une discussion persiste quant à l'importance relative de ses différentes protéases dans le catabolisme général. Voici la liste des principales enzymes décrites (Handelsman et Swerdloff, 1986 ; Karten et Rivier, 1986) :

-la pyroglutamate aminopeptidase, spécifique de la liaison PGlu1-His2.

-L'endopeptidase neutre qui attaque la liaison Tyr5-Gly6.

-L'enzyme de clivage de la liaison Pro9-Gly10.

Mais pour d'autres (Karten et Rivier, 1986) en plus de la liaison Tyr5-Gly6 la liaison Gly6-Leu7 est aussi clivée par les protéases, ainsi que pour les liaisons His2-Trp3, Trp3-Ser4 et Ser4-Tyr5.

Il semble quand même admis de façon générale que la glycine en position 6 du décapeptide soit un site majeur de dégradation et de perte d'activité de la molécule. L'existence de ce site de clivage particulier a été un des principaux guides dans la synthèse des analogues de la GnRH, dans le but d'accroître leur temps de demi-vie.

Après une injection intraveineuse de GnRH naturelle, la courbe d'élimination de la molécule est biphasique (différents modèles de pharmacocinétiques bi ou tricompartimentales ont été étudiés chez les rongeurs et le chien ; ils sont abordés dans la partie traitant spécifiquement du chien). Le temps de demi-vie est à peu près le même chez tous les mammifères : environ cinq minutes chez le rat, le singe, le chien, le mouton et l'homme (Barron et al., 1982 ; Ory, 1983 ; Redding et al., 1973 ; Schaison, 1982 ; Swift et Crighton, 1979).

La clairance métabolique de la molécule naturelle après injection intraveineuse est de 1500 mL/min (Barron et al., 1982 ; Ory, 1983). Celle-ci est d'une part due à la dégradation enzymatique et d'autre part à une élimination rénale (Handelsman et Swerdloff, 1986). Néanmoins la part des catabolites résultant de la

dégradation enzymatique dans l'urine est nettement supérieure à celle de la molécule entière. La dégradation enzymatique semble donc précéder l'élimination rénale de la molécule (Copeland et al., 1977). La dégradation hépatique apparaît secondaire.

La perte de l'activité de la molécule est donc surtout le fait de sa dégradation enzymatique, celle-ci étant modulée par la concentration plasmatique en œstrogènes : l'ovariectomie diminue de 50 % la vitesse de dégradation, tandis que l'administration d'œstrogènes à une femelle ovariectomisée ramène celle-ci à sa valeur initiale. Cette action des œstrogènes a été prouvée au niveau de l'hypothalamus mais non au niveau de l'hypophyse (Clayton et al., 1977).

4.Interaction de la GnRH avec les récepteurs hypophysaires.

Nous allons essayer d'aborder la complexité de la relation physiologique

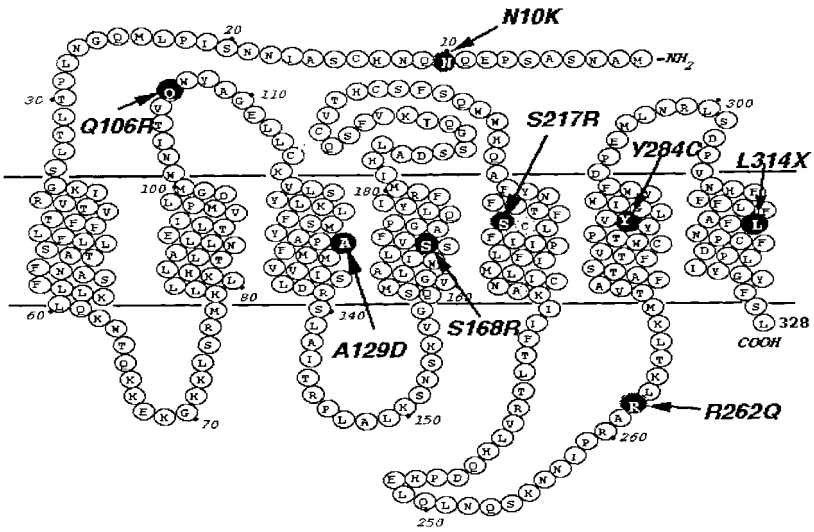


Figure 5 : Structure du récepteur humain à la GnRH avec ses différents sites de mutation identifiés (Kottler et al., 1999).

Ce récepteur est parfaitement adapté aux interactions avec la GnRH mais, en plus, il possède des facultés de dimérisation et de microagrégation qui lui confèrent des propriétés particulières. Zolman proposa en 1985 (a,b) un modèle visant à expliquer le comportement du récepteur à la GnRH. Ses expériences mirent en évidence une réponse triphasique de la sécrétion de LH en fonction de la dose de GnRH et de la durée pendant laquelle elle était maintenue (figure 6). Il apparaît en effet que l'interaction entre l'hormone et son récepteur est faible pour de faibles concentrations de GnRH, mais cette interaction s'accroît par paliers avec l'augmentation de la concentration en GnRH et le maintien de celle-ci. Il y a donc un phénomène d'amplification de la réponse à la stimulation par la GnRH puisque l'affinité des récepteurs encore libres est fonction du nombre de récepteurs déjà occupés (figure 7). Cette affinité augmente par paliers avec le nombre de récepteurs déjà occupés. L'existence de paliers est due à la formation d'agrégats de récepteurs de taille croissante mais de type limité, c'est-à-dire des assemblages d'un nombre fixe de récepteurs (figure 8). La figure 8 met en relation chaque type de liaison hormones-récepteur avec l'augmentation de la fonction de stimulation. D'une première agrégation instable on passe à un état transitoire ayant peu d'activité puis à un assemblage de type I d'activité supérieure et enfin un assemblage de type II d'activité encore supérieure.

Le modèle mis en place par Zolman permet aussi d'expliquer le phénomène

de désensibilisation par le temps que nécessite chaque agrégat de récepteurs pour se dissocier et par le fait qu'une faible concentration de GnRH suffit à les maintenir en place.

La figure 9 représente, par une succession de cycles, les types d'agrégation de récepteurs et leur phase de déstructuration (Assembly decay state). Pendant ces phases de déstructuration, les récepteurs ne sont pas disponibles pour une nouvelle stimulation : ces phases expliqueraient le phénomène de désensibilisation de l'hypophyse face à une administration continue de GnRH pendant un laps de temps suffisant. Il faut souligner qu'à l'état normal ce phénomène de microagrégations permet l'amplification de la réponse à une stimulation hormonale par augmentation de l'affinité des récepteurs par un phénomène d'auto-activation de voisinage. Mais la déstructuration de ces agrégats nécessite un certain temps, période réfractaire compatible avec le rythme des stimulations hypothalamiques. Nous reprendrons la perturbation de ce mécanisme physiologique dans les conséquences de l'utilisation des agonistes de la GnRH sur le long terme.

Suite à cette interaction hormone-récepteur et aux interactions entre les récepteurs, il y a internalisation des récepteurs et de leurs ligands dans des vésicules intracellulaires. C'est dans la cellule que s'effectue le découplage entre l'hormone et son récepteur et entre les récepteurs entre eux (figure 10). Il semble que la majeure partie des récepteurs exprimés à la surface des cellules gonadotropes soit issue d'un phénomène de recyclage et non pas d'une nouvelle synthèse. Ce phénomène de recyclage nécessite un certain temps (Hazum et Conn, 1988 ; Cornea et al., 1999).

D'autres auteurs ajoutent à ce phénomène l’internalisation des récepteurs comme phénomène de désensibilisation de la cellule à la stimulation. Mais il apparaît que ce recyclage des récepteurs ne peut pas à lui seul expliquer la désensibilisation qui peut être présente alors qu'une quantité importance de récepteurs est effectivement à la surface de la cellule. Il semblerait donc que la désensibilisation s'explique par une combinaison de l'agrégation, de l’internalisation et de la saturation des seconds messagers intracellulaires que nous aborderons dans la suite.

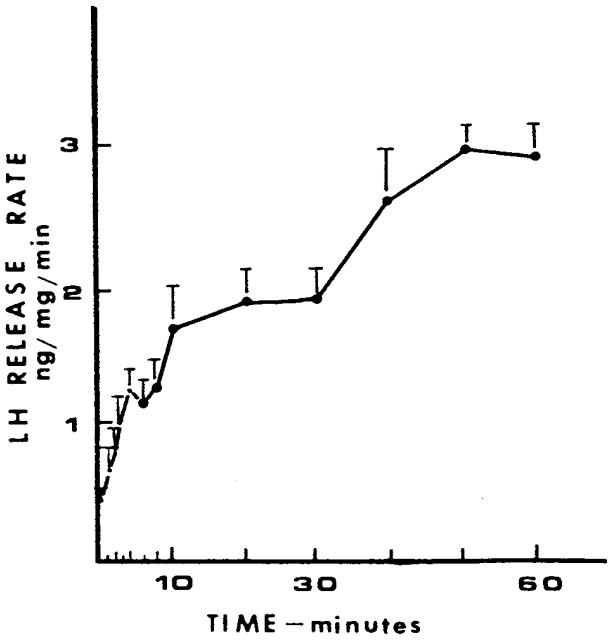


Figure 6 : Concentration en LH d'extraits d'antéhypophyses bovines soumises à une stimulation continue de 4 ng/ml de GnRH en fonction du temps (Zolman, 1985a). On observe une augmentation par paliers successifs de la concentration en LH de l'hypophyse en réponse à une administration de GnRH.

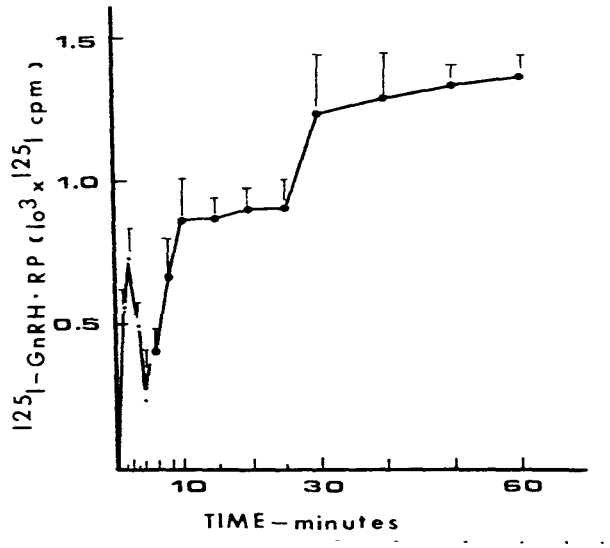


Figure 7 : Liaison de GnRH marquée à l'iode aux récepteurs en fonction du temps (Zolman, 1985a).

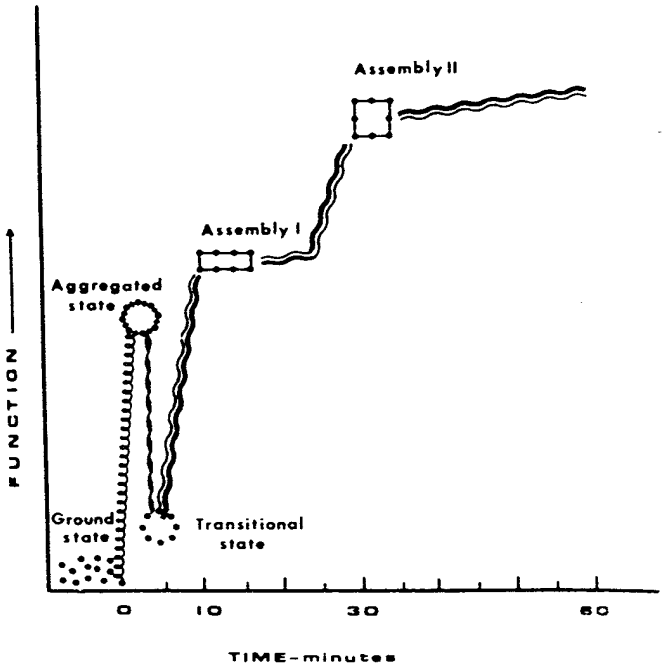


Figure 8 : Représentation schématique des changements de structure du récepteur à la GnRH. Seule l'agrégation initiale a été démontrée expérimentalement, les réarrangements suivants sont hypothétiques. Function = niveau de stimulation de la cellule par la GnRH (Zolman, 1985a).

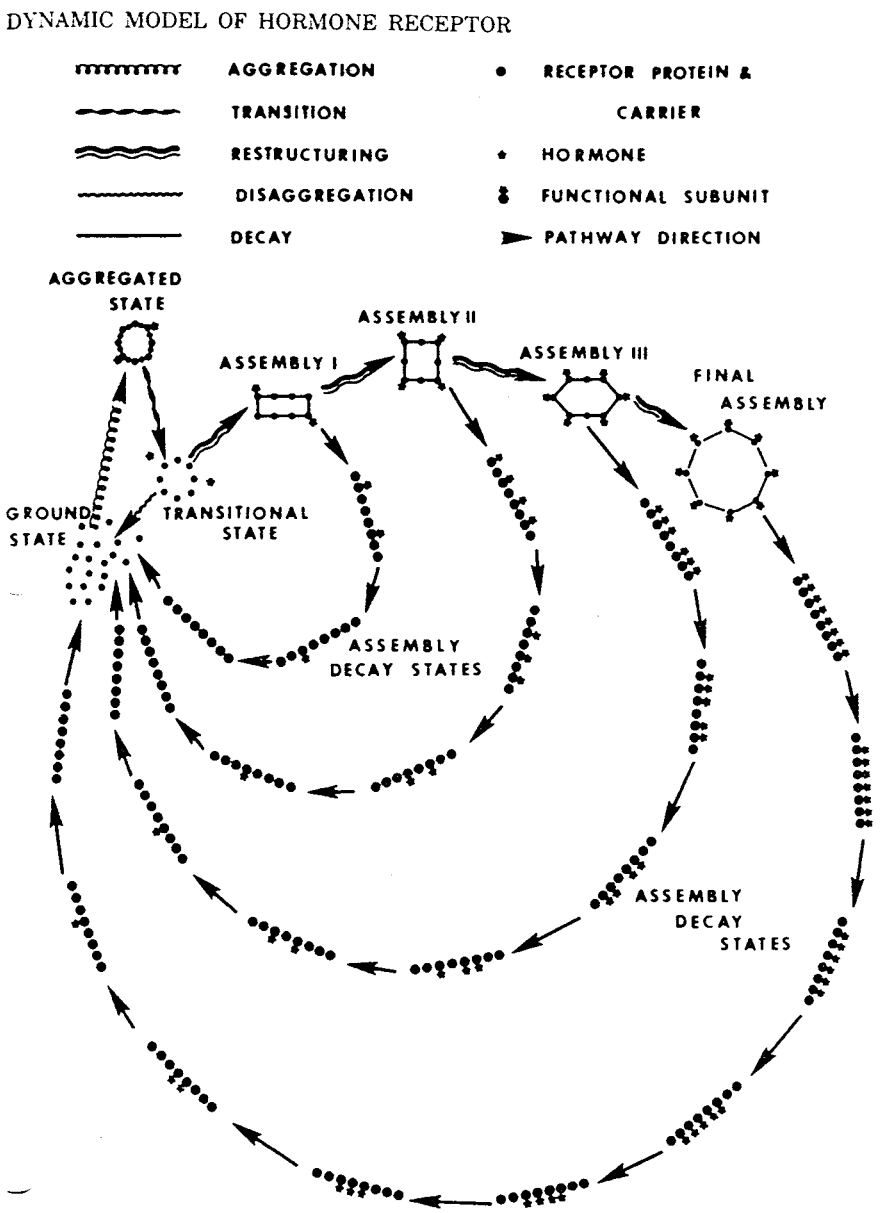


Figure 9 : Modèle dynamique du fonctionnement du récepteur à la GnRH (Zolman, 1985a).

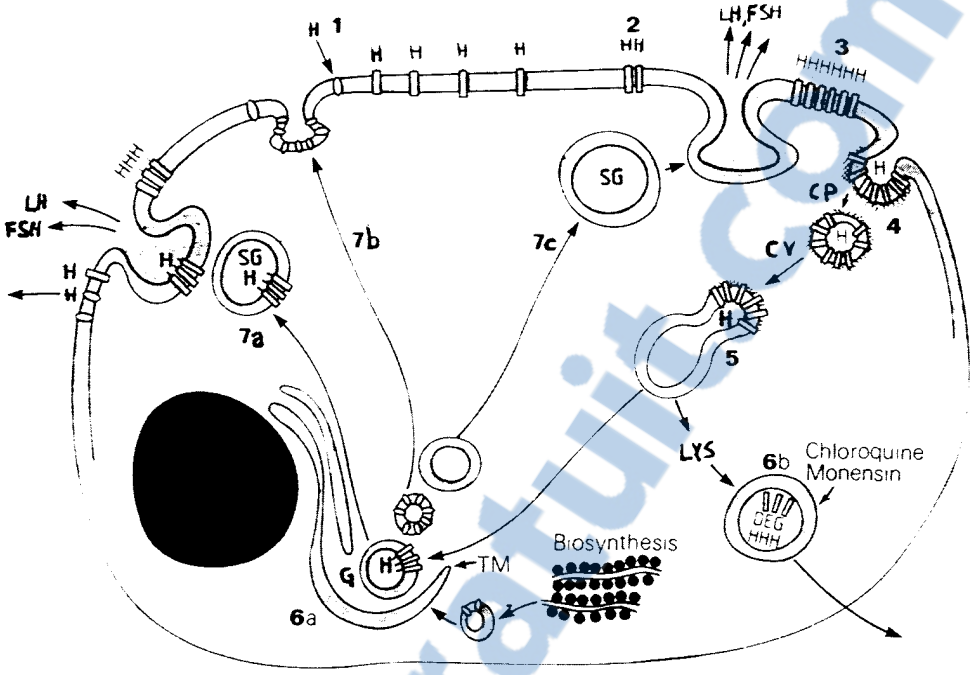


Figure 10 : Modèle proposé des déplacements intracellulaires des récepteurs à la GnRH (Hazum et Conn, 1988).

1. Liaison de la GnRH (H) à ces récepteurs spécifiques à la surface de la cellule gonadotrope.
2. Dimérisation des récepteurs adjacents
3. Microagrégation
4. Internalisation des récepteurs par des puits recouverts et des vésicules recouvertes (CP et CV).
5. Transfert des complexes hormone-récepteurs dans des endosomes
6. 6a. Insertion de ces complexes dans des granules de sécrétion de l'appareil de Golgi.
   6b Quelques récepteurs sont détruits dans des lysosomes, cette voie est inhibée par la chloroquine et le monensin.
7. 7a. Recyclage des récepteurs par les granules de sécrétions (SG).
   7b. Granules de sécrétion contenant des récepteurs synthétisés.
   7c. Granules de sécrétion contenant de la LH et de la FSH.

La biosynthèse des récepteurs est faite par des polyribosomes, il y a ensuite transfert vers l'appareil de Golgi où se font les glycosylations. La tunicamycine (TM) inhibe ce procédé.

b.Deuxième étape : de l'activation des récepteurs à la sécrétion de LH, une

Rapport-Gratuit.com

succession de messages intracellulaires.

Suite à l'interaction entre l'hormone et son récepteur que nous venons de développer, un ensemble de réactions cellulaires aboutissent à la libération des gonadotrophines. Le mécanisme d'action de la GnRH est dépendant de différents seconds messagers que nous détaillerons successivement (figure 12).

-Protéine G et activation séquentielle des phospholipases.

La liaison hormone-récepteur active le système protéine G (Gq et / ou G11) qui alors active la phospholipase C bêta (PLC bêta) suivant un processus indépendant du calcium et nécessitant de 5 à 30 secondes. L'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP2) par la PLC béta génère le second messager inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG) qui sont respectivement nécessaires pour la mobilisation de calcium et l'activation de la protéine kinase C (PKC) ; (Shacham et al., 1999). La protéine kinase C n'apparaît pas indispensable à la libération de LH mais module celle-ci. Cette enzyme semble de façon encore indistincte intervenir dans la régulation de la liaison hormones-récepteur et dans la modulation de la production d'ARNm de LH par la cellule. Mais son rôle dans l'exocytose des gonadotrophines reste à préciser. La saturation des phosphorylations qu'elle réalise serait elle aussi en partie responsable des phénomènes de désensibilisation de la cellule.

-Une action dépendante de la concentration en calcium.

Les agents qui augmentent la concentration intracellulaire en calcium des cellules hypophysaires sécrétant les gonadotrophines, comme les ionophores et le KCl, provoquent une libération de gonadotrophines similaire à celle due à l'action de la GnRH. Il a été démontré que la GnRH entraîne l'ouverture de canaux calcium membranaires. Il y a d'abord mobilisation du calcium intracellulaire puis mobilisation du calcium extracellulaire. Un second messager intracellulaire, la calmoduline, a été identifié. Il y a une continuité entre la dose de GnRH qui arrive à l'hypophyse, l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium (qui est biphasique : une phase de mobilisation du calcium intracellulaire, puis une phase de plateau d'entrée du calcium extracellulaire), et la quantité de LH libérée par la cellule qui suit le même

profil que la concentration intracellulaire en calcium (figure 11 ; Stojilkovic et al., 1992)

La modulation de la réponse hypophysaire à la GnRH est aussi fonction du nombre de récepteurs présents à la surface des cellules hypophysaires produisant les gonadotrophines. Cette régulation est complexe et fait intervenir les hormones stéroïdes sexuelles dans le sens de l'augmentation ou de la diminution en fonction de nombreux paramètres annexes. Ces interactions seront développées dans la partie suivante.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

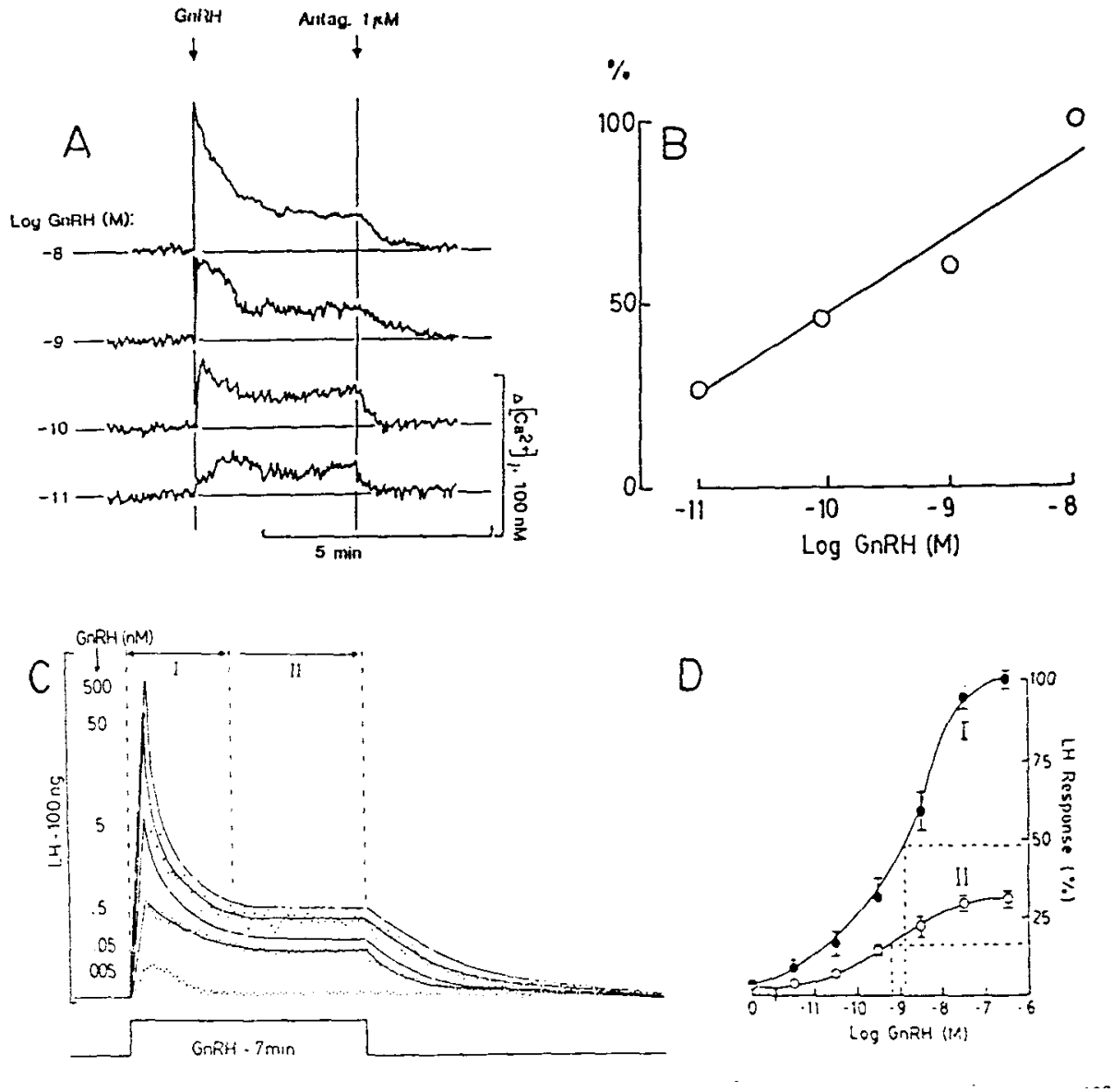


Figure 11 : Effet de la dose de GnRH sur la variation biphasique de la concentration intracellulaire en calcium et sur la libération de LH (Stojilkovic et al., 1992)

A. Effet de la dose de GnRH sur la concentration intracellulaire en calcium $[Ca^{2+}]i$ et son arrêt par l'ajout d'un antagoniste de la GnRH.

B. Corrélation entre la dose de GnRH et l'amplitude du pic de la réponse en élévation de la concentration en calcium.

C. Effet de l'accroissement de la dose de GnRH sur la réponse en libération de LH.

D. Comparaison entre l'effet de l'accroissement de la dose de GnRH sur La concentration en LH libérée en phase de pic (I) et en phase de plateau (II).

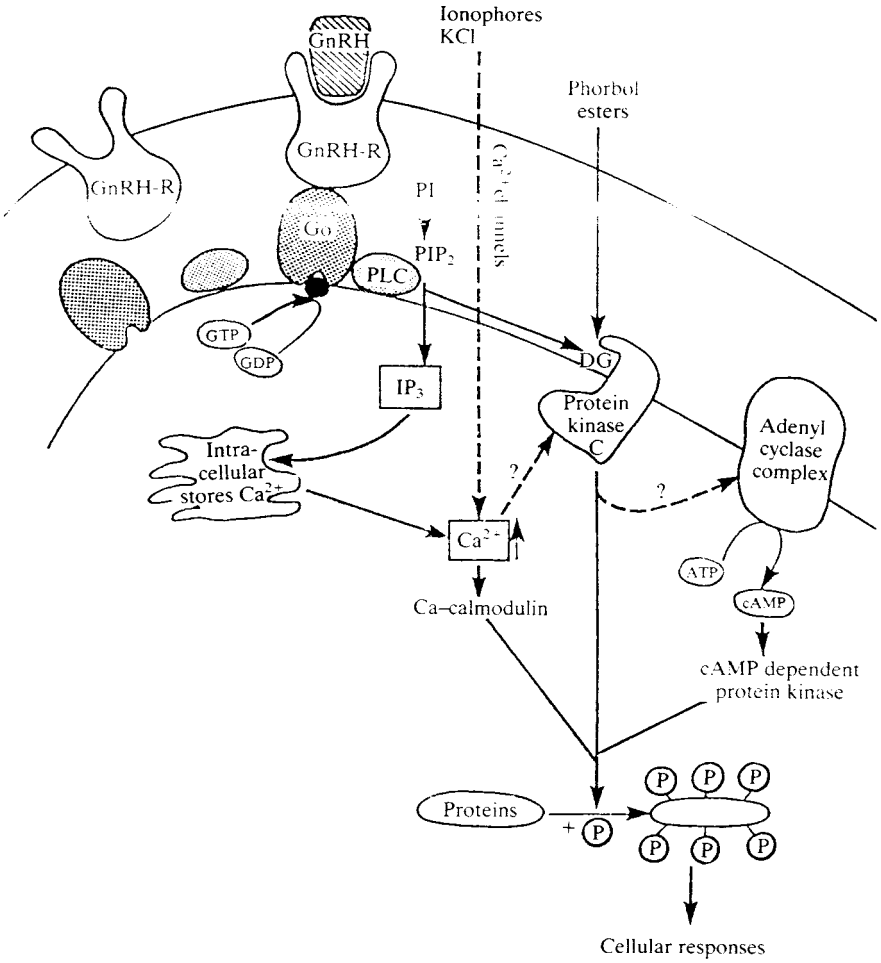


Figure 12 : Représentation schématique de la transduction du signal par les récepteurs à la GnRH (Clayton, 1989). GnRH-R=récepteur à la GnRH, Go=GTP-binding protein, PLC=Phospholipase C, IP3= inositol 1,4,5-triphosphate, DG=diacylglycerol, cAMP=cyclic 3',5', adenosine monophosphate, Ca^{2+} : ion calcium, P=groupement phosphate, PI=phosphoinositol, PIP2=inositol 4,5-diphosphate.

5.Présence de récepteurs à la GnRH ailleurs que sur les cellules gonadotropes de l'hypophyse.

Les progrès actuels de la génétique moléculaire permettent une recherche précise de l'expression de gènes dans les différents tissus de l'organisme par amplification des ARNm produits (technique de RT-PCR). Cette technique appliquée à l'ARNm codant pour les récepteurs à la GnRH de l'hypophyse a permis de confirmer les premières mises en évidence de la production de récepteurs à la GnRH de type hypophysaire dans les cellules de Leydig (Clayton et al., 1980), les cellules de la granulosa et les cellules lutéales chez le rats (Clayton et al., 1979 ; Harwood et al.,1980 ; Reeves et al., 1980). Ces premières études étaient basées sur l'observation des effets biologiques de la GnRH et de ses analogues sur différents tissus. Une étude plus récente confirme la présence de récepteurs à la GnRH identiques à ceux de l'hypophyse sur les testicules et les ovaires à tous les stades du développement fœtal du rat (Botté et al., 1998). Ces derniers ont également démontré la présence dans ces mêmes tissus, d'une production d'ARNm de la GnRH hypothalamique. Le même type de recherche a été réalisé chez l'homme sur des tissus normaux et tumoraux et les interprétations sont nuancées (elles sont en partie abordées dans les applications actuelles des analogues de la GnRH en médecine humaine). En ce qui concerne les espèces animales étudiées, les détails seront abordés dans leur partie spécifique.

Les recherches utilisant l'amplification des ARNm sont à interpréter différemment de celles qui étudient des capacités de fixation car elles ne mettent en évidence que les récepteurs de type hypophysaire dans l'organisme et ne permettent pas de détecter de récepteurs voisins tant qu'on n'en connaît pas la séquence. De plus l'étude de Millar et al. (1999) montre que chez l'homme des ARNm d'un autre récepteur à la GnRH que celui de l'hypophyse sont produits dans de nombreux tissus de l'organisme sans que les récepteurs ne soient

produits. Ce phénomène est expliqué par la régulation de la traduction des ARNm. L'ARNm du récepteur étudié est présent et traduit chez des vertébrés inférieurs mais il n'est que produit et non traduit chez l'homme. Ce récepteur est selon eux devenu vestigial chez l'homme. Le même type d'étude sur des vertébrés de stade d'évolution différent montre qu'avec l'évolution, les gènes codant pour les différents types de GnRH sont exprimés dans un nombre d'organes différents ou inhibés (Chow et al., 1998).

B.Conséquences de la sécrétion de GnRH sur l’activité hypophysaire et sur l’activité des organes sexuels.

1.Libération de LH et de FSH par les cellules de l’antéhypophyse.

a.Libération stimulée par la GnRH.

La dénomination ‘’complexe hypothalamo-hypophysaire’’ vient du fait que ces deux organes sont intimement liés anatomiquement et physiologiquement. Il est communément admis qu’une libération de GnRH dans le système porte hypophysaire est suivie d’une libération de LH et FSH par les cellules gonadotropes. Nous venons d’aborder la pulsatilité de la sécrétion de GnRH, celle ci est déterminante dans les modalités de libération des gonadotrophines.

Chaque fois que la pulsatilité de la sécrétion de GnRH a été démontrée, chaque pic de LH était précédé d'un pic de GnRH, mais chaque pic de GnRH n'est pas forcément suivi d'un pic de LH. La liaison entre l'activité électrique de l'hypothalamus, la libération de GnRH et la libération de LH au cours du temps est illustrée dans les figures 13 et 14. En fonction de l'espèce étudiée les variations de la fréquence des pics de GnRH induits expérimentalement provoquent des augmentations de la fréquence des pics de LH voire de FSH ou des diminutions. Une administration continue de GnRH provoque après une première phase de stimulation, une absence totale de sécrétion de LH et de FSH chez le rat et d'autres espèces (Broekmans et al., 1993). L'ensemble de ces constatations s'inscrit dans la théorie de l'oscillateur cérébral développée par Knobil (1980). Dans ce modèle, les variations de la fréquence des pics de sécrétion de GnRH permettent d'une part l'apparition de l'état pubertaire chez les individus, mais aussi la maîtrise de leur cycle sexuel et de la saisonnalité de leur activité sexuelle. La figure 15 présente l’expérience menée par Knobil (1980) mettant en évidence l’importance de la sécrétion pulsatile de GnRH par l’organisme dans la réponse des cellules hypophysaires sécrétant la LH.

Nous aborderons en détail ce type de la réaction avec les propriétés des agonistes de la GnRH dans chaque espèce.

D'autre part, une équipe a examiné la possibilité d'une sécrétion autonome

de LH, c'est-à-dire sans aucune stimulation par la GnRH (Lewy et al., 1996). Les résultats qu'ils ont obtenus in vitro montrent qu'il existe une sécrétion autonome de LH suivant un rythme sinusoïdal d'une période de seize heures. Leur hypothèse serait que l'hypothalamus ne servirait que d'un modulateur du niveau des sécrétions et de l'amplitude des sécrétions hypophysaires.

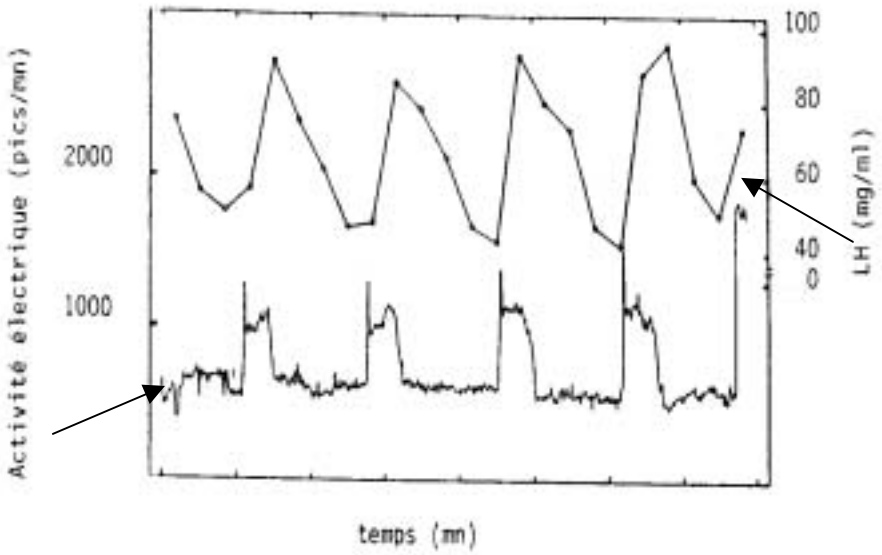


Figure 13 : Relation entre l'activité électrique de l'hypothalamus (courbe du bas) et la concentration plasmatique de LH (courbe du haut en mg/mL) chez le macaque rhésus femelle ovariectomisée (Plant, 1986).

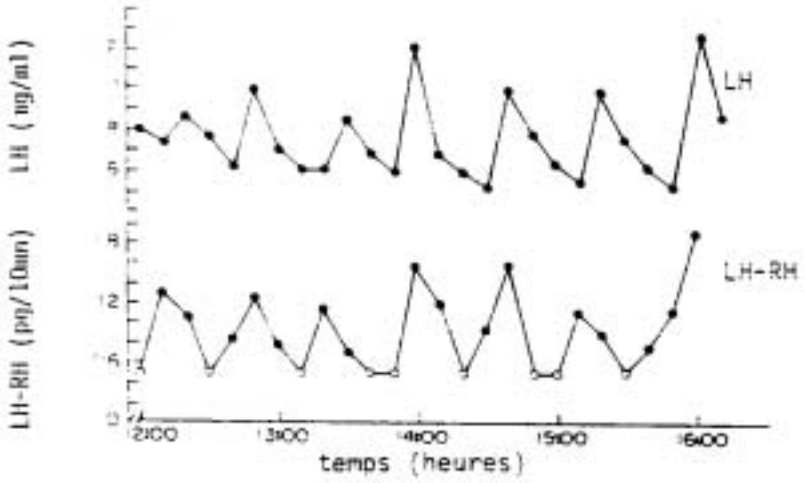


Figure 14 : Relation entre la libération de LH-RH (GnRH) par l'hypothalamus et la concentration plasmatique de LH chez une brebis ovariectomisée (Levine et al., 1982).

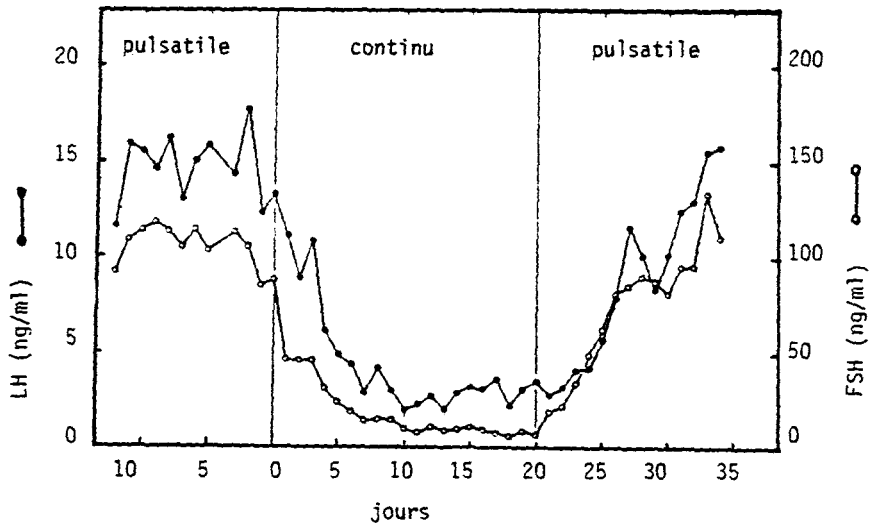


Figure 15 : Suppression des concentrations plasmatiques de LH et de FSH après perfusion continue de GnRH (1 µg /min à partir du jour 0) chez des singes rhésus femelles ovariectomisées d'après Knobil (1980). Des lésions de l'hypothalamus avaient inhibé la libération de GnRH. La sécrétion des gonadotrophines avait été restaurée par l'administration pulsatile de GnRH (1µg /min pendant 6min), 1 fois/heure. L'inhibition est levée quand on revient à un mode pulsatile d'administration au 20ème jour.

b.Libération stimulée par d'autres médiateurs que la GnRH.

Suite à la découverte de la GnRH et de son rôle, il fut admis que la GnRH était le seul facteur de libération des gonadotrophines et qu'il n'existait qu'un seul type de récepteur à la GnRH sur les cellules hypophysaires responsables de la libération de LH et de FSH.

Clayton et Catt décrivaient en 1981 un seul type de récepteur ayant une constante d'affinité élevée vis-à-vis de la GnRH : $Kd=1,3x10^{-9}$ M et au nombre de 10 000 à 15 000 par cellule. Ces observations ont été récemment remises en cause quant à l'exclusivité de la GnRH dans la régulation de la sécrétion des gonadotrophines. Il apparaît qu'il existe des stimulations croisées entre les différents facteurs hypothalamiques de libération des hormones hypophysaires (Villalobos et al., 1997). Ces expériences mettent en évidence qu'il existe parmi l'ensemble des cellules hypophysaires sécrétant des gonadotrophines 47 à 55 % d'entre elles qui sont sensibles aux autres facteurs hypothalamiques de libération des hormones hypophysaires. La figure 16 présente le résultat de ces expériences concernant la réponse en augmentation de la concentration en calcium intracellulaire de quatre types de cellules hypothalamiques soumises à quatre facteurs hypothalamiques différents. La figure 17 présente la réponse de cellules hypophysaires synthétisant la FSH aux stimulations de différents facteurs hypothalamiques. On notera que ces cellules synthétisant de la FSH ne répondent pas uniquement à la GnRH, mais qu'un pourcentage important d'entre elles est sensible à d'autres facteurs libérés par l'hypothalamus. La conclusion de ces travaux est que la régulation de la sécrétion des différentes hormones hypophysaires, gonadotrophines comprises, ne serait pas simplement fonction de la régulation due au facteur hypothalamique qui leur est propre mais à une association de stimulations des facteurs hypothalamiques. Ces interactions pourraient expliquer la modulation des réponses aux stimulations par la GnRH en fonction de l'état de stress, de lactation, de croissance et autres paramètres des individus étudiés.

Rapport-Gratuit.com

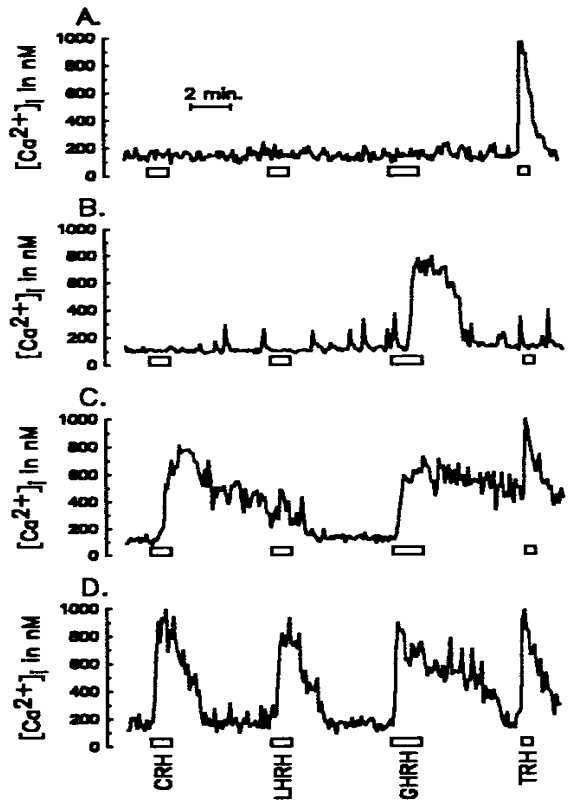


Figure 16 : Effets sur la concentration intracellulaire en calcium de stimulations par 4 nM de CRH, GnRH, GHRH ou par 100 nM de TRH sur quatre types (A,B,C,D) de cellules hypophysaires (Villalobos et al., 1997).

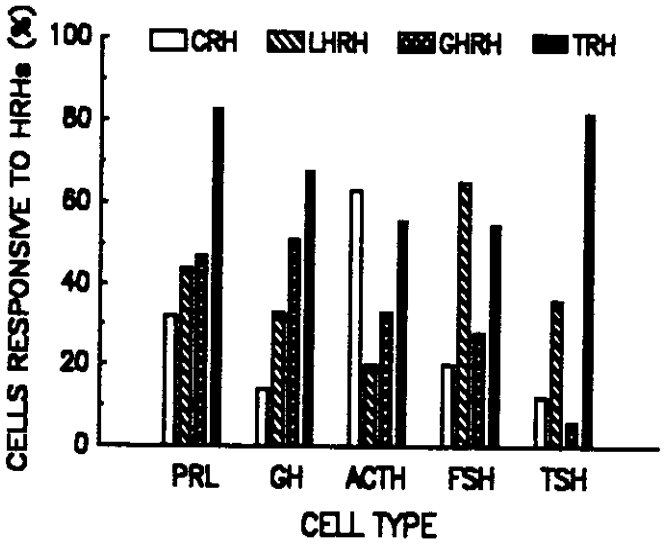


Figure 17 : Pourcentage de cellules hypophysaires de chaque type répondant aux différents facteurs hypothalamiques de stimulation (Villalobos et al., 1997).

PRL : cellules hypophysaires synthétisant de la prolactine.

GH : cellules hypophysaires synthétisant de l'hormone de croissance.

ACTH : cellules hypophysaires synthétisant de l'ACTH.

FSH : cellules hypophysaires synthétisant de la FSH.

TSH : cellules hypophysaires synthétisant de la TSH.

D'autre part, une série d'expérimentations réalisées à partir de cellules hypophysaires et hypothalamiques bovines tendent à montrer que des extraits de l'éminence médiane de l'hypothalamus ont une activité stimulatrice sur la sécrétion des gonadotrophines supérieures à la simple activité de la GnRH et que le blocage des récepteurs spécifiques à la GnRH ne bloque pas totalement cette activité de stimulation (Leiva et al., 1993).

De même, Koppan et al. (1998) ont mis en évidence sur des rats traités avec un antagoniste de la GnRH qu'une stimulation électrochimique de l'éminence médiane de l'hypothalamus provoquait une libération de FSH mais pas de LH par l'hypophyse. Ils en ont conclu que dans cette espèce une part de la sécrétion de FSH est indépendante de la sécrétion de GnRH et qu'une FSH-RH est à rechercher (figure 18).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Ces observations sont concordantes et semblent indiquer que la régulation de la sécrétion des gonadotrophines est nettement plus complexe que le schéma de base initialement décrit. Cette complexité serait à même d'expliquer des échecs thérapeutiques mais ouvre aussi de nouvelles voies de recherche.

Bashin et al. (1994) ont mis en évidence un phénomène d'échappement de la FSH chez des hommes soumis à un traitement avec un agoniste sous forme de microcapsules et de testostérone : après une première phase d'inhibition comparable à celle de la LH, la FSH retrouve des concentrations plasmatiques comparables à celles d'avant traitement alors que la LH est maintenue à son minimum.

L'équipe de Yu et al. (1997) affirme, elle, avoir mis en évidence toujours chez le rat, mais aussi chez la chèvre, une FSHRH et propose un schéma mettant en évidence les neurones responsables de la synthèse de FSHRH. Ils ont obtenu les mêmes résultats de stimulation sur ces animaux en utilisant la LHRH de type III de lamproie qui semble avoir une activité FSHRH supérieure à la GnRH chez les mammifères. Ce type de nouvelles molécules pourrait avoir, selon eux, un fort impact en maîtrise de la reproduction chez les mammifères.

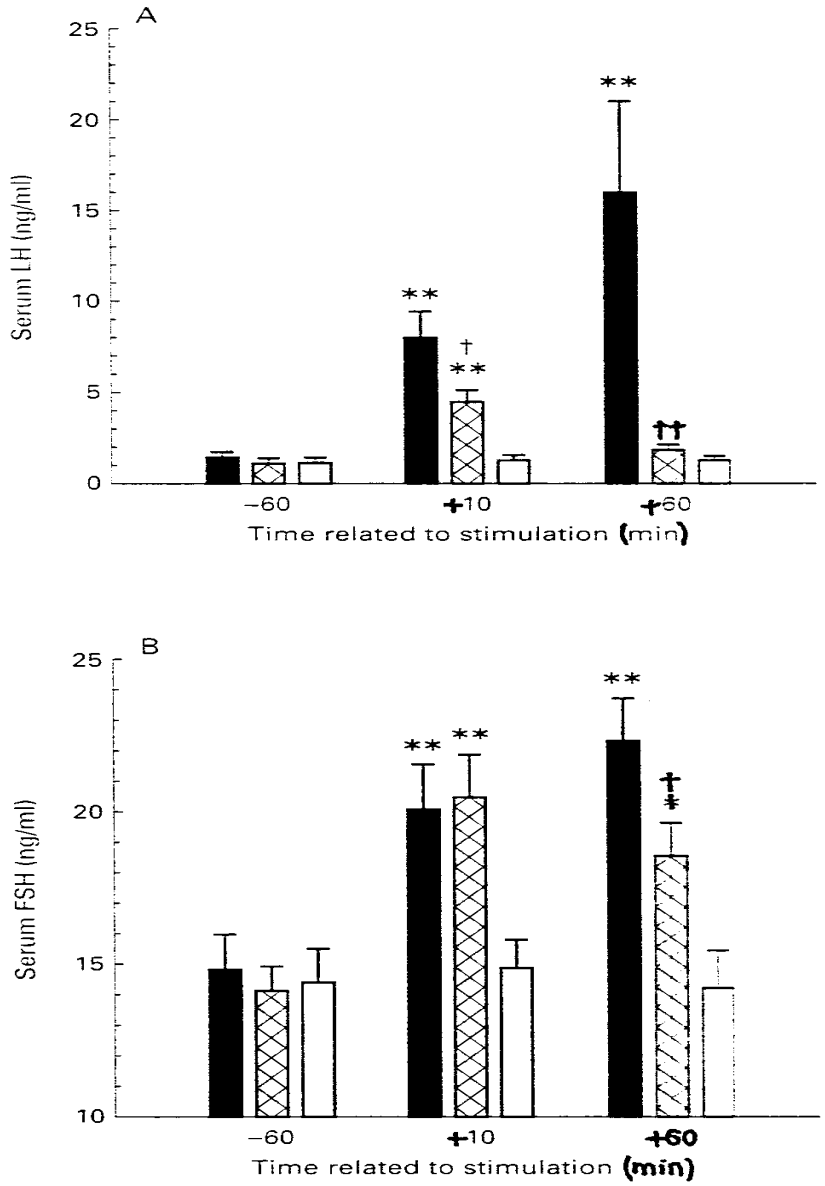


Figure 18 : Effet de la stimulation électrochimique de l'éminence médiane de l'hypothalamus combinée avec un traitement antagoniste de la GnRH sur la concentration sérique en LH (A) et FSH (B) sur des rates ovariectomisées 60 min avant et 10 puis 60 min après stimulation. Les barres pleines représentent les témoins ne recevant que le solvant de l'antagoniste. Les barres hachurées représentent les animaux traités. Les barres creuses représentent le témoin électrode inactive. *p<0,05; **p<0,01 par rapport au témoin électrode inactive. +p<0,05; ++p<0,01 par rapport au témoin solvant (Koppan et al., 1998).

2.Régulation des fonctions endocriniennes

a.Chez le mâle.

Il faut souligner qu'il existe une différence importante entre la physiologie des organismes mâles et femelles dans la régulation de la sécrétion des hormones sexuelles.

Chez le mâle, la sécrétion pulsatile de GnRH entraîne une libération progressive et soutenue de FSH et une libération pulsatile de LH. Les rétroactions s'exercent sur la FSH par l'inhibine, et sur la LH par les androgènes. Chez les espèces saisonnées, la fréquence des pulses de sécrétion de GnRH diminue dans la période de repos. La figure 19 récapitule les régulations endocriniennes de la fonction de reproduction mâle.

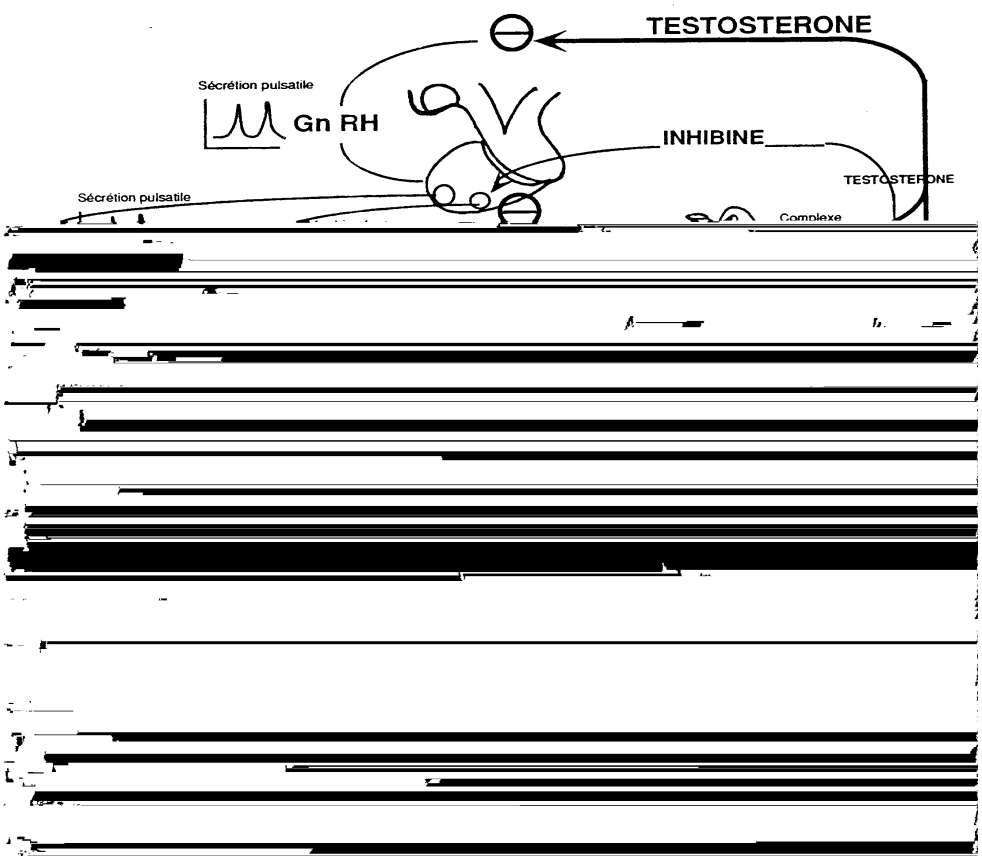


Figure 19 : Régulation endocrinienne de la fonction sexuelle mâle (Brugère, 1998).

b.Chez la femelle.

Chez la femelle, l'activité sexuelle est cyclique (et dans certains cas saisonnée). Le déroulement d'un cycle ovarien normal repose sur l'intervention coordonnée des deux structures impliquées dans la régulation de la sécrétion de la

LH. Le centre de sécrétion tonique (basale) est responsable de la sécrétion pulsatile mais continue. La fréquence des pulses traduit le niveau d'activité, elle est fonction du taux de stéroïdes sexuels circulant. L'augmentation de la concentration plasmatique des stéroïdes sexuels entraîne la diminution de la fréquence. Le centre de sécrétion phasique (générateur de décharge) est lui responsable d'une seule sécrétion massive (1 pulse par cycle) qui induit le pic ovulant de LH.

Pendant la phase de maturation folliculaire, on observe une sécrétion tonique de GnRH qui induit la sécrétion d'une quantité importante de FSH et d'une quantité moindre de LH, d'où le développement de follicules et la sécrétion d'œstrogènes. Ces œstrogènes freinent le centre tonique de l'hypothalamus (rétrocontrôle « long »), freinent l'hypophyse (rétrocontrôle « court »). Les gonadotrophines et la GnRH freinent le centre tonique. Inversement, pendant cette phase, il existe un rétrocontrôle dit positif, résultat d'une stimulation du centre phasique par les œstrogènes.

Dans la période qui précède l'ovulation, les œstrogènes stimulent le centre phasique, ce qui produit une augmentation rapide de la quantité de LH libérée dans la circulation. Les rétrocontrôles négatifs existent toujours pendant cette phase mais n'agissent que sur le centre tonique. La figure 20 récapitule ces interactions.

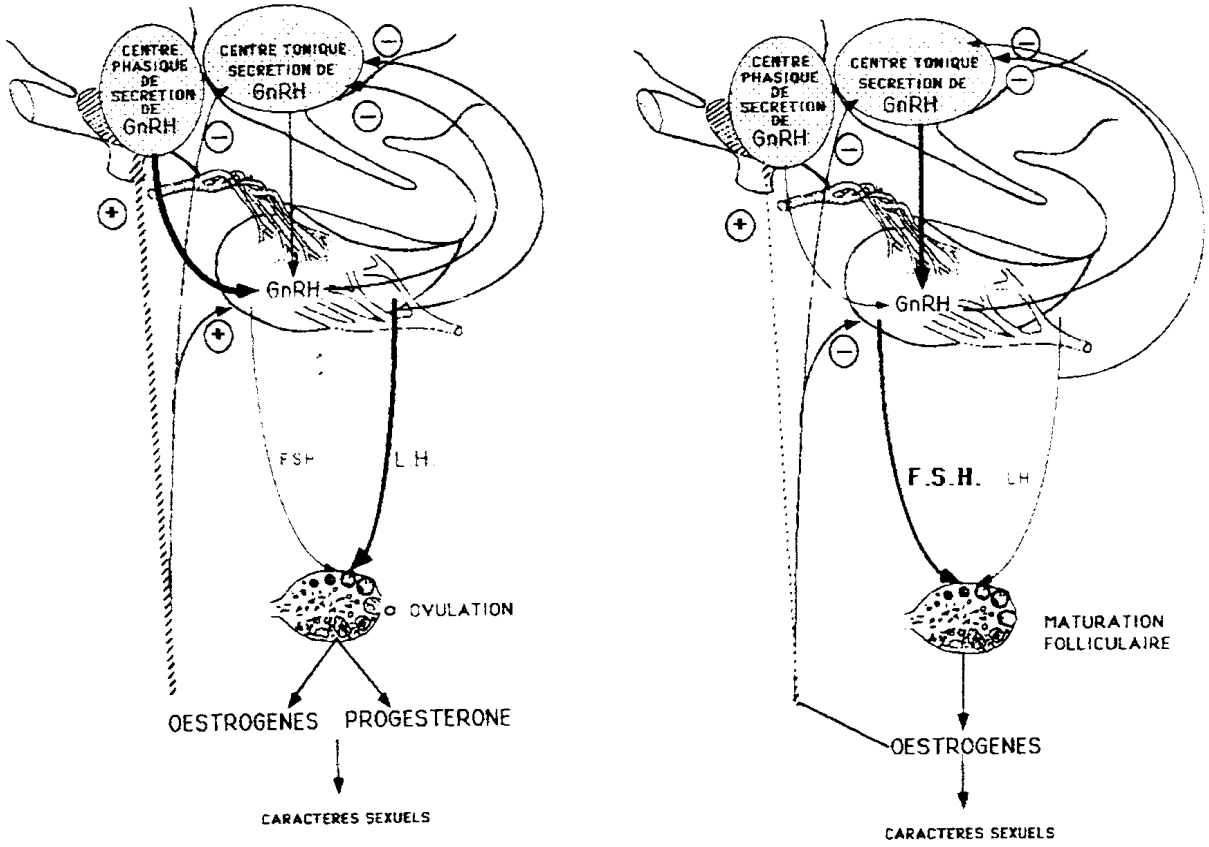


Figure 20 : Régulation endocrinienne de la fonction sexuelle femelle pendant les phases de maturation folliculaire et d'ovulation (Brugère, 1998).

C'est le pic de LH qui déclenche l'ovulation, mais il faut souligner qu'il existe une grande disparité entre les espèces de mammifères quant au facteur déclenchant

ce pic de LH. La figure 21 schématise en partie l'ensemble des facteurs environnementaux qui peuvent interférer avec ce système.

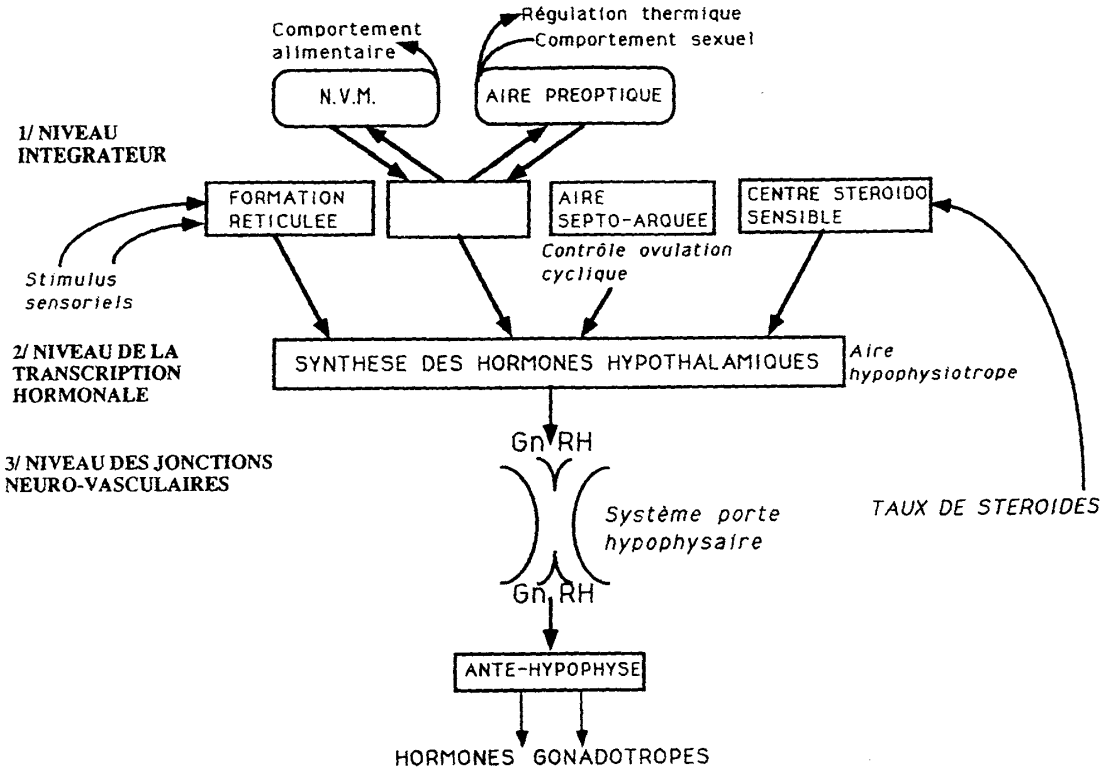


Figure 21 : Relations multiples entre l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire et l'environnement hormonal et sensoriel (NVM : noyau ventro médian)(Brugère, 1998).

L'installation du corps jaune fait suite à l'action de la LH dans un contexte où les œstrogènes sont à un niveau élevé. À ce moment, le taux de progestérone est à des niveaux divers en fonction de sa source de production et de l'espèce. Chez la femme, la vache et la truie, c'est la LH qui stimule la production de progestérone par le corps jaune. Pendant cette phase, la progestérone et les œstrogènes exercent un rétrocontrôle négatif sur leur production en inhibant la libération de GnRH et de LH. Chez la brebis et la chienne, le système est plus complexe et fait intervenir une synergie d'actions entre la LH et la prolactine.

Le complexe hypothalamo-hypophysaire n'est pas capable de finir un cycle sexuel, cette fonction est assurée par l'utérus dont l'endomètre synthétise des prostaglandines F2 alpha, lutéolytiques.

3.Impact de la sécrétion des gonadotrophines sur les organes reproducteurs.

Cette partie vise à rappeler l'importance des hormones stéroïdes mâles et femelles dans le développement des organismes mammifères, leur comportement, le maintien de leurs caractères sexuels. Ces différents aspects communs en général à toutes les espèces étudiées dans cette thèse feront l'objet de développements particuliers lorsque leur modification par l'intermédiaire des analogues de la GnRH est possible.

Chez le mâle, la principale hormone qui nous intéresse est la testostérone (delta -4-androstène -17ol- 3one). Ce stéroïde possède une activité sexuelle : chez l'embryon et le fœtus, les androgènes ont peu d'effet sur le développement des gonades, mais ils stimulent la formation des canaux de Wolf et sont responsables de l'hypertrophie de l'appareil génital mâle à la naissance. Injectés chez l'individu impubère, ils déclenchent la puberté précoce, l'individu présente toutes les apparences d'un développement sexuel complet mais sans stimulation des caractères sexuels primitifs (le testicule reste atrophié aussi bien pour la fonction germinale que pour la fonction endocrine). D'autre part, il y a arrêt de la croissance de l'organisme par soudure des cartilages de conjugaison et le développement des caractères sexuels secondaires. Chez l'adulte, la testostérone est responsable du développement des caractères sexuels primaires et secondaires, mais elle présente une action inhibitrice sur le développement des testicules dans leur fonction germinale et endocrine. Cette inhibition est le fait d'un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire alors que l'effet direct des androgènes est positif sur la spermatogenèse.

Les androgènes exercent aussi des influences sur le métabolisme. Ils augmentent légèrement le métabolisme de base et fortement le métabolisme protidique. L'accumulation de protéines porte sur la musculature squelettique, le tissu rénal et le tissu osseux. Les androgènes augmentent la matière protéique de l'os, d'où leur action favorable dans l'ostéoporose.

Les androgènes agissent sur les organes cibles par l'intermédiaire de récepteurs intranucléaires. Ils circulent essentiellement sous forme liée à la SBP (Sex Binding Protein) et sont métabolisés par le foie (Brugère, 1998).

Chez la femelle, nous nous intéresserons aux œstrogènes et aux progestagènes.

Parmi les œstrogènes, la principale hormone ovarienne qui nous intéresse est l'œstradiol 17 béta. Ces œstrogènes ont diverses activités biologiques dont des activités sur les fonctions sexuelles :

-augmentation du poids de l'utérus et stimulation du développement de sa muqueuse,

-augmentation de la contractilité du myomètre,

-cornification de la muqueuse vaginale,

-ouverture du col utérin,

-stimulation de l'œdème vulvaire,

-stimulation du système canaliculaire de la mamelle.

Ils sont responsables du développement du comportement d'œstrus. Leur action sur le métabolisme est variable en fonction des espèces : chez les ruminants, ils stimulent l'anabolisme. Dans de nombreuses espèces ils favorisent la soudure des cartilages de conjugaison et le maintien de la trame osseuse.

Les progestagènes naturels ont des actions sexuelles : ils favorisent le développement de l'endomètre après sensibilisation aux œstrogènes, inhibent les contractions spontanées et l'effet de la plupart des stimulants sur le myomètre. Ils stimulent le développement des acini mammaires. Ils inhibent la sécrétion de GnRH et la décharge ovulante de LH et ont différents effets antagonistes sur les actions des œstrogènes. Sur le métabolisme, ils sont responsables de l'anabolisme de gestation.

La GnRH est au sommet de l'organigramme contrôlant les fonctions de reproduction par son action sur la libération des gonadotrophines. Les interventions médicales visant à modifier les fonctions de reproduction font appel à des administrations des différentes hormones de cet organigramme : GnRH, gonadotrophines, stéroïdes sexuels. L'administration de GnRH permet d'intervenir à l'origine du système de régulation et de modifier avec la même molécule l'ensemble de la fonction de reproduction chez le mâle et la femelle.

Rapport-Gratuit.com

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

II.Les analogues de synthèse de la GnRH, agonistes et antagonistes en administration chronique.

Les analogues de synthèse sont des molécules de composition chimique voisine de celle de la molécule naturelle. Parmi ces molécules, on distingue des agonistes qui présentent une affinité pour le récepteur à la molécule naturelle et la capacité d'induire un effet observable suite à l'interaction avec ce récepteur. Cette capacité est aussi appelée activité intrinsèque de l'agoniste ou efficacité. Les agonistes sont donc caractérisés par leur affinité pour un récepteur (logarithme négatif de la concentration molaire de l'agoniste qui produit une réponse égale à 50% de la réponse maximale qu'il peut donner) et par leur efficacité (effet maximal que l'agoniste peut produire par rapport à l'effet maximal de la molécule naturelle). Ces deux caractéristiques sont indépendantes.

Les antagonistes sont caractérisés par une affinité pour les récepteurs comme les agonistes mais par une absence d'efficacité. Ils sont dits compétitifs lorsqu'ils se lient au même site de fixation que la molécule dont ils antagonisent les effets, ou non compétitifs lorsque leur interaction ne se fait pas sur le même site. Un antagoniste compétitif n'entre en compétition qu'en terme d'affinité avec la molécule naturelle alors qu'un antagoniste non compétitif intervient sur l'affinité et l'efficacité. En fonction des agonistes et antagonistes étudiés, ces distinctions sont à nuancer (Booth et McDonald, 1982).

Depuis la découverte de la GnRH comme principal facteur hypothalamique régulant la libération des gonadotrophines, de nombreux travaux ont été entrepris pour synthétiser des analogues de ce décapeptide.

La synthèse de ces analogues a été orientée vers la synthèse d'agonistes permettant de mimer les stimulations hypothalamiques afin de maîtriser plus précisément la fertilité des espèces animales. La mise en évidence de l'effet inhibiteur paradoxal des agonistes administrés sur un laps de temps suffisant a remis en cause les perspectives d'utilisation des agonistes en termes de stimulation, mais a ouvert la voie à toutes les utilisations possibles de l'inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysaire dans la maîtrise des fonctions de reproduction. Les antagonistes ont par contre été directement développés pour inhiber la libération des gonadotrophines, mais leur développement a été retardé par l'apparition de

nombreux effets secondaires suite à leur utilisation. L'évaluation des propriétés biologiques de ces molécules s'est avérée difficile vu la complexité de la relation entre la liaison de l'hormone à son récepteur et la production de gonadotrophines. En effet, il ne suffit pas que les agonistes se lient aux récepteurs mais il faut encore que la cascade de messagers intracellulaires aboutisse à l'effet voulu. Les études in vitro ont donc été couplées à des études in vivo pour s'assurer de l'efficacité de ces analogues. Ces études in vivo, réalisées la plupart du temps sur des rats, n'ont au départ pas mis en évidence les grandes disparités qui existent entre espèces quant aux effets de ces molécules. Dans cette première partie nous évoquerons les modalités du développement de ces analogues de synthèse de la GnRH ainsi que la mise en évidence de leur effet biologique sur le rat comme espèce de laboratoire. Dans la suite de notre étude, nous évoquerons les utilisations de ces molécules dans l'espèce humaine et dans les différentes espèces animales de rente et de compagnie étudiées.

A.Synthèse et objectifs de synthèse des analogues de la GnRH

La figure 22 résume les modifications apportées à la molécule naturelle pour obtenir des agonistes ou antagonistes et pour augmenter leur durée de vie dans l'organisme.

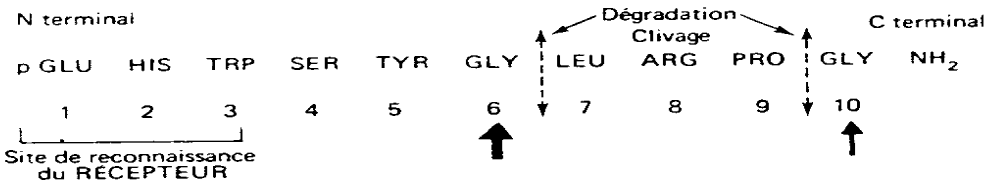


Figure 22 : Le GnRH natif et les sites fonctionnels de la molécule. (Les flèches indiquent les acides aminés dont la modification conduit aux agonistes).

-La modification d'un acide aminé en 6 et la suppression du 10ème acide aminé conduit aux principaux agonistes.

-La substitution des acides aminés en position 1.2.3 modifie la capacité de liaison de la molécule à son récepteur et conduit aux antagonistes (Lecomte, 1984).

1.Développement des agonistes

La première modification importante effectuée sur le décapeptide a été de modifier son extrémité C terminale. Ces modifications ont été orientées par le fait que le décapeptide terminé par une fonction amide n'avait que de faibles potentialités de stimulation et la Pro9-GnRH n'avait que 10 % de l'effet stimulateur de la molécule naturelle. Le remplacement de la glycine terminale par une fonction alkyl amine donne au nonapeptide formé des propriétés de stimulation de l'ovulation supérieures aux décapeptide naturel. Des études complémentaires supposent que la terminaison de la molécule naturelle intervient peu dans les interactions avec les récepteurs mais qu'elle a un rôle dans la dégradation enzymatique de l'hormone ; sa modification augmente donc sa durée de vie (Fujino et al., 1972).

La seconde modification importante apportée à la GnRH a été le remplacement du résidu Gly6 par un D-alanine qui a entraîné une augmentation de 350 à 450 % du potentiel de stimulation de la molécule chez des rates ovariectomisées. Par contre la L-Ala-6-GnRH (insertion d'un résidu L-alanine en

position 6) n'a que 4 % du potentiel de stimulation de la GnRH. L'analyse de cette modification dans la séquence en acides aminés montre d'une part que l'insertion de D-alanine en position 6 offre une meilleure stabilité du feuillet bêta II de la molécule et d'autre part modifie le principal site de clivage par les enzymes de l'organisme. Cette simple modification entraîne donc une meilleure affinité avec les récepteurs et une dégradation enzymatique retardée (Monahan et al., 1973 ; Nestor, 1984).

Suivant les modèles précédemment décrits, de nombreuses modifications de la séquence en acides aminés du décapeptide naturel ont été testées d'une part pour comparer chaque modification individuelle avec la molécule naturelle et d'autre part, pour comparer des additions de modification par rapport à la molécule naturelle. La première hypothèse a été que les bénéfices apportés par chaque modification s'additionnent lorsque l'on cumule les modifications sur la même molécule. Mais cette hypothèse qui se vérifie parfois in vitro n'a pas toujours été confirmée in vivo. C'est le cas par exemple de la D-Trp-6-GnRH ayant déjà un potentiel plus important et pour laquelle les modifications en position 9 ne seraient pas forcément bénéfiques (Schally et al., 1980 ; Wass et al., 1979).

Les tableaux II et III montrent les potentiels d’activités relatifs des différents agonistes et la différence qui existe entre les capacités de liaison et le pouvoir biologique in vitro. Les différences de réponse in vivo chez le rat entre la molécule d’origine naturelle et les ‘’super’’agonistes de synthèse sont présentées sur la figure 23.

Tableau II : Principaux agonistes du GnRH (Perrin et al., 1980 ; Hsueh et al., 1983).

Composé	**Capacité de liaison***	**Pouvoir biologique in vitro***
[D Trp^6] GnRH	10	36
[D Trp^6, Pro^9 Net] GnRH	15	144-155
[D Ala^6] GnRH	4	3.7
[D Ala^6, Pro^9 Net] GnRH	8	14
[D Leu^6] GnRH	3	3.2
[D leu^6, Pro^9 Net] GnRH	12	15
[D Leu^6 (N^{alpha}Me) Leu^7, Pro^9, Net] GnRH	_	12
[D Ser (t Bu)^6, Pro^9 Net] GnRH	_	190
buséréline = Hoe 766		
* par rapport à GnRH = 1		

Tableau III : Séquence en acide aminés, potentiel d'activité biologique et temps de demi vie des principaux agonistes de la GnRH utilisés en médecine humaine (Chien, 1992).

Analogues de la GnRH (nombre d'acides aminés)	Sites de modification			Potentiel biologique	Temps de demi vie (min)
	6ème	9ème	10ème		
GnRH naturelle (10)	Gly	Pro	Gly	1	8
Leuproréline (9)	D-Leu	Pro-N-Et	-	5-15	(16)
Busséréline (9)	D-Ser-t-Bu	Pro-N-Et	-	25	80
Goséréline (9)	D-Ser-t-Bu	Pro	Aza-Gly-NH2	75	-
Trytoréline (10)	Trp-N-Me-Leu	Pro	Gly	100	30
Nafaréline (10)	D-2-napht.-Ala	Pro	Gly	200	144

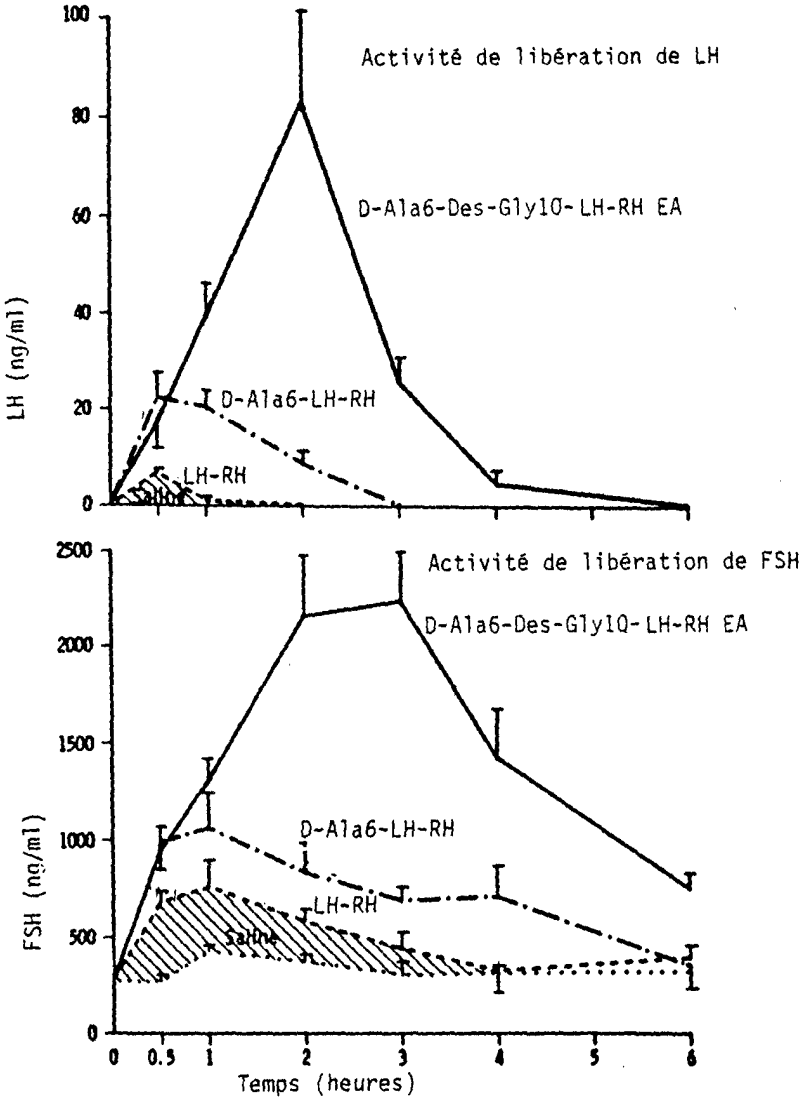


Figure 23 : Courbes comparées de libération de LH et de FSH chez des rats mâles immatures après stimulation par la LH-RH, la D-Ala6-LH-RH et la Des-Gly-10-D-Ala6-LH-RH EA (LH-RH éthylamide) (Arimura et al., 1974).

2.Développement des antagonistes

La synthèse des antagonistes de la GnRH répond à des critères identiques à celles des agonistes : augmenter leur durée de vie dans l'organisme, augmenter leur affinité pour les récepteurs, mais diverge totalement sur le fait que les antagonistes doivent totalement inhiber la réponse de l'hypophyse en empêchant la libération de gonadotrophines. Toute la difficulté est de réaliser un analogue structural du décapeptide naturel suffisamment voisin pour être mieux reconnu par le récepteur que la molécule naturelle mais bloquant totalement ce récepteur.

L'élimination de l'activité biologique de la molécule naturelle a été d'abord réalisée en substituant les acides aminés Histidine 2 et Tryptophane 3 tout en modifiant comme pour les agonistes la Glycine 6 (tableau IV). Le premier antagoniste synthétisé d'après Karten et Rivier (1986) a été la D-Phe^{2}-D-Ala^{6}-LHRH. L'équilibre entre les portions hydrophiles et hydrophobes de la molécule semble avoir une importance capitale dans l'affinité de celle-ci avec les récepteurs membranaires, voire avec les phospholipides membranaires des cellules gonadotropes (Coy et al., 1982).

Tableau IV : Activité antiovulatoire des analogues de la GnRH [Ac-R1, D-Phe(*p*Cl)2, D-Trp3, R6, D-Ala10] chez le rat (R : résidu)(Bajusz et al., 1988).

Rapport-Gratuit.com

Peptide			Dose en µg Injection sous cutanée	Nombre de rates ovulant / testées	Pourcentage de blocage de l'ovulation
No.	Résidu 1	Résidu 6			
II	D-Phe(*p*Cl)	D-Arg	3	1/8	87,5
1	D-Phe(*p*Cl)	D-Cit	3	5/17	70
			1	6/12	50
2	D-Nal(2)	D-Cit	3	0/7	100
			1	3/7	57
3	D-Phe(*p*Cl)	D-Hci	3	2/13	85
			1	3/11	73
4	D-Nal(2)	D-Hci	3	0/11	100
			1.5	3/8	62,5
5	D-Phe(*p*Cl)	D-Cit(Et)	3	8/8	0
6	D-Nal(2)	D-Cit(Et)	3	4/7	43
7	D-Phe(*p*Cl)	D-Hci(Et)	3	5/7	29
8	D-Nal(2)	D-Hci(Et)	3	8/8	0
Témoin			-	-	0

L'un des principaux inconvénients des premiers antagonistes synthétisés a été leur activité anaphylactique qui leur interdisait tout essai clinique. Une équipe a réalisé une étude comparative des effets anaphylactiques et biologiques. Il en est ressorti que l'antagoniste D-Cit/D-Hci6 inhibe l'ovulation chez 100% des rattes cyclées de l'essai à la dose de 3 µg et abaisse le taux de LH circulante chez les rates ovariectomisées pendant 47h à la dose de 25 µg. De plus, il est sans aucun effet anaphylactique jusqu'à la dose de 1,5mg/kg (tableau V). Cette molécule était donc un bon candidat pour des essais cliniques futurs (Bajusz et al., 1988).

Tableau V : Activité anaphylactique d'antagonistes de la GnRH [Ac-R1, D-Phe(*p*Cl)2, D-Trp3, R6, D-Ala10]LHRH et d'un de ses analogues Arg5 (Bajusz et al., 1988).

Peptide			Nombre de rats exprimant un effet oedémateux à la dose de 1.5 mg/kg *						Anaphylaxie cutanée. Diamètre de la lésion cutanée en mm en fonction de la dose en µg/ml.				
			Jour 1			Jour 2							
No	Résidu 1	Résidu 6	NR	PR	FR	NR	PR	FR	10	5	1	0.5	HRD_{50}, µg/ml
II	D-Phe(*p*Cl)	D-Arg	3	7	0	0	0	10	1,37+/-0,7	12,8+/-1,2	8,9+/-0,3	7,2+/-0,4	1,0
1	D-Phe(*p*Cl)	D-Cit	9	0	0	9	0	0	9,5+/-0,2	8,4+/-0,3	5,0+/-1,2	0,2+/-0,003	2,5
2	D-Nal(2)	D-Cit	8	0	0	8	0	0	10,8+/-0,5	9,7+/-0,3	5,1+/-0,6	2,3+/-0,7	3,5
3	D-Phe(*p*Cl)	D-Hci	9	0	0	8	1++	0	9,3+/-0,3	6,5+/-0,4	4,2+/-1,0	2,0+/-0,4	2,5
4	D-Nal(2)	D-Hci	6	0	0	6	0	0	7,3+/-0,5	6,0+/-0,8	4,0+/-0,3	1,7+/-0,2	2,0
4a§	D-Nal(2)	D-Hci	6	0	0	4	2++	0	7,9+/-1,3	6,2+/-0,9	4,2+/-0,8	2,1+/-0,3	ND
Témoin			6	0	0	6	0	0					

*Classification de la réponse œdémateuse : NR aucune réaction apparente, PR réponse partielle (œdème nasal et de l'aire périnasale), FR réponse importante (œdème de la face et des extrémités).

HRD_{50} concentration en antagoniste de la GnRH induisant la libération de 50% du contenu en histamine de mastocytes péritonéaux de rat *in vitro*.

ND non déterminé.

++ léger œdème facial

§ analogue Arg5.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

B.Interactions des analogues de la GnRH avec les récepteurs hypophysaires

1.Interactions des agonistes

Dans cette partie, nous évoquerons les différentes approches actuellement envisagées pour expliquer le phénomène de désensibilisation des cellules gonadotropes en présence d'un agoniste de la GnRH.

L'existence d'une période réfractaire après une stimulation par un analogue de structure d'une hormone est un phénomène commun en biologie (Catt et al., 1979). Ce type de réaction cellulaire apparaît être comme une mesure protectrice évitant le «surmenage cellulaire». Ce phénomène a particulièrement été mis en évidence pour les hormones peptidiques dans le cas d'exposition continue des récepteurs.

Dans le cas de la désensibilisation des cellules gonadotropes par un agoniste de la GnRH, plusieurs phénomènes sont associés pour expliquer la période réfractaire. Un premier phénomène est la diminution du nombre de récepteurs à la GnRH à la surface des cellules gonadotropes lorsque celles-ci sont exposées en continu à un agoniste (figure 24)(Clayton, 1989). Mais cette situation n'explique pas la totalité de la désensibilisation car celle-ci peut survenir très précocement alors que des récepteurs sont encore présents à la surface de la cellule et ferait donc aussi intervenir la saturation des seconds messagers intracellulaires. D'autre part, le modèle précédemment décrit de dimérisation et d'agrégation des récepteurs explique en partie aussi la désensibilisation (Zolman, 1985b). La formation des agrégats nécessite une quantité importante d'agoniste de la GnRH mais leur maintien nécessite une quantité plus faible. Tant que ces agrégats sont formés, la cellule est réfractaire aux autres stimulations. Après disparition de l'analogue, le temps que les agrégats se désorganisent, la cellule est toujours réfractaire. La combinaison de l'explication de la période réfractaire par la saturation des seconds messagers intracellulaires et par la micro-agrégation des récepteurs est intéressante, car le premier second messager des récepteurs à la GnRH est la protéine G. L'absence de couplage entre les récepteurs et la protéine G pendant la micro-agrégation serait l'un des facteurs majeurs expliquant la période réfractaire. D'autre part, il apparaît que la synthèse même des gonadotrophines est inhibée pendant cette période, ainsi

l’inhibition de la synthèse de LH se traduit par une diminution de la synthèse de la sous unité bêta de la LH, sous unité propre à l’hormone active pendant un traitement avec un agoniste de la GnRH (figure 25).

Nous avons donc pour le moment trois explications complémentaires de la désensibilisation :

-la diminution du nombre de récepteurs à la surface des cellules gonadotropes.

-l'absence de couplage entre les récepteurs et les seconds messagers intracellulaires du fait du phénomène de micro-agrégation et de saturation des seconds messagers.

-l'inhibition de la synthèse des gonadotrophines pendant cette période.

(Clayton, 1989 ; Hazum et al., 1988).

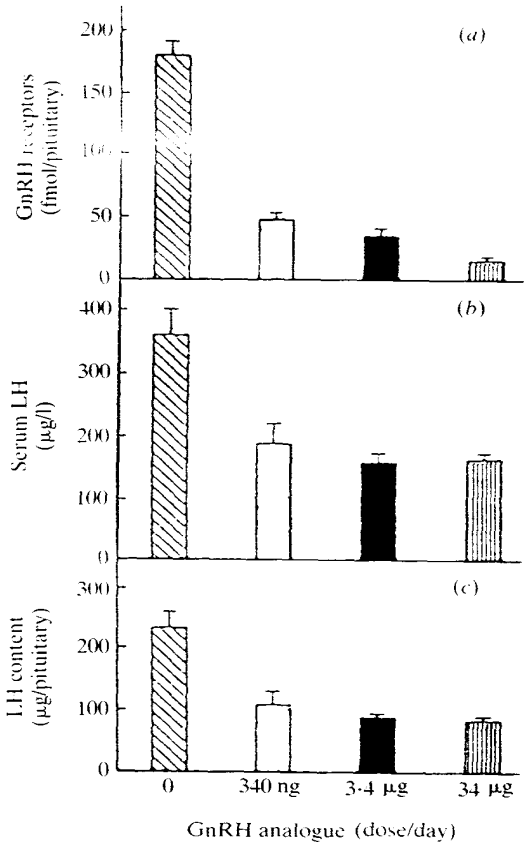


Figure 24 : Désensibilisation des cellules gonadotropes par un traitement continu à doses croissantes d'agonistes de la GnRH chez les rats mâles castrés. Après 6 jours de traitement, les hypophyses sont récupérées pour analyse de (a) la quantité de récepteurs à la GnRH, (b) LH sérique, (c) quantité de LH contenue dans l'hypophyse (Clayton, 1989).

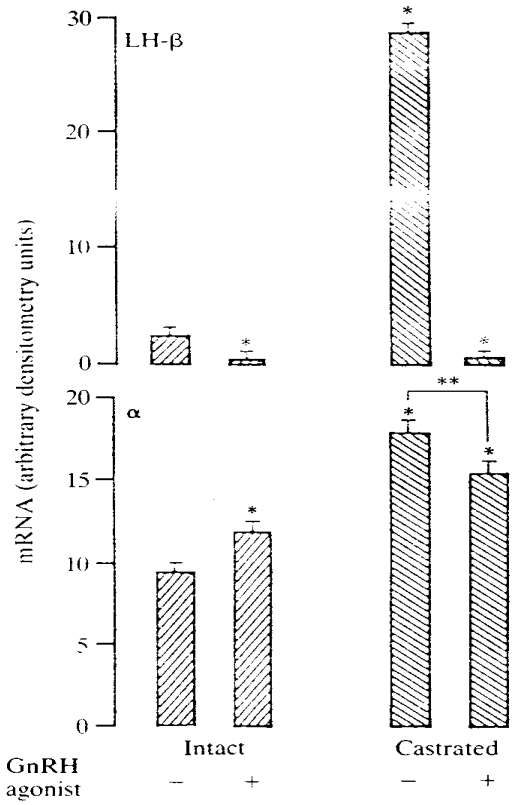


Figure 25 : Mesure des taux d'ARNm des sous unités de la LH dans les hypophyses de rats mâles castrés et non castrés après 28 jours de traitement avec un agoniste de la GnRH (Clayton, 1989).

D'après Shacham et al. (1999), il existe deux types de désensibilisation : une observée sur le long terme qui s'expliquerait par la diminution du nombre de récepteurs à la surface des cellules gonadotropes comme déjà proposée précédemment et une observée à court terme, en présence des récepteurs à la surface des cellules gonadotropes. Cette dernière désensibilisation s'expliquerait par deux mécanismes intracellulaires distincts en partie due à la conformation de l'extrémité C terminale originale de ce récepteur : d'une part ils confirment le phénomène de découplage de la protéine G des récepteurs cellulaires, phénomène qui peut apparaître en quelques minutes et d'autre part ils évoquent une forte diminution des récepteurs aux seconds messagers suivants dans la cascade d'activation intracellulaire, comme l'absence de récepteurs à l'IP3. Le bilan de leurs travaux leur montre néanmoins que la comparaison des mécanismes intracellulaires de différentes espèces du règne animal laisse sous-entendre une régulation plus ou

moins fine de la libération des gonadotrophines et donc une sensibilité variable à la désensibilisation.

L'équipe de Cassina et al. (1999) a étudié in vitro le comportement des trois boucles intracellulaires des récepteurs à sept domaines transmembranaires à la GnRH sous stimulation par un agoniste de synthèse pour explorer le phénomène de désensibilisation. Leurs hypothèses sont que ces trois boucles intracellulaires interagissent de façon différente avec le complexe protéine G et ses régulateurs récemment mis en évidence lorsque le récepteur est en présence d'un agoniste ou du décapeptide GnRH naturel. D'autre part, ils ont observé un dysfonctionnement de la protéine kinase C, mais non de la A, impliquée dans la cascade d'activation des cellules gonadotropes pour la libération des gonadotrophines. Le comportement particulier des trois boucles intracellulaires du récepteur couplé à un agoniste interviendrait en plus de la particularité de l'exprémité C terminale du récepteur dans le phénomène de désensibilisation lors d'interaction avec un agoniste. De plus, cette équipe montre la perturbation du fonctionnement de certains seconds messagers intracellulaires lorsque le récepteur est activé par un agoniste et non par la GnRH naturelle.

Les figures suivantes présentent un exemple de désensibilisation dans le cadre d'un essai clinique réalisé chez la femme. Cet essai utilise un agoniste de la GnRH injecté sous forme de microcapsules : D-Trp-6-GnRH (Decapeptyl CR®). L'injection a été réalisée au 3ème jour du cycle ovarien, phase folliculaire (Broekmans et al., 1993). On observe une réponse biphasique : pendant les 48 premières heures, les taux de LH et FSH augmentent avec un maximum 4h après l'injection puis une phase où les concentrations en LH et FSH sont maintenues à un faible niveau, c'est-à-dire la phase de désensibilisation proprement dite. Parallèlement, la concentration plasmatique en œstrogènes suit le même profil avec un maximum 12h post injection et ensuite une diminution jusqu'à des taux voisins de ceux d'une phase folliculaire normale (figure 26). La fréquence des pulses de LH montre d'abord une rapide augmentation puis une diminution jusqu'à la quasi absence de pulse à partir de la 48ème heure post injection (figure 27). De la quatrième à la septième semaine après l'injection de l'agoniste de la GnRH sous forme de microcapsules, les intervalles entre les pulses de LH augmentent, ces pulses diminuent en amplitude et le niveau du taux moyen de LH diminue fortement. Pendant cette même période, la réponse

de l'hypophyse à des administrations de GnRH est nulle. La restauration de la fréquence des pulses de LH d'avant injection et de la réponse de l'hypophyse à la GnRH n'est observée qu'au cours de la huitième à la neuvième semaine post injection (figure 28). A ce moment, l'œstradiol atteint des niveaux en rapport avec la période préovulatoire. L'ensemble de cette étude expose un type de désensibilisation in vivo et permet en plus de mettre en évidence la réversibilité de celle-ci. Ce type d'étude sera repris espèce par espèce dans la seconde partie de cette thèse.

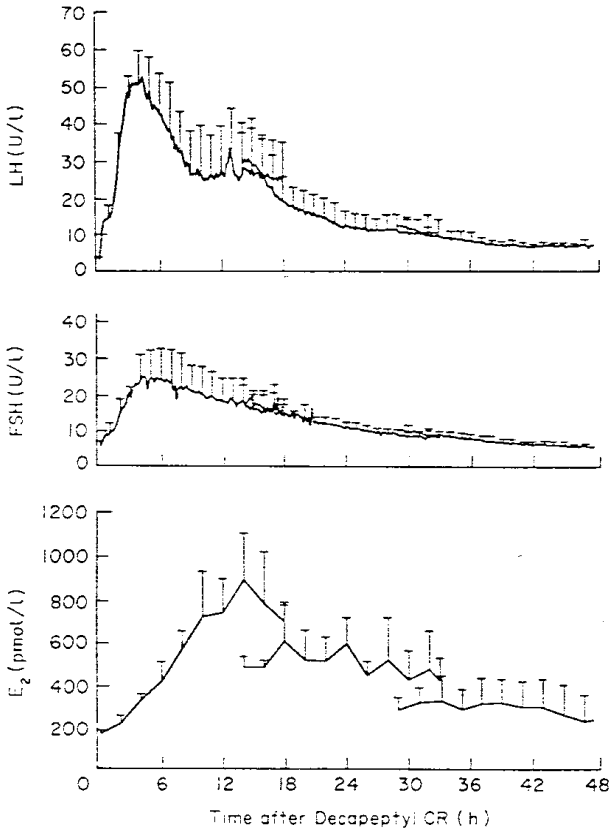


Figure 26 : Taux de LH, FSH et E2 obtenus dans 3 sous groupes (n=4) pendant les 48 premières heures post injection de Decapeptyl CR® chez la femme (Broekmans et al., 1993).

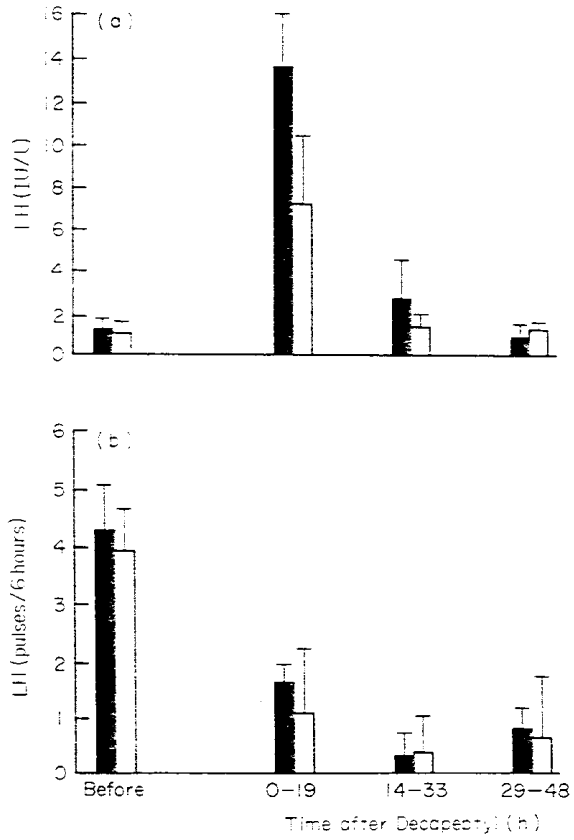


Figure 27 :

a. Amplitude des pulses de LH.

b. Fréquence des pulse de LH.

Avant et pendant les 48 premières heures suivant l'injection de Decapeptyl CR®. En barres pleines l'analyse des pulses selon la méthode de Scheele et Lambalk, en barres creuses selon Merriam et Watcher (Broekmans et al., 1993).

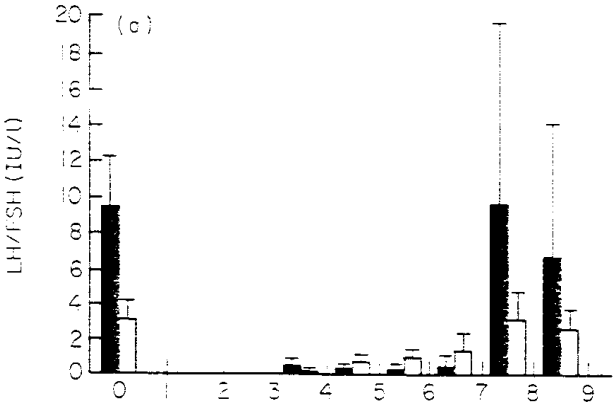


Figure 28 : Réponse en sécrétion de LH (barres pleines) et FSH (barres creuses) à la stimulation par 100µg de GnRH par voie intraveineuse avant et de la

semaine 4 à la semaine 9 après injection de Decapeptyl CR® (Broekmans et al., 1993).

2.Interactions des antagonistes

Les antagonistes de la GnRH bloquent les récepteurs des cellules gonadotropes par compétition avec les molécules de GnRH naturelles. Diverses explications ont été émises pour expliquer l'absence de signal activateur par les seconds messagers intracellulaires lorsque le récepteur à la GnRH est couplé à un antagoniste de cette hormone. Une des explications est que les antagonistes ne permettent pas la dimérisation des récepteurs. En effet, d'après certaines études, une distance critique comprise entre 15 et 150 angströms est nécessaire à la dimérisation et à la propagation du signal (Conn et al., 1982 ; Hazum et al., 1985). Mais pour certains, cette simple explication ne suffit pas et la réaction des récepteurs couplés aux antagonistes n'est pas encore élucidée. La mise en évidence de la diminution de la synthèse de récepteurs à la GnRH sur des tissus tumoraux soumis à un traitement par un antagoniste (CetrorelixND) a amené l'équipe de Kovacs et al. (2001) à étudier l'effet de cet antagoniste sur la synthèse des récepteurs à la GnRH des cellules gonadotropes. Leur étude a été réalisée en comparant l'effet d'une administration ponctuelle de l'antagoniste à celui d'un dépôt de celui-ci sur des rattes stérilisées ou non. Ils ont abouti aux résultats suivants (figure 29) :

-l'administration d'un antagoniste de la GnRH induit un premier effet d'inhibition de la libération de LH par l'hypophyse.

-puis ils ont observé une diminution de la concentration en LH dans les cellules gonadotropes (après quelques jours de traitement).

-en même temps, ils ont observé une diminution de la quantité d'ARNm des récepteurs à la GnRH dans les cellules gonadotropes.

L'explication de la diminution de la concentration intracellulaire en LH peut être la même que pour les agonistes. Moins ces cellules libèrent de gonadotrophines, moins elles en synthétisent (cet effet n'est observé que sur le long terme). La diminution de la synthèse par ces cellules des récepteurs à la GnRH a été expliquée par le fait que la GnRH naturelle stimule la synthèse de ses propres récepteurs sur les cellules gonadotropes. Ce mécanisme est en partie mis en jeu dans la réalisation

Rapport-Gratuit.com

de la décharge ovulante de LH, par un phénomène d'auto amplification. En présence d'antagonistes sur les récepteurs à la GnRH il n'y a plus cette stimulation de la synthèse. Ceci est confirmé par le fait que cette inhibition de la synthèse est moins marquée chez les rattes ovariectomisées chez lesquelles la concentration en GnRH est nettement supérieure à celle des femelles cyclées normales (Kovacs et al., 2001). L'action des antagonistes se réaliserait donc en plusieurs phases, une phase immédiate d'interruption du signal et d'absence de sécrétion de LH suivie d'une inhibition de la synthèse par les cellules gonadotropes des gonadotrophines et d'une diminution de la synthèse des récepteurs à la GnRH par ces mêmes cellules. La réversibilité de ce phénomène apparaît lorsque la quantité d'antagonistes décroît suffisamment du fait de leur métabolisme et permet par une compétition simple avec les récepteurs une interaction de la molécule naturelle avec ceux-ci. On observe alors à nouveau une stimulation physiologique par la GnRH naturelle de la synthèse de ses propres récepteurs. Ceci est suivi d'une restauration de la synthèse des gonadotrophines par les cellules de l'hypophyse.

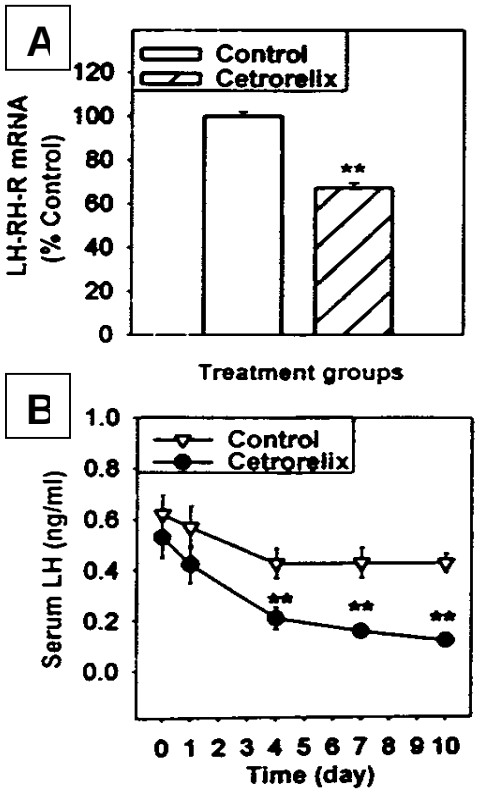


Figure 29 : Effets de l'administration chronique de Cetrorelix® chez des rattes non ovariectomisées pendant un traitment de 10 jours avec un dépôt de pamoate de Cetrorelix[ND] délivrant 100 µg d'antagoniste par jour, sur le taux d'ARNm des

récepteurs à la GnRH (A) et sur la concentration sérique en LH (B). Valeurs significativement différentes à **p<0,01 par rapport au témoins (Kovacs et al., 2001).

Comme le montrent les résultats de Pinski et al. (1993), la sécrétion de LH, de FSH et des stéroïdes sexuels peut être inhibée pendant 5 mois après une seule injection d'antagoniste SB-75 en microcapsules. Mais cette inhibition est totalement réversible sur la constitution et le fonctionnement des organes sexuels (Pinski et al., 1993 ; Bokser et al., 1991) et sur le rétablissement des concentrations hormonales originelles (figure 30).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

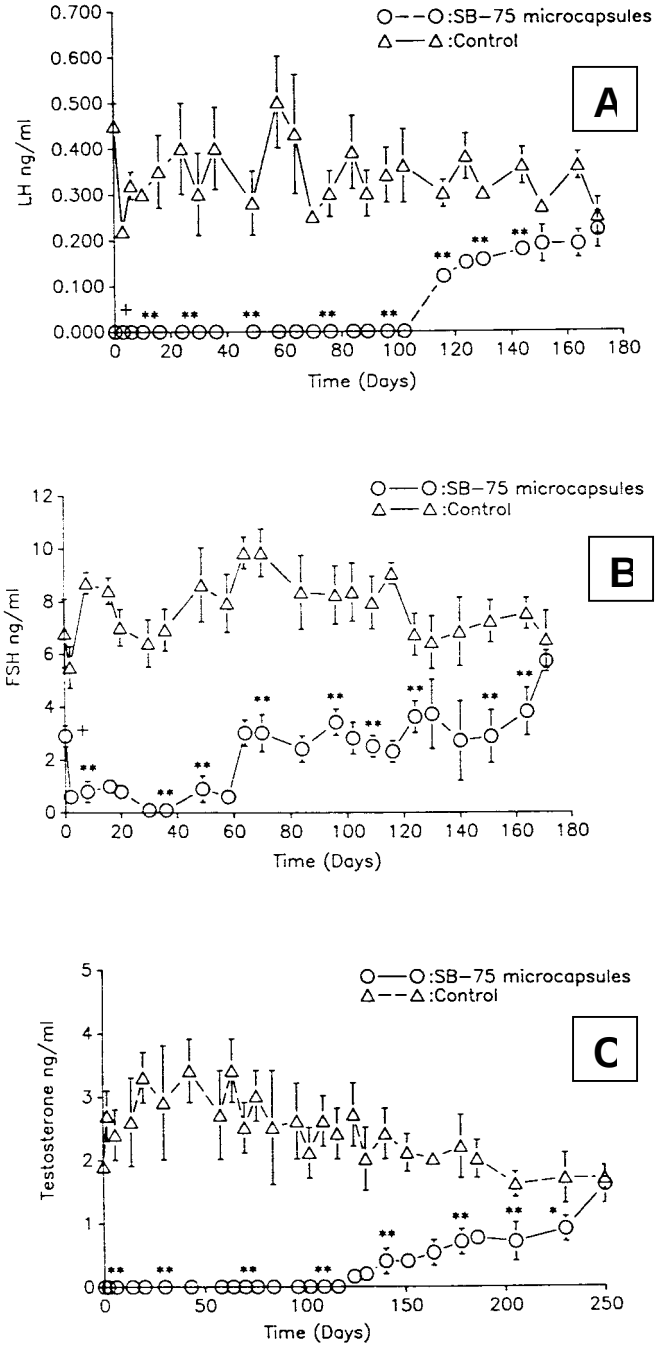


Figure 30 : Concentrations sériques en LH (A), FSH (B) et testostérone (C) chez des rats après une injection intramusculaire de 20 mg de microcapsules de SB-75, un antagoniste de la GnRH. *p<0.005 ; **p<0.001 par rapport aux témoins (control) (Pinski et al., 1993).

III.Intérêt des systèmes à diffusion continue des analogues de la GnRH.

A.Comparaison des effets biologiques de formes retards et non retards.

L'intérêt clinique des analogues de synthèse de la GnRH porte d'une part sur la possibilité d'intervenir avec ces molécules de façon ponctuelle, par des injections intramusculaires ou intraveineuses afin de modifier à des instants précis le déroulement des cycles ovariens chez diverses espèces, mais une part importante de leurs applications est basée sur leur présence sur une longue durée dans l'organisme. Le phénomène de désensibilisation observé par des traitements au long terme avec des agonistes et le maintien d'une inhibition continue par les antagonistes nécessite des concentrations plasmatiques soutenues pendant de longues périodes. Le maintien de telles concentrations nécessite soit des injections répétées de petites doses, soit des injections plus espacées de doses massives. Ces alternatives contraignantes ont ainsi favorisé le développement de microcapsules et microgranules renfermant le principe actif et permettant sa libération sur 1 voire 3 mois.

L'étude suivante compare l'utilisation de microcapsules et de microgranules contenant l'antagoniste SB-75 à des injections de cet antagoniste sous forme d'acétate (Pinski et al., 1992). Les formes retards sont constituées de 2 à 6 % de l'analogue de synthèse (SB-75) et de 94 à 98 % d'un polymère biodégradable (DL-lactide-co-glycolide). Le résultat de cette étude menée chez le rat, est qu'à doses d'antagonistes équivalentes (60 mg/rat de forme retard et 2,5 mg/rat d’acétate de SB-75 au moment de l'injection), la formulation sous forme retard (microgranule) permet une meilleure inhibition de la libération de LH, de testostérone et une plus forte diminution des fonctions sexuelles (figure 31 ; 32 ; 33). Cette formulation sous forme retard n'a aucun impact sur la réversibilité de l'inhibition (tableau VI). Par contre aucune différence significative n’a été observée sur les paramètres étudiés entre l’injection de microgranules et d’acétate de SB-75 à moitié de dose (30 mg/rat de microgranule en injection intramusculaire et 1,25 mg/rat d'acétate de SB-75 en injection sous cutanée) (Tableau VI).

Pour des doses adaptées, les formulations sous forme retard utilisant une matrice imprégnée du principe actif permettent une meilleure réponse de l'organisme

lorsqu'une inhibition de longue durée est souhaitée. Le premier effet de forte augmentation de la concentration circulante en antagoniste immédiatement suite à l'injection est lié à la présence de ce principe actif en surface des microcapsules ou microgranules et n'est pas considéré comme néfaste (figure 31). En effet les interactions entre les antagonistes et les récepteurs à la GnRH font que suite à une forte inhibition de départ mobilisant une grande quantité de récepteurs, une quantité plus faible d'antagonistes suffit à maintenir l'état d'inhibition.

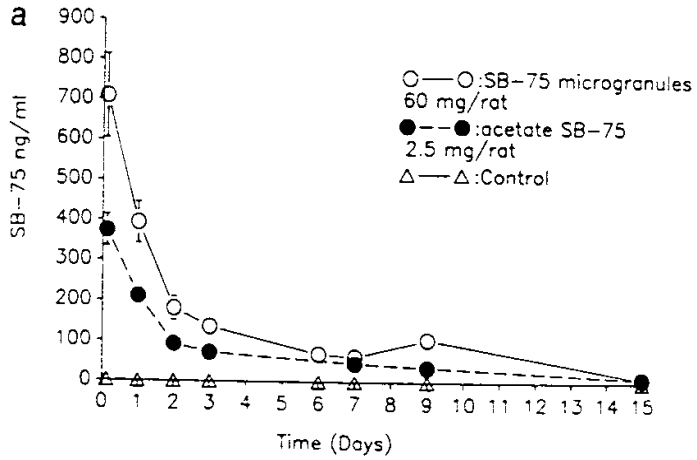


Figure 31 : Concentration sérique en SB-75 chez le rat de 3h à 15 jours après une injection intramusculaire de 60 mg/rat de microgranules de SB-75 et une injection sous cutanée de 2,5 mg/rat d'acétate de SB-75. Ces deux injections contiennent une quantité équivalente de principe actif SB-75 (Pinski et al., 1992).

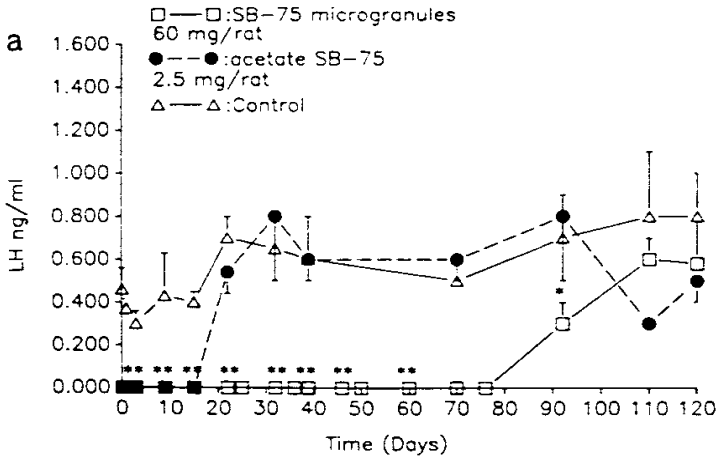


Figure 32 : Concentration sérique en LH chez le rat de 3h à 120 jours après une injection intramusculaire de 60 mg/rat de microgranules de SB-75 et une

injection sous cutanée de 2,5 mg/rat d'acétate de SB-75. Ces deux injections contiennent une quantité équivalente de principe actif SB-75. *p<0,05 ; **p<0.01 (Pinski et al., 1992).

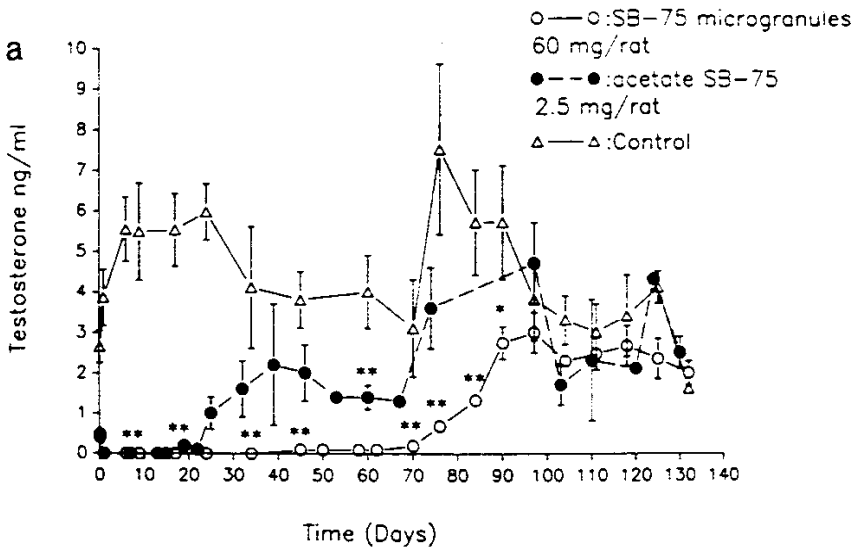


Figure 33 : Concentration sérique en testostérone chez le rat de 3h à 130 jours après une injection intramusculaire de 60 mg/rat de microgranules de SB-75 et une injection sous cutanée de 2,5 mg/rat d'acétate de SB-75. Ces deux injections contiennent une quantité équivalente du principe actif SB-75. *p<0.05 ; **p<0.01 par rapport au témoins (Pinski et al., 1992)

Tableau VI : Poids corporel, poids des testicules, de la prostate ventrale et des vésicules séminales chez des rats témoins et chez des rats traités avec l'antagoniste de la GnRH SB-75 sous forme encapsulée ou non, évalués 30 et 140 jours après injection (Pinski et al., 1992).

	Poids des testicules		Poids de la prostate ventrale		Poids des vésicules séminales	
	Jour 30	Jour 140	Jour 30	Jour 140	Jour 30	Jour 140
Témoins	3,5 +/-0,25	3,5 +/-0,14	0,7 +/-0,02	0,86 +/-0,1	1,3 +/-0,06	1,69 +/-1,38
60 mg de SB-75 en microgranules	0,5 +/-0,04§	3,17 +/-0,09	0,05 +/-0,01§	0,83 +/-0,08	0,2 +/-0,01§	1,5 +/-0,19
2,5 mg d'acétate de SB-75	1,49 +/-0,2§	3,45 +/-0,15	0,23 +/-0,03§	0,8 +/-0,08	0,48 +/-0,17§	1,8 +/-0,2
30 mg de SB-75 en microgranules	2,2 +/-0,3§	3,53 +/-0,2	0,34 +/-0,07§	0,7 +/-0,03	0,77 +/-0,1*	1,8 +/-0,03
1,25 mg d'acétate de SB-75	1,7 +/-0,14§	3,8 +/-0,08		0,8 +/-0,12	0,7 +/-0,14*	1,8 +/-0,18

*p<0,05 par rapport au témoin

§p<0,01 par rapport au témoin

B.Formes galéniques et comportement dans l’organisme des analogues de la GnRH sous forme encapsulée.

La mise au point des microsphères (ou microcapsules) contenant les analogues de synthèse de la GnRH a en partie débuté avec l'utilisation d'un agoniste de la GnRH de façon courante en clinique humaine, l'acétate de leuproréline. Le problème de ce nonapeptide est qu'il est stable dans l'eau, mais instable dans les liquides corporels et excrété rapidement. De façon à contourner ce désavantage, des préparations orales, rectales, nasales ou vaginales de ce principe actif ont été développées, mais les mauvaises efficacités de passage et la contrainte des administrations quotidiennes ont rendu ces produits peu pratiques à l'usage. Les principales affections ciblées par ce principe actif nécessitent des traitements au long terme, de l'ordre de plusieurs mois. Des microsphères délivrant l'agoniste pendant un ou trois mois ont été mises au point (Okada, 1997).

Les polymères biodégradables de PLGA (Poly Lactic/Glycolic Acid) et de PLA (Poly Lactic Acid) ont été utilisés pour leurs excellentes propriétés chimiques et biologiques, leur bonne biocompatibilité, leur absence d'immunogénicité, le contrôle facile de leur taux d'érosion biologique par sélection de leur poids moléculaire et de leur composition en copolymère, l'absence de résidus de catalyseurs métalliques et la bonne reproductibilité de leur synthèse. Ces propriétés avaient déjà été démontrées pour la synthèse de fils de suture utilisant ces polymères.

Le peptide contenu dans ces microsphères se libère en deux phases : une phase initiale de diffusion du peptide présent à la surface de la microsphère, une seconde phase pendant laquelle l'érosion de la structure du polymère libère le peptide qui y est emprisonné. Les microsphères mesurent en moyenne de 20 à 30 µm de diamètre, sont pratiquement sphériques. Elles sont constituées d'une matrice monolithique avec de nombreux pores et canaux visibles en surface (figure 34 et 35). Elles contiennent environ 8 % de l'analogue de la GnRH dans leur formulation. Leur injection se réalise à la seringue en utilisant une aiguille de 22 à 26 gauge sans besoin de faire une anesthésie locale. Après injection, les microsphères restent sur le site d'injection, présentent une bonne biocompatibilité et disparaissent après six semaines pour la forme dépôt de 1 mois et après 18 semaines pour la forme dépôt de trois mois. L'utilisation de ces formes dépôt permet de réduire de 1/4 à 1/8 la dose

effective de l'analogue nécessaire en cas d'injections parentérales répétées pour obtenir le même effet biologique. Une formulation commerciale est disponible sous forme de seringue à double chambre : l'une des chambres contient les microsphères et l'autre chambre contient le liquide qui sert de véhicule de dispersion, le mélange des deux chambres se faisant dans la seringue juste avant l'injection. Cette technique réduit le temps de préparation et assure une reconstitution aseptique (Okada, 1997).

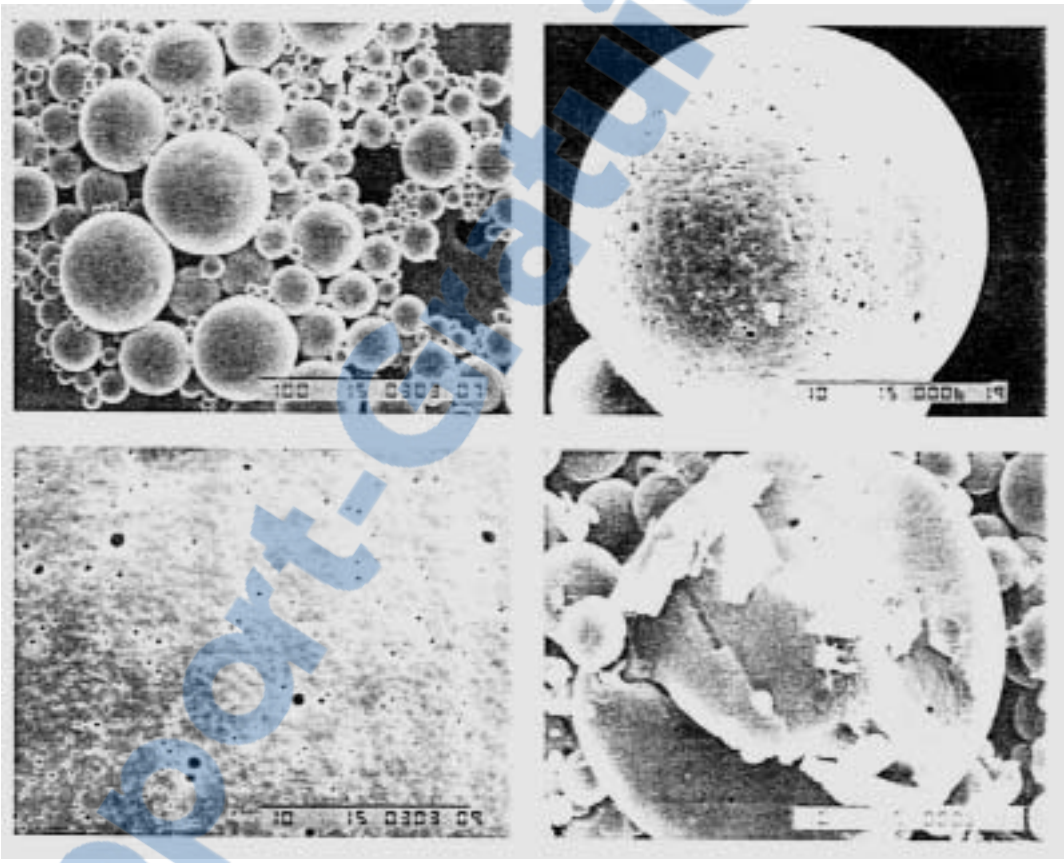


Figure 34 : Vues en microscopie électronique de la surface de microsphères de PLGA contenant de la leuproréline en formulation dépôt pour 1 mois (Lupron Dépôt®) (Okada, 1997).

Rapport-Gratuit.com

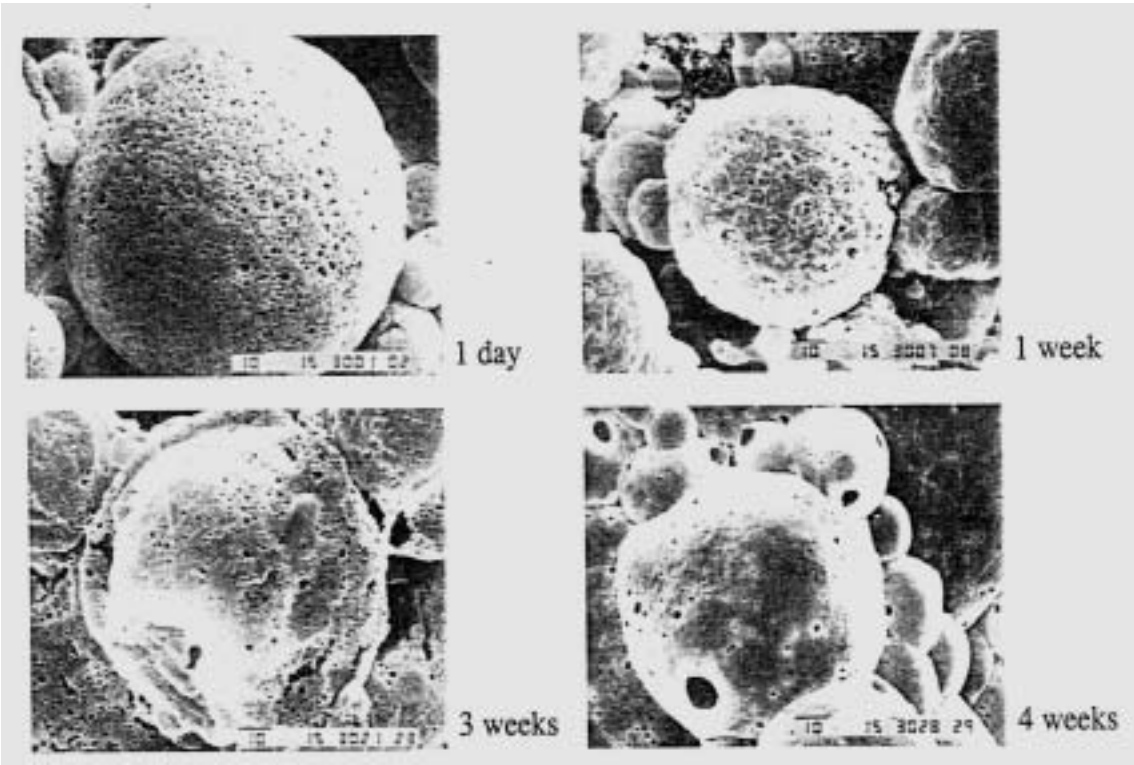


Figure 35 : Changements morphologiques des microsphères contenant la leuproréline pour un dépôt de 1 mois, observées in vitro à pH 7 sur tampon phosphate contenant 0.02% de Tween 80 à 37°C après 1 jour, 1, 2 et 3 semaines de conservation dans ce milieu (Okada, 1997).

Le mécanisme de libération des analogues de synthèse de la GnRH des microparticules injectées dans le muscle est variable. Outre les microsphères, des microgranules ont également été synthétisées pour contenir des analogues de la GnRH. Csernus et al. (1990) ont réalisé une étude comparative du comportement de microcapsules et de microgranules contenant l'agoniste D-Trp-6-LHRH ou l'antagoniste SB-75. Deux heures après injection de ces deux types d'implants, aucune modification histologique ni de modification de leur structure n'est visible. Un léger œdème commence à apparaître et vingt-quatre heures après l'injection, une réaction inflammatoire est présente avec infiltration de lymphocytes et regroupements d'histiocytes. Cette réaction est plus ou moins intense en fonction des dommages infligés aux fibres musculaires au cours de l'injection. En plus de l'accumulation de cellules inflammatoires, la formation d'une réaction fibreuse en périphérie des microparticules apparaît ; dans le même temps, la biodégradation du polymère est visible sous forme de vacuoles à l'intérieur de la matrice. Deux jours

après injection, des fibroblastes entourent les microparticules et l'inflammation est généralement réduite. Au quatrième jour, la réaction inflammatoire aiguë a disparu au voisinage des microparticules, mais une réaction de type corps étranger avec cellules géantes se forme. La dégradation du polymère apparaît plus importante à l'intérieur même des particules par la formation de vacuoles qu'à la périphérie. Une des explications est la mise en évidence de macrophages à l'intérieur même des microparticules qui entretiendraient leur dégradation (figure 36).

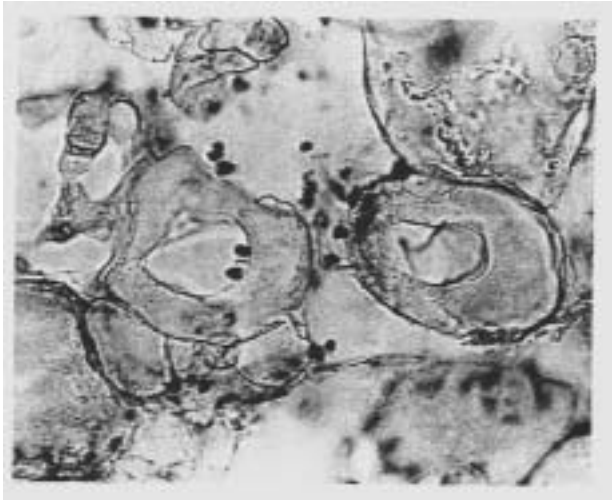


Figure 36 : Macrophages au centre de la microcapsule 4 jours après l'injection X341 (Csernus al., 1990).

Une semaine après l'injection, la dégradation des particules n'est pas uniforme ; la réaction inflammatoire est faible mais la réaction de type corps étranger avec cellules géantes est toujours présente. Il n'y a pas de différence dans la chronologie et le mode de dégradation des microparticules lorsque celles-ci contiennent l'agoniste ou l'antagoniste de la GnRH. Trois semaines après injection, la résorption des microparticules est quasiment complète et le tissu conjonctif qui les entourait est déjà en cours de régression.

Le premier effet de relarguage massif du principe actif dans les premières heures suivant l'injection a pu être réduit en réalisant un lavage des microparticules juste avant l'injection. Ce premier pic serait donc le fait de la quantité de principe actif en surface des microparticules synthétisées. La diminution de la libération du principe actif est plus rapide avec les microcapsules qu'avec les microgranules. Mais la comparaison est difficile à réaliser car les microgranules synthétisés sont moins

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

concentrés en principe actif que les microcapsules et de tailles hétérogènes alors que les microcapsules sont morphologiquement plus uniformes et plus concentrées. Cette légère différence n'affecte pas de façon majeure la libération des principes actifs ni l'effet biologique observé. Il a aussi été constaté une réaction de type corps étranger avec cellules géantes plus importante pour les microgranules que pour les microcapsules, sans que cette différence n’ait été expliquée.

Au vu des observations microscopiques, il apparaît que la diffusion du principe actif ne se ferait pas comme initialement supposé par les pores présents à la surface des microparticules injectées, mais plutôt par la dégradation de la matrice de polymères qui constituent les particules. Cette dégradation est réalisée en périphérie des particules injectées par l'ensemble des cellules du système macrophagique, mais aussi à l'intérieur même du polymère par l'invasion de celui-ci par les macrophages.

La réaction de type corps étranger avec cellules géantes en périphérie des microparticules pourrait diminuer la première phase de libération massive du principe actif, l'étaler dans le temps. Ce phénomène a en partie été observé suite à l'injection des microgranules.

Les auteurs retiennent de leur étude que le taux de libération du principe actif de leurs polymères biodégradables est contrôlé principalement par :

-les caractéristiques physico-chimiques de la matrice du polymère utilisé.

-l'intensité des réactions tissulaires, particulièrement celle des macrophages qui régulerait la vitesse de dégradation.

-les barrières biologiques entourant les particules qui moduleraient la diffusion du principe actif : importance de la formation du tissu conjonctif et importance de la réaction de type corps étranger avec cellules géantes.

DEUXIEME PARTIE

APPLICATIONS ACTUELLES ET ENVISAGEES DES ANALOGUES DE LA GnRH EN ADMINISTRATION CHRONIQUE CHEZ L'HOMME ET L'ANIMAL.

I.Utilisations des analogues de la GnRH en système longue action en médecine humaine.

Dans cette partie nous évoquerons l'utilisation pratique des analogues de la GnRH en médecine humaine. Cette étude sur l'espèce humaine se justifie par le fait que celle-ci constitue actuellement la seule pour laquelle on dispose de différentes spécialités disposant d'une A.M.M. et d'une expérience au long terme des cliniciens utilisant les principes actifs.

A.Maîtrise de la reproduction

1.Protocoles de fécondation in vitro et de transfert embryonnaire

Dans de tels protocoles, le but recherché est de déclencher l'ovulation de la femme donneuse d'ovocytes de la façon la plus précise possible. La possibilité d'inhiber totalement la décharge endogène, ovulante de LH par les analogues de la GnRH a été fortement utilisée.

Les premiers analogues de la GnRH utilisés dans les programmes de fécondation in vitro ont été les agonistes sous formes d'injections quotidiennes ou d'injections de microcapsules. Le but du traitement était d'obtenir une inhibition totale de l'axe hypothalamo-hypophysaire afin de prévenir l'apparition du pic de LH et de provoquer celui-ci par une injection de hCG (Schally et al., 1997). Mais plus récemment un protocole plus efficace utilisant un antagoniste de la GnRH, Cetrorelix®, a permis d'obtenir de meilleurs résultats (Olivennes et al., 1994). Ce

protocole débute par une stimulation ovarienne par injections quotidiennes de 225 UI de hMG (human Menopausal Gonadotropin, gonadotrophine à activité FSH dominante) pour stimuler la folliculogenèse à partir du deuxième jour du cycle menstruel. L'antagoniste est administré en injection sous cutanée à la dose de 5 mg par patiente dès que la concentration en œstradiol circulante est comprise entre 530 et 700 pmol/L par follicule de diamètre supérieur à 14 mm. Une seconde injection est réalisée 48 h après. La maturation folliculaire est contrôlée quotidiennement par échographie et par dosage des œstrogènes, progestérone, LH et FSH du 7e jour du cycle jusqu'à six jours après la dernière administration de l'antagoniste. Le déclenchement de l'ovulation est réalisé avec l'injection de 10 000 UI de hCG et décidé lorsqu'on a observé des follicules de 18 à 20 mm avec des valeurs d'oestradiol 17 béta >920 pmol/L/follicule. Le recueil des ovocytes est réalisé 36 à 40 heures après par voie vaginale sous guidage échographique. Les ovocytes sont fécondés 3 à 5 heures après avec 4000 spermatozoïdes mobiles par ovocyte. Le transfert est réalisé quarante-huit heures après le recueil des ovocytes par cathétérisme du col utérin. La phase lutéale est en partie assurée par l'administration quotidienne intravaginale de 300 mg de progestérone micronisée et démarre quatre jours après l'injection de hCG (figure 37).

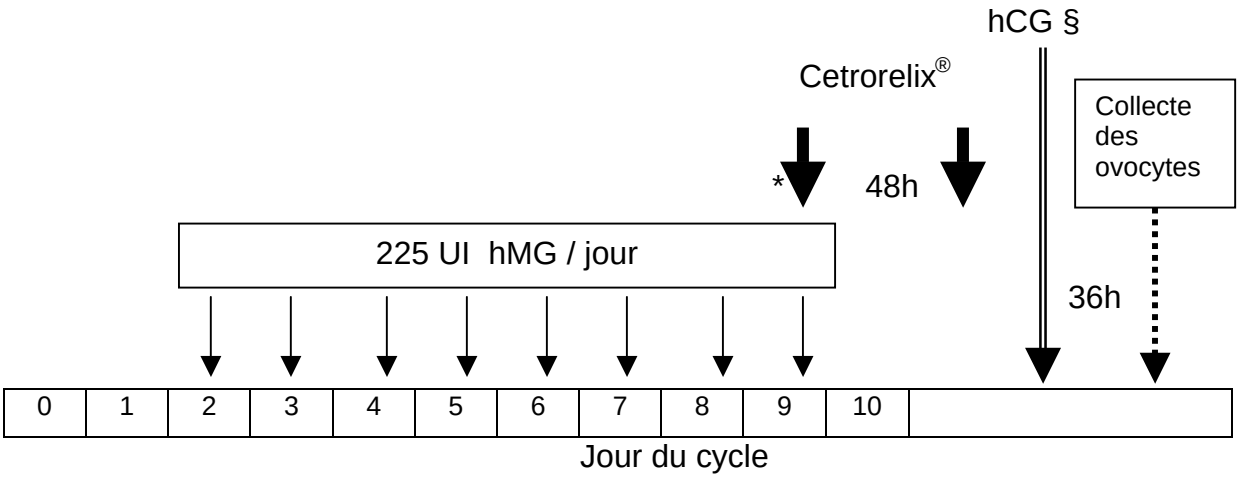


Figure 37 : Protocole de fécondation in vitro et de transfert embryonnaire utilisant le Cetrorelix® (Olivennes et al., 1994)

(*) concentration en œstradiol comprise entre 530 et 700 pmol/L/follicule>14 mm de diamètre.

(§) injection de 10000 UI d'hCG quand le follicule dominant atteint un diamètre supérieur à 18-20 mm et quand la concentration en œstradiol est supérieure à 920 pmol/L/follicule.

L'usage des antagonistes permet notamment de gagner du temps dans le protocole de synchronisation puisque l'on s'affranchit totalement du temps nécessaire à la désensibilisation de hypophyse par les agonistes. D'autre part, la dose de hCG nécessaire est nettement moindre avec les antagonistes. Le protocole mis au point par Olivennes et al. (1994) sur 17 patientes candidates pour un protocole de fécondation in vitro a été encourageant. Ce protocole, utilisant une ou deux injections d'antagonistes, a permis dans tous les cas de prévenir une décharge de LH. La tolérance au produit a été excellente ainsi que le taux de grossesse qui ne diffère pas de celui obtenu avec les agonistes (tableau VII).

Cependant, Hernandez (2000) a récemment lancé un débat sur l'utilisation des antagonistes en médecine humaine en remplacement des agonistes dans les protocoles de traitement. Il affirme que les connaissances sont actuellement insuffisantes sur les effets des antagonistes de la GnRH sur le déroulement des cycles cellulaires, au vu des résultats observés sur les cellules tumorales. Pour lui, leur intégration dans les protocoles de reproduction assistée doit attendre la mise en

évidence d'une dose minimale efficace sans effet sur les divisions et différenciations cellulaires. Les risques d'observer des perturbations de l'organogenèse seraient importants car la molécule est encore présente dans l'organisme maternel à des concentrations non négligeables au début du développement embryonnaire.

Tableau VII : Résultats de fécondation in vitro et de transferts embryonnaires d'un protocole utilisant un antagoniste et d'un autre utilisant un agoniste de la GnRH (Olivennes et al., 1994).

	Antagoniste	Agoniste*
Ampoules d'hMG utilisées §	27,7+/-4,2 §§	38,3+/-15,4
Ovocytes §	7,1+/-3,5	8,4+/-5,2
Embryons §	6,1+/-3,9	6,0+/-4,2
Taux de fécondation (en %)	85,9	71,1
Embryons transférés §	2,6+/-0,8	2,6+/-0,8
Cycles	17	144
Transferts	16	131
Grossesses cliniques	6	48
Grossesses cliniques/cycle (%)	35,3	33,3
Grossesses cliniques/transfert (%)	37,5	36,6
Grossesses maintenues	4	38
Grossesses maintenues/transfert (%)	25,0	29,0

*Traitement avec un agoniste longue action administré au début de la phase folliculaire et avec 300 UI/jour d'hMG après le début de la désensibilisation (données non publiées).

§Valeurs moyennes +/-SD

§§ Significativement différent des femmes ayant reçu le traitement avec l'agoniste de la GnRH, P<0.001.

2.Méthodes de contraception chez l'homme et la femme.

Depuis la démonstration que l'effet inhibiteur des analogues de la GnRH est réversible, différentes équipes ont tenté de développer de nouvelles méthodes de

contraception basées sur l'utilisation des agonistes et des antagonistes de la GnRH. L'utilisation sous forme d'injections répétées, sous cutanées ou d'administration intranasale de busséréline ou de nafaréline a été testée chez des femmes normalement cyclées. Ces traitements ont inhibé les ovulations et aucune grossesse n'a été observée (Berquist et al., 1979 ; Gudmundsson et al., 1984). Cependant l'utilisation à long terme de ces principes actifs doit être évalué pour les effets d'amenorrhée et d'ostéoporose par hypoœstrogénisme qu'ils provoquent.

Les antagonistes de la GnRH ont été étudiés dans le but d'inhiber l'ovulation. Un protocole à base d'injection intramusculaire a été développé et s'est révélé concluant, mais la précision des dates d'injection dans le cycle menstruel le rend peu pratique (Zarate et al., 1981).

Les agonistes et antagonistes ont également été testés afin de réduire la fertilité chez l'homme. Les traitements à base d'agonistes se sont révélés inefficaces car incapables d'induire une azoospermie suffisante, sûrement liée au fait que la sécrétion de FSH n'est pas totalement inhibée (Behre et al., 1992). Une autre approche basée sur un antagoniste (Cetrorelix®) couplée à un traitement à base de testostérone s'est avérée plus concluante en permettant d'obtenir une azoospermie plus prononcée (Behre et al., 1997). Mais à l'heure actuelle ces traitements se révèlent peu pratiques et très contraignants.

B.Intervention dans des traitements d’affections concernant les organes génitaux et le pancréas.

1.Polykystose ovarienne

Les agonistes de la GnRH sont utilisés depuis plus de dix ans dans le traitement de l'infertilité due au syndrome des ovaires polykystiques. L'administration des agonistes interfère avec les sécrétions anormales de gonadotrophines caractérisées par un taux trop élevé de LH et un taux normal ou trop bas de FSH, associé avec un hyperandrogénisme et une absence d'ovulation. Ce traitement permet de supprimer totalement la sécrétion des gonadotrophines et de synchroniser les cycles avec l'apport de LH et FSH exogènes ou une administration pulsatile de GnRH. L'équipe de Homburg et al. (1993) a mis en évidence le bénéfice apporté par l'administration d'un agoniste en microcapsules dans l'amélioration du taux de grossesse de femmes atteintes du syndrome des ovaires polykystiques. La synchronisation de l'ovulation en utilisant simplement des gonadotrophines aboutissait à un taux d'échec de 39,4 %. En ajoutant aux traitements une injection de microcapsules d'agoniste de la GnRH (Decapeptyl®), ce taux d'échec est passé à 16,7 %. Le taux de réussite en grossesses est passé de 17,6 % sans traitement avec agonistes à 39,1 % avec agonistes et le taux de naissance est passé de 26 % à 64 %. Cette étude reposant sur le traitement de 239 femmes atteintes du syndrome des ovaires polykystiques a mis en évidence le gain important apporté par les systèmes à distribution continue des agonistes en plus du traitement habituel pour obtenir une grossesse.

L'équipe de Hayes et al. (1998) a montré sur un essai clinique utilisant des administrations d’antagonistes de la GnRH une suppression des concentrations de LH, de FSH et de testostérone chez des femmes atteintes du syndrome des ovaires polykystiques. La suppression du taux de FSH a été inférieure à celle du taux de LH. Ceci en plus de l'effet inhibiteur immédiat des antagonistes ferait de ceux-ci des principes actifs plus avantageux que les agonistes dans le traitement de cette affection (Schally, 1999a).

2.Puberté précoce

L'efficacité des agonistes de la GnRH dans l'inhibition de l'axe hypophyso-gonadique et dans la réduction de la sécrétion des gonadotrophines et des stéroïdes sexuels chez l'enfant atteint de puberté précoce d'origine centrale a été rapportée par différentes équipes. Ces traitements permettent un arrêt du développement sexuel, une diminution de la maturation squelettique permettant une croissance harmonieuse, le tout sans effets indésirables majeurs. Ce traitement s'avère plus efficace que le précédent à base de progestérone et d'androgènes qui se révélaient sans efficacité sur la maturation osseuse (Marcondes et al., 1993). Les travaux de l'équipe de Marcondes et al. (1993) ont montré l'efficacité des agonistes de la GnRH sous forme de microcapsules et le confort d'un tel traitement pour les patients, mais ils ont mis en évidence un phénomène d'échappement après un an de traitement. Cet échappement s'est traduit par une augmentation inexpliquée des taux de FSH et LH chez quelques patients de leur étude.

L'utilisation des antagonistes n'a pas encore été testée dans les cas de puberté précoce d'origine centrale, mais au vu des avantages de ces principes actifs, ceux-ci seront certainement testés à l'avenir (Schally, 1999a).

3.Endométriose

L'endométriose est une affection relativement fréquente en médecine humaine. Elle correspond à une persistance, voire une extension de tissu endométrial ectopique, dépendant principalement d'une stimulation par les œstrogènes. Une des orientations thérapeutiques est d'induire un état d'hypoœstrogénisme par l'administration d'agoniste de la GnRH comme la buséreline, Decapeptyl®, ou de la nafaréline par voie intranasale (Zorn et al., 1986 ; Lemay et Quesnel, 1982). La plupart des patientes atteintes témoignent d'une diminution des symptômes un mois après le début du traitement. On observe une diminution des douleurs abdominales et une restauration de la fertilité. Dans l'étude

Rapport-Gratuit.com

de Zorn et al. (1986), cinquante femmes atteintes d'endométriose ont été traitées avec des microcapsules de D-Trp-6-LHRH sur une période de six à neuf mois. Une diminution des concentrations en œstradiol a été observée en moins d'un mois (figure 38). Toutes les patientes ont montré une amélioration clinique. Le principal effet secondaire communiqué a été la présence de bouffées de chaleur. La reprise d'une activité hypothalamo-hypophysaire et ovarienne normales a été observée chez toutes les patientes dans les quatre mois après la dernière injection de microcapsules. Sept des patientes ont réussi à avoir une grossesse.

Ces résultats nous montrent que l'utilisation des agonistes de la GnRH dans le traitement de l'endométriose est tout à fait adaptée et constitue une alternative intéressante face aux traitements progestatifs et à leurs effets secondaires. Cependant, les conséquences d'un état d'hypoœstrogénisme comme la baisse de densité osseuse qui apparaît après 3 à 6 mois de traitement constitue une limite à l'emploi des agonistes seuls. Une approche thérapeutique combinant des œstrogènes, des progestagènes et des agonistes permettrait de prolonger la durée du traitement en limitant les effets secondaires. D'autre part, la première phase de stimulation inhérente à un traitement au long terme utilisant des agonistes provoque parfois une aggravation transitoire de l'endométriose, voire des cas d'obstruction intestinale. L'utilisation des antagonistes de la GnRH éliminant cette première phase de stimulation non souhaitée dans le traitement serait intéressante dans les cas d'endométriose et reste à tester.

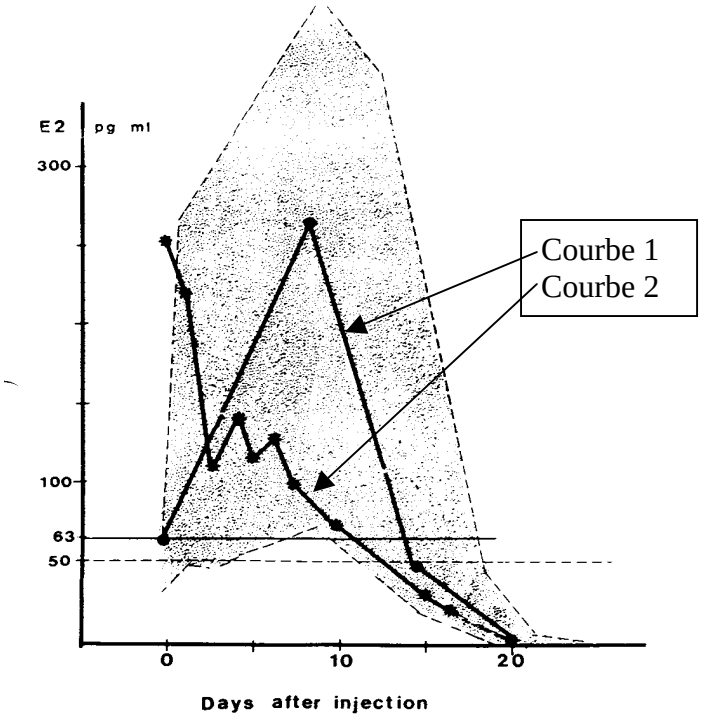


Figure 38 : Taux d'œstradiol après la première injection de D-Trp-6-LH-RH en microcapsules en fonction du temps en jours. L'aire grisée indique la plage de variation des valeurs des patientes 1 à 7. La courbe 1 représente la moyenne des valeurs. La courbe 2 représente les valeurs de la patiente 8 qui ne suit pas le profil moyen (Zorn et al., 1986).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

4.Hypertrophie bénigne de la prostate

Le syndrome d'hypertrophie bénigne de la prostate affecte un nombre important d'hommes de plus de 60 ans et s'accompagne souvent d'incontinence urinaire par obstruction. Le traitement standard de cette affection est chirurgical, mais de nombreux patients ne sont pas de bons candidats pour la prostatectomie. Un traitement non chirurgical est donc intéressant pour ces patients et peut consister en un traitement de première intention moins incommodant. Des traitements à base d'agonistes et d'antagonistes de la GnRH ont été étudiés. Il a été démontré qu'un traitement avec un agoniste de la GnRH (acétate de nafaréline), administré en injections quotidiennes, entraîne une diminution de la taille de la prostate (figure 39) et réduit les symptômes urinaires chez les hommes atteints d'hypertrophie bénigne de la prostate (Peters et al., 1987). Le même type de réaction de la prostate et de diminution des symptômes urinaires a été observé avec un autre agoniste, la leuproréline (Gabrilove et al., 1986). Cependant, après arrêt du traitement, les effets des analogues ont été réversibles chez tous les patients, les symptômes sont donc réapparus (figure 39).

Dans une autre étude, la réponse à l'antagoniste Cetrorelix® a été évaluée chez des patients atteints d'hypertrophie bénigne de la prostate (Gonzalez-Barcena et al., 1994). Le Cetrorelix® a été administré par voie sous cutanée à des doses de 500 µg toutes les douze heures pendant quatre semaines à 11 patients atteints d'hypertrophie bénigne de la prostate et présentant des signes d'obstruction des voies urinaires. Il y a eu une nette amélioration clinique après la première semaine de traitement. Le volume moyen de la prostate, contrôlé par échographie, a montré une diminution significative (figure 40). Chez quelques patients, la réduction du volume prostatique s'est maintenue pendant quelques mois après le traitement. Cette étude nous montre l'intérêt des antagonistes dans le traitement de cette affection, intérêt d'autant plus grand avec le développement de système à libération continue (implant) de Cetrorelix® pour faciliter le traitement.

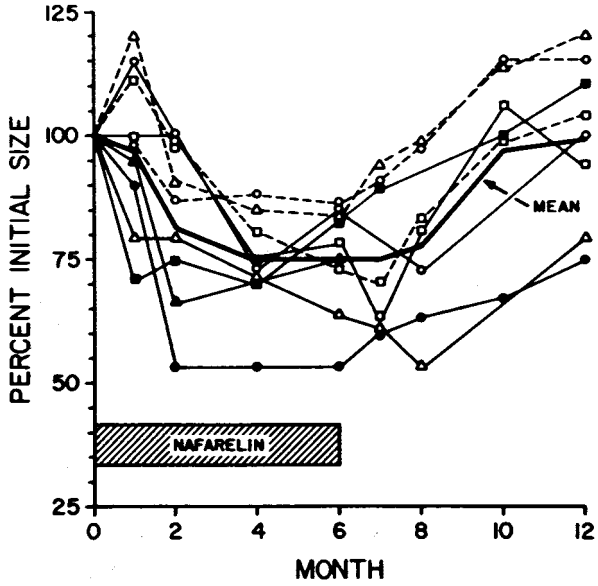


Figure 39 : Pourcentage de la taille initiale de la prostate en fonction du temps chez des patients atteints d'hypertrophie bénigne de la prostate et traités pendant 6 mois avec un agoniste de la GnRH (acétate de nafaréline) (Peters et al., 1987).

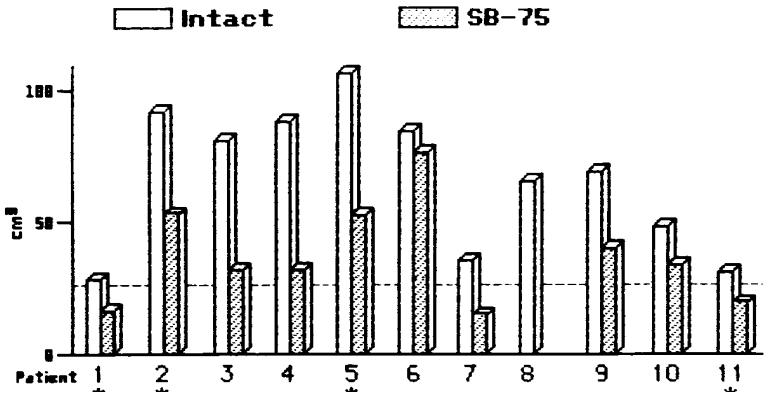


Figure 40 : Diminution du volume prostatique mesuré par échographie chez 11 patients atteints d'hypertrophie bénigne de la prostate après administration de 500 µg d'antagoniste SB-75 toutes les 12h pendant 4 semaines (Gonzalez-Barcena et al., 1994).

5.Tumeurs de la prostate

Le traitement des cancers avancés de la prostate est basé sur une suppression de la concentration plasmatique en androgènes. Une inhibition marquée de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire et des fonctions gonadiques suite à l'administration d'agoniste ou d'antagonistes de la GnRH permet une approche thérapeutique. L'efficacité du traitement palliatif avec des agonistes de la GnRH (Decapeptyl®) a été démontré par Tolis et al. (1982). Les traitements provoquent une chute des taux de testostérone et une amélioration marquée (subjective et objective) des patients atteints de carcinomes prostatiques de stade C ou D (figure 41).

Initialement, les agonistes étaient administrés par injections sous cutanées ou par administration intranasale. Puis ont été testé des dispositifs d'administration longue action sous forme de microcapsules permettant de délivrer l'agoniste sur une période de 30 jours.

L'étude comparative de Parmar et al. (1985) entre l'efficacité de la castration chirurgicale et l'injection d'agonistes sous forme de microcapsules s'est montrée en faveur du traitement médical par les agonistes. Ce traitement a permis d'obtenir une régression supérieure des symptômes comparée à la castration chirurgicale. Ces résultats font qu'actuellement dans 70 % des cas les agonistes de la GnRH constituent le traitement de première intention des tumeurs de la prostate (Schally, 1997).

L'utilisation plus récente des antagonistes permet d'éviter la première phase de stimulation et ainsi d'obtenir immédiatement un effet inhibiteur. Différentes études ont démontré l'efficacité du Cetrorelix®. L'amélioration clinique obtenue touche à la fois les symptômes urinaires, les douleurs osseuses, et les différents symptômes accompagnant le prostatisme (Gonzalez-Barcena et al., 1994). On observe une diminution des taux de PSA (antigènes spécifiques de la prostate), et dans certains cas une rémission des signes nerveux, des patients initialement paraplégiques retrouvant leurs facultés motrices. Les images de scanner obtenues montrent une diminution de l'invasion des métastases osseuses (Tolis et al., 1982). Le Cetrorelix® est donc, au vu de ces résultats, considéré actuellement comme un traitement de choix des tumeurs prostatiques avec métastases (Gonzalez-Barcena et al., 1994 ; Korkut et al., 1991 ; Schally et al., 1999b).

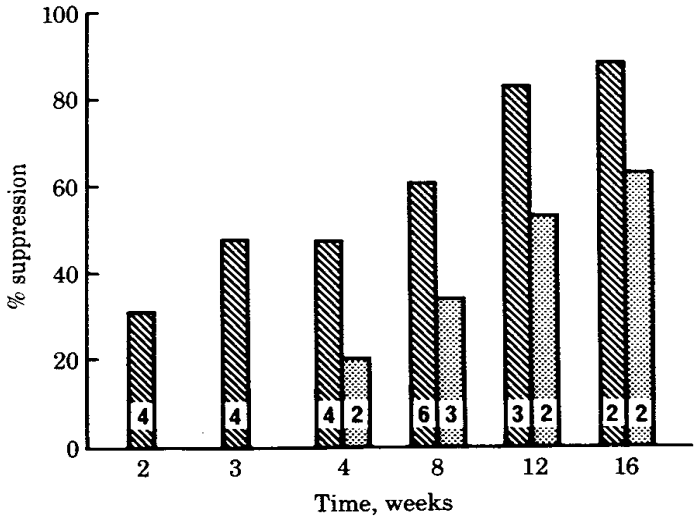


Figure 41 : Pourcentage de suppression des taux de phosphatases acide (en hachuré) et alcaline (en grisé) chez des patients atteints de carcinomes prostatiques de stades C et D pendant un traitement avec un analogue de la GnRH. Les chiffres à l'intérieur des colonnes sont les nombres de patients testés (Tolis et al., 1982).

6.Tumeurs utérines

Les leiomyomes utérins sont l'une des plus communes tumeurs du bassin et sont considérés comme œstrogèno-dépendants. De nombreux traitements utilisant les agonistes de la GnRH sous forme de dépôt, d'administrations intramusculaires ou intranasales se sont révélés efficaces en induisant après une première phase de stimulation, un état d'hypoœstrogénisme favorable à la diminution de volume de la tumeur (figure 42) permettant une exérèse chirurgicale plus efficace et plus rapide (tableau VIII)(George et al., 1989 ; Golan et al., 1993).

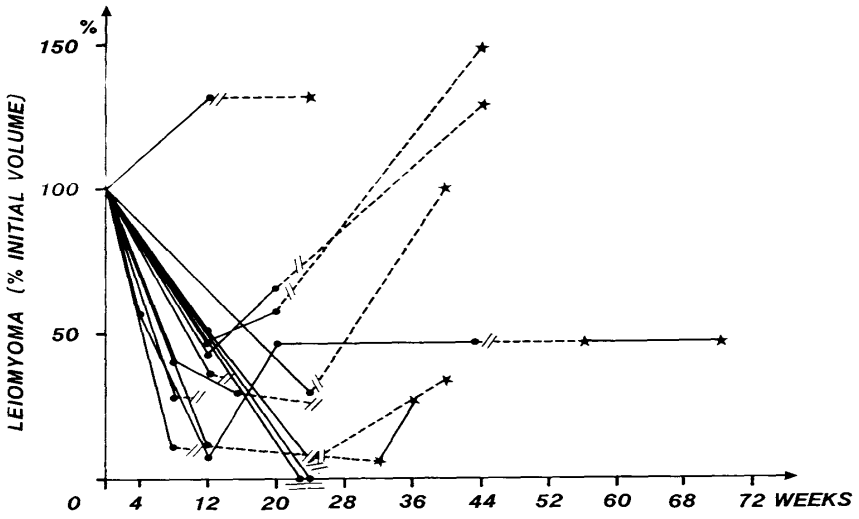


Figure 42 : Volume des leiomyomes utérins mesurés par échographie, exprimés en pourcentage de leur volume initial. (//) dernière injection de Decapeptyl®. Les cercles pleins indiquent le volume durant le traitement, les astérisques après arrêt du traitement (George et al., 1989).

Tableau VIII : Durée moyenne de l'intervention chirurgicale, pertes sanguines per opératoires, besoin de sang pour transfusion et durée d'hospitalisation

avec ou sans administration préalable d'un agoniste de la GnRH (Golan et al. 1993).

	Durée de l'intervention chirurgicale (minutes)	Pertes sanguines per opératoires (mL)	Patientes nécessitant une transfusion sanguine	Nombre de jours d'hospitalisation nécessaires
Groupe traité				
-HTA	[a]49+/-9	[b]208+/-64	[d]1/17 (6%)	6,3
-Myomectomie	80+/-42	[c]320+/-88	[d] 6/12 (50%)	7,9
Groupe témoin				
-HTA	[a] 70+/-34	[b] 309+/-81	[d] 3/15 (20%)	6
-Myomectomie	96+/-46	[c] 476+/-86	[d] 5/9 (56%)	7,3

Valeurs moyennes +/- SE

a,b,c différences significatives à p<0,05 ; test de Student

d différence significative à p<0,05 ; test de Fisher.

HTA = Hystérectomie transabdominale

Les bons résultats observés avec les agonistes ont été confirmés avec les antagonistes, ceux-ci permettant d'éliminer la première phase de stimulation des traitements aux agonistes de la GnRH (Kettel et al., 1993). Les travaux de l'équipe de Kettel sur l'utilisation de l'antagoniste de la GnRH en injections quotidiennes sur plus de deux semaines ont montré sur toutes les patientes une diminution significative de la taille de la tumeur après un mois de traitement. Une diminution de 50 % de la taille a été obtenue après quatre semaines de traitement, diminution qui a été maintenue tout au long du traitement. Les patientes ont exprimé des cycles menstruels normaux un mois après l'arrêt du traitement. Ces données confirment l'avenir des antagonistes de la GnRH dans le traitement de ces tumeurs bénignes de l'utérus. Ils constituent un traitement de première intention avec peu d'effets secondaires en vue d'assurer un traitement chirurgical avec moins de risques.

7.Cancer du sein.

Environ 30 % des cancers du sein sont des tumeurs hormono-dépendantes pour les œstrogènes. Elles sont généralement traitées avec des principes actifs anti œstrogènes comme le tamoxifène (Santen et al., 1990). De nombreux modèles de greffes de tumeurs mammaires humaines sur la souris ont montré l'efficacité des traitements basés sur les agonistes de la GnRH dans la diminution du volume tumoral initial et de celui des métastases (Redding et al., 1983), ainsi que dans la chimioprévention de l'apparition de ces tumeurs (figure 43) (Inada et al., 1996). Des essais cliniques sur des femmes atteintes avant et après ménopause ont été concluants. Les mauvais résultats des premiers essais où les agonistes étaient administrés par voie intraveineuse ou intranasale ont été expliqués par la mauvaise distribution des principes actifs par ces voies d'administration.

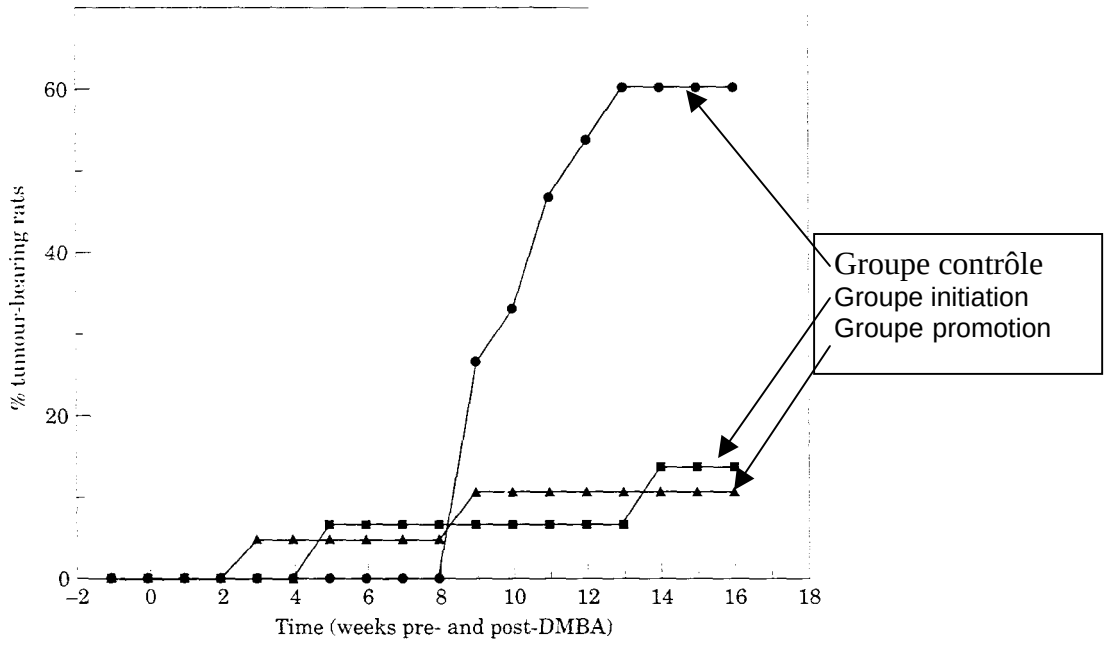


Figure 43 : Effet protecteur de l'acétate de leuprolide (agoniste de la GnRH) 10.02 465.4

L'effet des agonistes de la GnRH s'explique d'une part par la diminution de la concentration plasmatique en œstrogènes chez les patientes présentant des tumeurs mammaires exprimant des récepteurs aux œstrogènes. Mais un effet positif des agonistes a aussi été observé sur des tumeurs ne présentant pas de récepteurs aux œstrogènes ; l'existence de récepteurs à la GnRH sur ces tumeurs a été suspectée et permettrait d'expliquer un effet direct des agonistes de la GnRH sur le tissu tumoral (Mathé et al., 1987). Or différentes équipes ont mis en évidence ces récepteurs sur des tumeurs mammaires humaines (Fekete et al., 1989). Néanmoins, actuellement la principale explication de l'effet des agonistes est basée sur la diminution de la quantité d'œstrogènes circulants.

L'utilisation des antagonistes est actuellement limitée à des essais sur des souris greffées avec des tumeurs mammaires humaines. Les résultats de ces expérimentations sont très encourageants : on observe d'une part un effet indirect par induction d'un état d'hypoœstrogénisme et d'autre part l'effet direct des antagonistes sur les récepteurs mammaires à la GnRH. Ces études tendent à démontrer que la GnRH constitue l'un des principaux facteurs de croissance des tumeurs mammaires chez la femme et privilégient l'effet direct des antagonistes sur la tumeur (Srkalovic et al., 1989). Des essais cliniques restent maintenant à être réalisés pour confirmer les résultats obtenus sur les modèles animaux (Schally et al., 1997).

8.Tumeurs épithéliales de l'ovaire

Les tumeurs de l'ovaire sont hormono-dépendantes aux gonadotrophines. L'inhibition de la synthèse des gonadotrophines par l'hypophyse par un traitement utilisant les agonistes de la GnRH a été utilisée. Les résultats de ces études réalisées sur des tumeurs ovariennes humaines transplantées sur des souris sont sujet à des controverses quant à leur efficacité. L'équipe de Yano et al. (1994) a réalisé une étude comparative de l'effet d'un antagoniste et d'un agoniste de la GnRH sur la réduction du volume d'une tumeur ovarienne implantée chez la souris. Leur manipulation met en évidence la quasi-absence d'effet des agonistes, alors que

Rapport-Gratuit.com

les antagonistes sont efficaces par un effet indirect et direct sur la tumeur (figure 44). L'effet direct des antagonistes sur la tumeur est lié d'une part à leur interaction avec les récepteurs cellulaires à la GnRH et d'autre part au fait que les antagonistes entraînent une diminution du nombre des récepteurs cellulaires à d'autres facteurs de croissance de ces cellules tumorales tels que les récepteurs à l'IGF-I et l'EGF. Cette étude est confirmée par celle de Halmos et al. (2000) qui a mis en évidence une réduction de 70 % du nombre de récepteurs cellulaires à la GnRH après 21 jours de traitement avec un antagoniste (Cetrorelix®). Cette dernière étude met par ailleurs en évidence que la réduction du nombre de récepteurs membranaires s'accompagne d'une augmentation du nombre de récepteurs dans le noyau ; ce phénomène est peut-être relié avec une internalisation des récepteurs et une translocation de ceux-ci dans le noyau de ces cellules tumorales. Les antagonistes semblent donc plus indiqués dans l'éventuel futur traitement des tumeurs de l'ovaire.

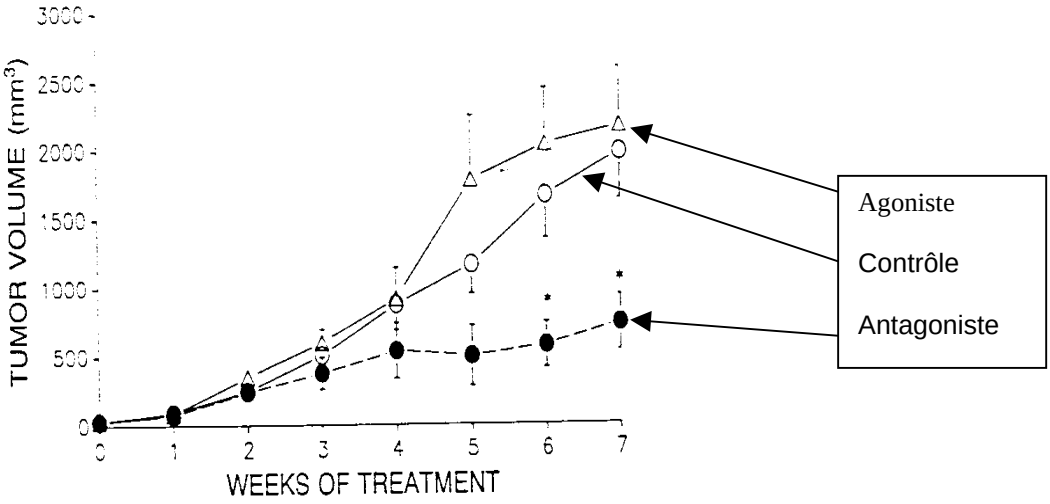


Figure 44 : Volume de tumeurs OV 1063 (cancer épithélial de l'ovaire humain) transplantées sur des souris Nude traitées avec l'antagoniste SB 75 ou l'agoniste D-Trp-6-LHRH en microcapsules injectables. *p<0,05 (Yano et al., 1994).

9.Tumeurs du pancréas.

Des récepteurs à la GnRH ont été mis en évidence sur des tumeurs humaines du pancréas. Différents essais ont été menés sur des greffes de ces tumeurs sur des souris Nude. Radulovic et al. (1993) ont mis en évidence un effet direct de l'antagoniste SB-75 comme inhibiteur de croissance de ces tumeurs. Ils ont en plus mis en évidence un effet synergique entre l'antagoniste SB-75 et l'analogue de la somatostatine RC160 dans l'inhibition du développement de la tumeur pancréatique étudiée.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

II.Utilisations envisagées des analogues de la GnRH en systèmes longue action en médecine vétérinaire

A.Chez les carnivores.

Les carnivores domestiques que nous allons étudier sont le chien et le chat. Ces deux espèces constituent actuellement une part importante de l'activité des vétérinaires praticiens, les motifs de consultation directement ou indirectement liés à la fonction de reproduction étant nombreux. L'approche médicale de ces animaux de compagnie est particulière et tient compte des rapports harmonieux qu'entretient l'animal avec son propriétaire du sevrage à la maturité sexuelle et jusqu'à la gériatrie. Les interventions que le vétérinaire est amené à réaliser sur ces animaux dans le domaine de la reproduction sont d'une part des interventions de convenance (maîtrise de la reproduction) et d'autre part, la gestion des affections cliniques des organes reproducteurs. Dans ce dernier cas, les similitudes entre médecine vétérinaire et humaine sont importantes.

Actuellement, aucune spécialité vétérinaire contenant un analogue de synthèse de la GnRH n'existe sous forme d'implant longue action. Néanmoins, de nombreux essais ont été réalisés dans l'espèce canine avec ce type de principes actifs, aussi bien dans les protocoles de reproduction assistée que pour le traitement d'affections cliniques des organes reproducteurs. Une partie de l’intérêt porté au chien est que l'espèce canine représente un modèle pour tester les pharmacocinétiques des spécialités utilisant les analogues de la GnRH chez l'homme, et que les affections prostatiques, fréquentes chez le chien, ont été utilisées comme modèle animal de ces affections chez l'homme.

Nous exposerons d'abord dans cette partie un rapide rappel des particularités de la fonction de reproduction chez le chien et le chat, les principales interventions de gestion de la reproduction dans ces espèces et leur avenir, les principales affections touchant les organes reproducteurs et pour lesquelles les analogues de la GnRH en implants longue action auraient un intérêt.

Nous aborderons ensuite les études pharmacologiques et pharmacocinétiques réalisées chez le chien avec les analogues de la GnRH.

Nous étudierons enfin les principaux travaux qui ont analysé les utilisations éventuelles des analogues de la GnRH en implants longue action chez les carnivores.

1.Rappels de physiologie et de médecine de la fonction de reproduction du chien et du chat

a.Chez le chien

La puberté du chien mâle apparaît en règle générale vers l'âge de six à huit mois, la qualité du sperme est au départ très moyenne et va en s'améliorant. Chez la chienne, les premières chaleurs apparaissent vers l'âge des huit à dix mois, mais ce n'est qu'au-delà de dix-huit mois que l'absence de chaleurs est considérée comme pathologique. Il n'existe pas de ménopause chez la chienne mais on observe des chaleurs de moins en moins exprimées et de plus en plus espacées dans le temps.

Le cycle de la chienne est monoœstrien saisonnier et dure en moyenne six mois en variant de quatre à douze mois, chez un même animal cette durée de cycle est constante. Les chaleurs de la chienne durent trois semaines et se caractérisent par des modifications organiques et comportementales de l'animal. En cas de fécondation, celles-ci sont suivies d'une gestation qui dure 63 +/- 2 jours. En l'absence de fécondation un état de métœstrus avec maintien du corps jaune pendant deux à quatre mois est systématiquement observé. Les profils hormonaux de la chienne en œstrogènes et progestérone présentent plusieurs particularités par rapport aux autres mammifères : on observe une lutéinisation préovulatoire et un maintien d'une concentration élevée en progestérone qu'il y ait gestation ou non dans les deux mois qui suivent les chaleurs (Brugère, 1998).

Les interventions du praticien qui pourraient faire intervenir les analogues de la GnRH en implants longue action sont toutes celles où l'on souhaite une inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysaire avec une suppression de la stéroïdogenèse et de la stimulation des différents organes reproducteurs.

Une des principales interventions concernées est la contraception mâle et femelle ou stérilisation chimique temporaire.

La réduction du comportement mâle accompagné d'agressivité peut aussi exploiter la réduction des concentrations circulantes en androgènes. Cette utilisation est envisagée chez les chiens et les carnivores sauvages en captivité.

Le traitement des affections tumorales hormono-dépendantes de l'appareil génital peut aussi nécessiter une telle inhibition. Dans l'espèce canine, les tumeurs considérées hormono-dépendantes sont les tumeurs de la vulve, du vagin, de l'utérus et de la mamelle chez la femelle et de la prostate chez le mâle. A cela se rajoute l'ensemble des affections des organes génitaux pour lesquelles une stérilisation temporaire constitue un traitement d'accompagnement, en cas de prostatite par exemple.

b.Chez le chat.

La puberté des chats apparaît à l'âge de 6 mois mais est fortement influencée par la saison et la race de l'animal. Elle apparaît plus précocement au printemps et plus tardivement en hiver pour un animal de même âge.

Le cycle ovarien de la femelle est polyœstrien saisonnier. Pendant une période de chaleurs tant qu'il n'y a pas de saillie, on observe une succession de maturations et d'atrésies folliculaires, les différences entre races sont là aussi importantes. L'ovulation est provoquée par la saillie et a lieu 24 à 48h après celle-ci et 24 à 48h après l'ovulation les chaleurs s'arrêtent.

Les interventions courantes en reproduction féline sont les stérilisations de convenance, définitives chirurgicales chez le mâle ou la femelle, ou temporaires chez la femelle, mais les protocoles médicaux actuels sont contraignants. Les tumeurs mammaires des chattes sont d'un pronostic plus sombre que chez la chienne car elles sont plus souvent métastasées.

2. Pharmacologie des analogues de la GnRH chez le chien.

Les études de pharmacologie que nous allons présenter ont toutes été réalisées chez le chien. Ces études n'ont pas été réalisées dans le but de la mise au point de spécialités incluant les analogues de la GnRH dans l'espèce canine, mais pour la médecine humaine. En effet, le chien constitue un modèle animal d'affections humaines et sert ainsi de test pour les futures spécialités de médecine humaine.

Dans le cadre de ces essais cliniques réalisés chez le chien, de récentes réserves ont été émises quant à la possibilité d'extrapoler les résultats obtenus dans l'espèce canine à l'espèce humaine. En effet, le comportement des récepteurs à la GnRH face aux antagonistes de la GnRH s'est révélé fortement différent entre l'espèce canine et l'espèce humaine. Ceci a amené l'équipe de Cui et al. (2000) à mettre en évidence par séquençage des récepteurs canins et humains à la GnRH que quelques substitutions d'acides aminés ont des conséquences importantes sur les valeurs des constantes de liaison. Le récepteur canin est à 92 % identique au récepteur humain mais le remplacement sur le récepteur humain de la Phe313 par la Leu313 du récepteur canin diminue d'un facteur 160 la constante d'affinité pour un même peptide antagoniste. Réciproquement, le remplacement de la Leu313 du récepteur canin par la Phe313 du récepteur humain entraîne une augmentation d'un facteur 360 de la constante d'affinité pour le même peptide antagoniste. Ces résultats mettent en évidence que bien que les récepteurs à la GnRH aient une séquence fortement conservée chez tous les mammifères, une simple modification d'un seul acide aminé entraîne de fortes modifications dans les éventuelles utilisations des analogues de la GnRH dans ces espèces. Ils pourraient expliquer les différences de résultats observés entre espèces pour un même principe actif. En ce qui concerne la médecine humaine, Cui et al. (2000) suggèrent qu'il serait nécessaire d'humaniser le récepteur canin à la GnRH pour obtenir une meilleure extrapolation des effets des analogues de la GnRH.

a.Pharmacologie des agonistes

De nombreuses études pharmacologiques ont mis en évidence que suite à une administration sous-cutanée ou intraveineuse d'un agoniste de la GnRH, le modèle pharmacologique retenu est un modèle bi compartimental ouvert (Hudon et al., 1997 ; Lacoste et al., 1990). Cette même équipe a également étudié le profil pharmacocinétique d'un agoniste de la GnRH, la météréline ([2-Me-D-Trp6, DesGly10]LHRH éthyl amide), contenu dans des bâtonnets de copolymères de *d,l*-lactide-glycolide à différents dosages. Leurs résultats sont les suivants : après une première phase de stimulation de la sécrétion de testostérone, on observe une phase d'inhibition obtenue dix jours après la mise en place de l'implant et maintenant des concentrations de 0,5 ng/mL ou 2 nmol/L en testostérone, c'est-à-dire des concentrations proches d'un état de castration. Ces concentrations sont maintenues en moyenne pendant 212 jours après la mise en place de l'implant dans le groupe dosé à 7 mg et pendant 247 jours pour le groupe dosé à 10 mg (figures 45 ; 46). Ce type d'implant permet donc de maintenir une concentration en testostérone proche des valeurs d'un état de castration pendant quatre à six mois en fonction du dosage de l'agoniste choisi. Dans ces deux groupes de dosages, les profils pharmacocinétiques sont de type biphasiques : une première phase de libération rapide de météréline avec des concentrations maximales obtenues au quatrième jour après implantation et une seconde augmentation de la libération obtenue entre 60 et 120 jours post implantation pour le groupe à 7 mg et 90 à 180 jours pour le groupe à 10 mg. La première forte libération est expliquée par la mise en circulation de l'agoniste présent à la surface des bâtonnets de l'implant. Suite à cette phase initiale l'agoniste est libéré à plus faibles concentrations par diffusion de celui-ci depuis l'intérieur des bâtonnets dont la matrice est progressivement détruite par les attaques de l'organisme. La seconde augmentation de libération de l'agoniste serait due à une attaque plus rapide de la matrice des bâtonnets, mais son mécanisme n'est pas complètement élucidé. L'agoniste est détecté (dans le sang) jusqu'au jour 153 pour le groupe à 7 mg et jusqu'au jour de 223 pour le groupe à 10 mg.(Hudon et al., 1997) (figures 45 ; 46).

L'inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysaire semble maintenue pendant les deux semaines suivant la disparition totale du principe actif dans l'organisme. Après cette période des concentrations normales en testostérone sont observées progressivement.

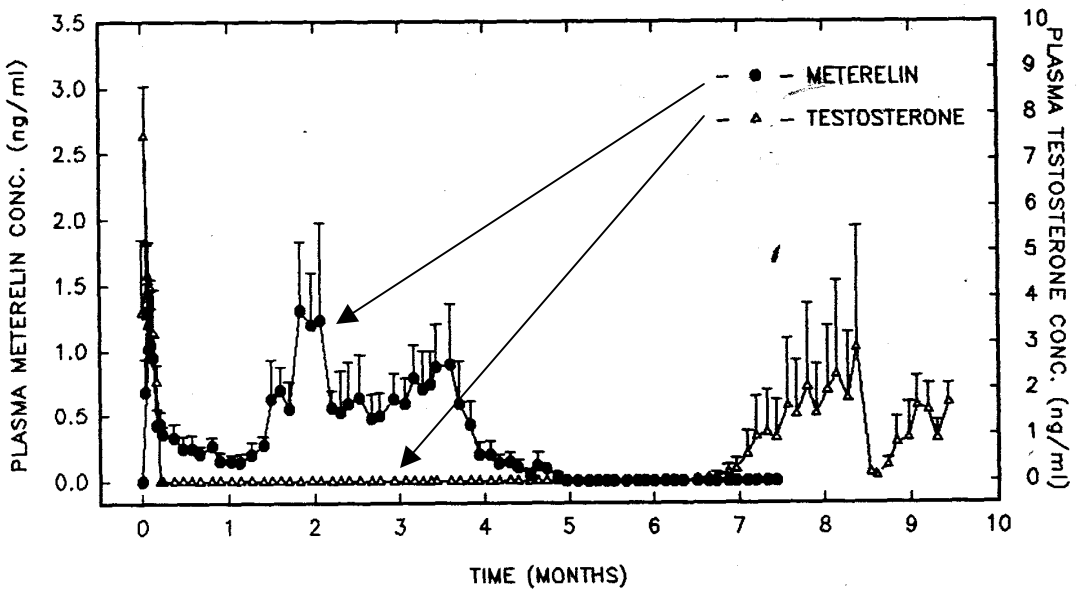


Figure 45 : Concentrations sériques moyennes en testostérone et météréline (agoniste GnRH) chez le chien après implantation de bâtonnets dosés à 7mg (Hudon et al., 1997).

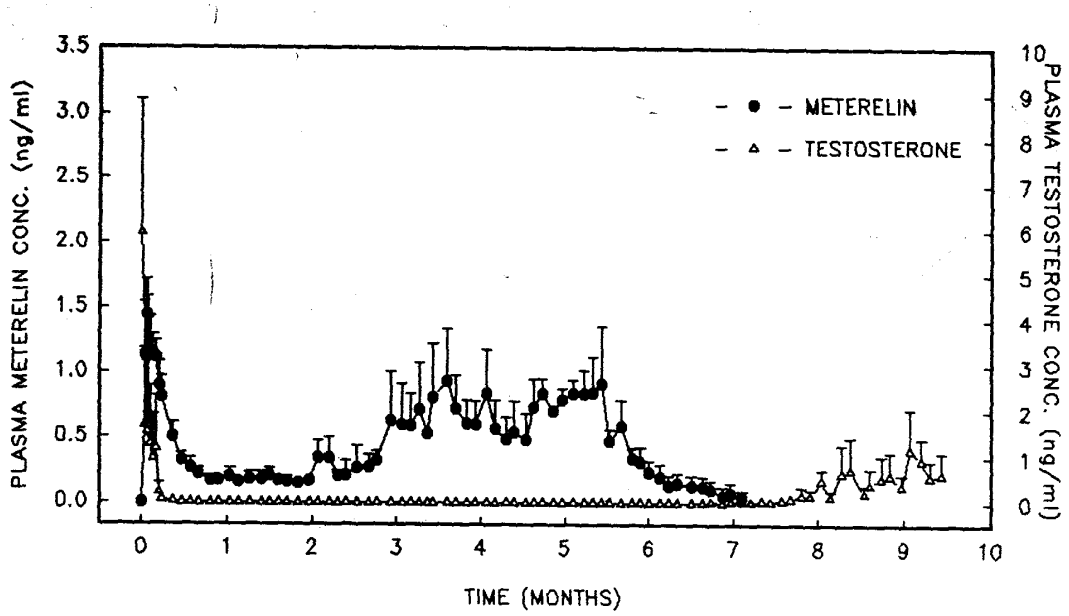


Figure 46 : Concentrations sériques moyennes en testostérone et météréline (agoniste de la GnRH) chez le chien après implantation de bâtonnets dosés à 10mg (Hudon et al., 1997).

Une autre étude menée par Qiu et al. (1999) sur l'évaluation de l'absorption sublinguale d'un agoniste de la GnRH, le leuprolide (5-Oxo-Pro-His-Trp-Ser-Tyr-D-

Leu-Arg-Pro-éthylamide acétate) montre d'intéressantes différences entre espèces. En vue de trouver un bon modèle animal pour ce type de spécialité, ils ont comparé l'absorption sublinguale de l'agoniste chez le chien, le singe et l'homme. La voie sublinguale a été choisie car elle permet une administration fréquente par le patient sans recours à l'injection et du fait qu'actuellement il n'existe pas d'agoniste de la GnRH suffisamment stable dans le tube digestif pour être administré per os. Leurs résultats montrent que le chien présente une excellente absorption sublinguale du principe actif par rapport aux deux autres espèces (figure 47).

La mise au point de spécialités sublinguales pourrait donc être intéressante chez le chien, mais cette étude est à relativiser car l'administration sublinguale de l'agoniste a été réalisée sur des animaux anesthésiés en décubitus dorsal de façon à être sûr du temps de contact de la spécialité avec la région sublinguale. Ceci serait donc à reévaluer sur des chiens vigiles dans le cadre de la mise au point de spécialités vétérinaires canines contenant un agoniste de la GnRH.

Rapport-Gratuit.com

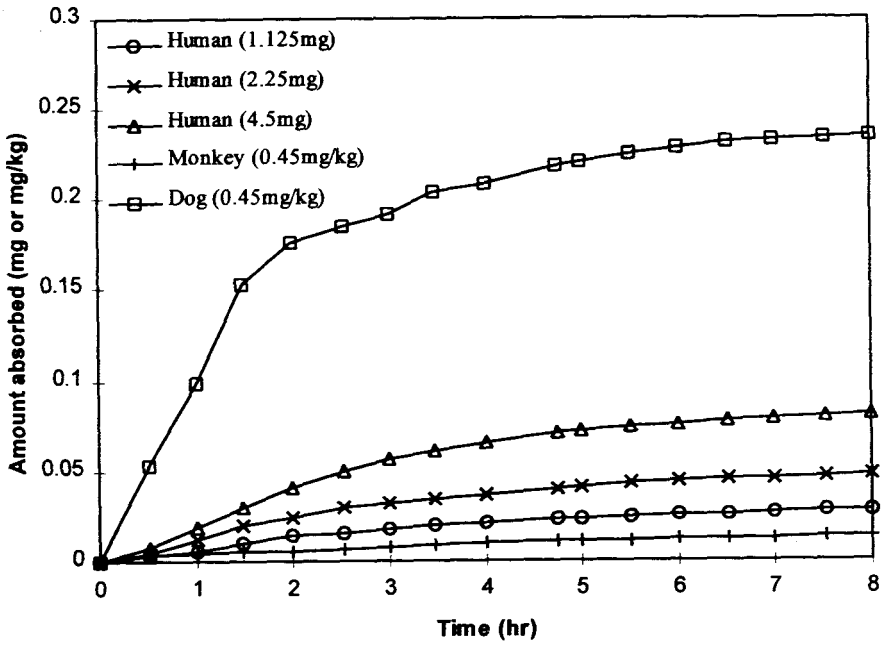


Figure 47 : Absorption in vivo de leuprolide après une administration sublinguale chez le chien (0,45 mg/kg), le singe (0,45 mg/kg), l'homme (1,125 ; 2,25 et 4,5 mg) (Qiu et al., 1999).

b.Pharmacologie des antagonistes

Les études de pharmacocinétique sur les antagonistes de la GnRH chez le chien ont elles aussi été réalisées dans le but d'extrapoler ces résultats chez l'homme.

Une première étude a analysé le comportement de l'Antarelix® en injections intraveineuses et sous cutanées chez le chien à la dose de 10 µg/kg. Cet antagoniste n'est qu'au maximum absorbé à 62 % après une injection sous cutanée, cela environ une heure post injection. La demi-vie est d'environ 24h et apparaît supérieure à celle d'autres analogues de la GnRH chez le chien. La détermination d'un modèle de distribution bicompartimental n'a pas été significative (Sorensen et al., 1996).

Schwahn et al. (2000a) ont eux étudié le métabolisme du Cetrorelix® chez le chien. Après une injection sous cutanée de 0,1 mg/kg, la concentration maximale plasmatique apparaît au bout de 1,3 h et les concentrations plasmatiques en antagonistes restent constantes pendant environ 24 h. À la dose de 1 mg/kg, la cinétique d'absorption est modifiée par la formation d'un dépot local persistant en antagoniste. Chez le chien, l'élimination dans les fèces et les urines se fait à part égale. On n'observe que de l'antagoniste non métabolisé dans les urines. Dans les fèces, on observe les métabolites de l'excrétion biliaire de l'antagoniste. Aucune différence de métabolisme n'a été observée entre mâles et femelles.

Schwahn et al. (2000b) ont étudié la pharmacocinétique du Cetrorelix® chez le chien et en ont déduit un modèle de distribution de type tricompartimental. L'étude comparée de la concentration en testostérone et en Cetrorelix® les ont amené à décrire un modèle d'inhibition de type sigmoïde de l'évolution de la concentration en testostérone en fonction de l'élimination du Cetrorelix® (figure 48). Une concentration minimale de 1-2 ng/mg de Cetrorelix® dans le plasma serait nécessaire pour inhiber la production de testostérone.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

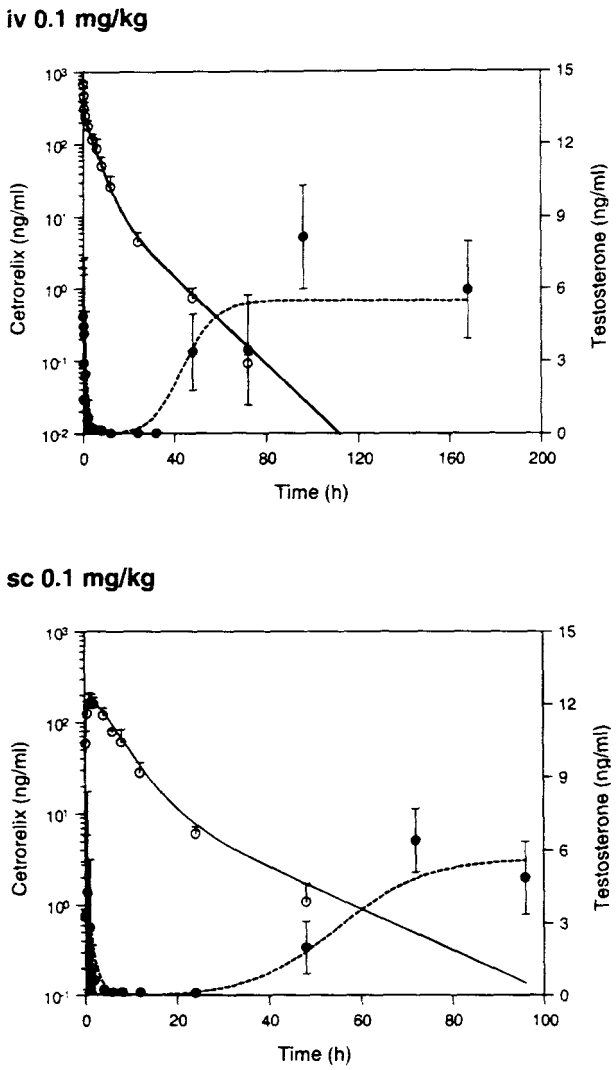


Figure 48 : Relation entre la concentration en Cetrorelix® (ronds vides) et en testostérone (ronds pleins) suite à une injection intraveineuse ou sous cutanée de 0,1 mg/kg de Cétrorelix® (Schwahn et al., 2000b).

3.Utilisations potentielles des agonistes de la GnRH chez les carnivores.

a.Contraception chez le chien mâle.

Actuellement, la contraception des chiens mâles ne peut se faire qu'en utilisant des injections d'analogues des stéroïdes sexuels : delmadinone, progestagène de synthèse à activité anti-androgénique 17 fois supérieure à celle de la progestérone (principe actif du Tardak®). Cette contraception est efficace mais n'est pas conseillée pour les chiens ayant un avenir en reproduction car la réversibilité de ses effets est aléatoire.

Vickery et al. (1983) ont étudié l'effet d'injections sous cutanées quotidiennes d'un agoniste de la GnRH sur les fonctions de reproduction de chiens mâles. Des chiens de race Beagle recevaient chaque jour une injection de 10 µg/kg de [6-D-(2-naphtyl)alanine]-LHRH pendant une période minimale de 42 jours suivie d'une période d'observation de 172 jours. Après la première injection de l'agoniste, les taux circulants des deux gonadotrophines et de la testostérone augmentent de 2 à 4 heures après injection (figure 49). Ces augmentations s’atténuent au fur et à mesure des injections successives et deux semaines après le début du traitement, aucune élévation n'a plus été observée. Ceci a été mis en relation avec le phénomène de désensibilisation des cellules gonadotropes de l'hypophyse.

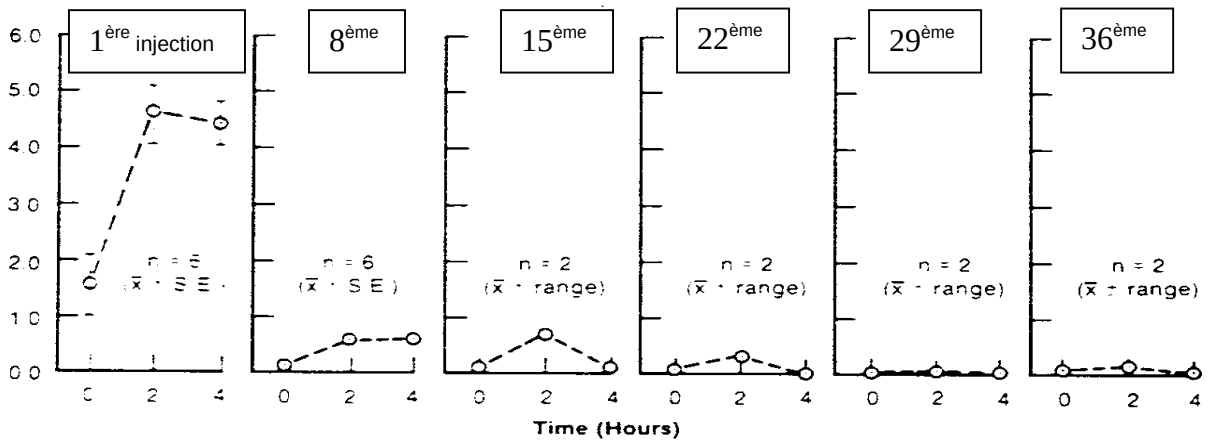


Figure 49 : Concentrations plasmatiques moyennes en testostérone en ng/mL chez des Beagles mâles adultes 2 à 4h après les injections quotidiennes de 10 µg/kg de D-Nal(2)6-LHRH (Vickery et al., 1983).

Le volume des testicules, la durée de l'érection, le volume l'éjaculât, le nombre total des spermatozoïdes éjaculés et la motilité des spermatozoïdes ont diminué durant le traitement, avec une diminution significative du nombre total des spermatozoïdes éjaculés après 2 semaines de traitement et un volume d'éjaculât devenant nul après la cinquième semaine de traitement. L'observation histologique de la spermatogenèse montre que celle-ci est partiellement supprimée après dix jours de traitement et complètement supprimé après 38 jours de traitement. Tous ces paramètres sont retournés à la normale après arrêt du traitement, la restauration de la spermatogenèse est apparue 9 semaines après la fin du traitement (figure 50). Sachant que les cycles de spermatogenèse durent 54 jours chez le chien , il semble que la spermatogenèse redémarre presque immédiatement après l'arrêt du traitement. Le laps de temps nécessaire à la restauration de ces paramètres a été plus long pour les chiens soumis à un traitement de 42 jours que pour ceux soumis à un traitement de 10 jours.

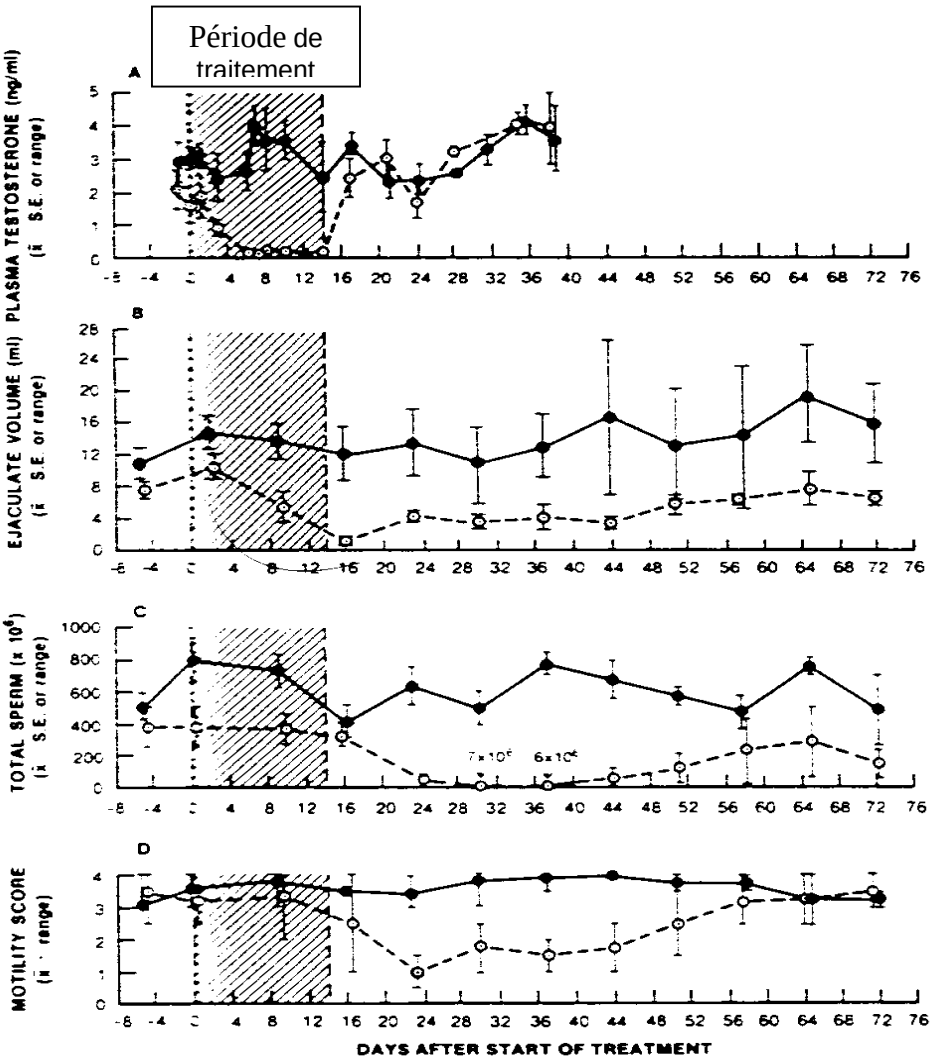


Figure 50 : Réversibilité de l'effet de 13 injections quotidiennes de 10 µg/kg de D-Nal(2)6-LHRH sur le taux de testostérone plasmatique, le volume de l'éjaculât, le nombre total des spermatozoïdes éjaculés, la motilité des spermatozoïdes chez des chiens Beagle, mâles, adultes (ronds vides). Le groupe témoin recevant l'excipient (ronds pleins) (Vickery et al., 1983)

Les effets intéressants de l'administration chronique d'analogues de la GnRH sur le chien mâle (induction d'une contraception réversible, diminution des taux de testostérone circulant et de la taille de la prostate) ne sont néanmoins pas pratiquement applicables pour le clinicien du fait du côté contraignant des injections quotidiennes de l'agoniste. La mise au point des implants délivrant sur une durée de un à plusieurs mois les agonistes de la GnRH a ouvert une nouvelle voie pour l'utilisation de ces principes actifs en médecine vétérinaire chez le chien mâle.

L'équipe de Inaba et al. (1996) a réalisé dans le but d'une utilisation chez le chien un essai clinique d'injection sous-cutanée de deux dosages d'un agoniste de la GnRH sous forme de microcapsules. Dans leur essai, 10 chiens mâles de deux à quatre ans ont été traités avec des microcapsules de poly-D,L-Lactide co-glycolide contenant de l'acétate de leuprolide à la dose de 0,1 ou 1 mg/kg en injections sous cutanées (5 chiens dans chaque sous groupe). Leurs résultats sont les suivants :

-le traitement à la dose de 1 mg/kg induit une diminution du volume de l'éjaculât et une modification de la morphologie des spermatozoïdes, cet effet a persisté pendant six semaines (figure 51).

-avant la complète disparition de spermatozoïdes normaux ils ont observé une augmentation des spermatozoïdes peu mobiles et anormaux (figure 51). Un animal de leur étude n'est jamais devenu azoospermique mais son nombre total de spermatozoïdes éjaculés a atteint de très bas niveau (environ un million) et ses spermatozoïdes n'étaient pas capables de pénétrer les ovocytes pendant les 8 à 14 semaines après le traitement (tableau IX). La dose de 0,1 mg/kg n'a pas été capable d'induire une suppression de la spermatogenèse.

-à la fin de la période expérimentale, le nombre de spermatozoïdes normaux est devenu comparable à celui d'avant le traitement. Vingt semaines après l'injection ont été nécessaires.

-pendant le traitement, une augmentation transitoire des concentrations plasmatiques en LH et testostérone a été observée, puis une diminution marquée de celles-ci qui sont devenues inférieures aux concentrations normales après la deuxième semaine de traitement. Ces faibles concentrations ont été maintenues au moins cinq semaines dans le traitement à la dose de 1 mg/kg (figure 52). Dans le cas de l'autre dosage l'inhibition observée a été moins importante.

-aucun effet secondaire particulier n'a été observé.

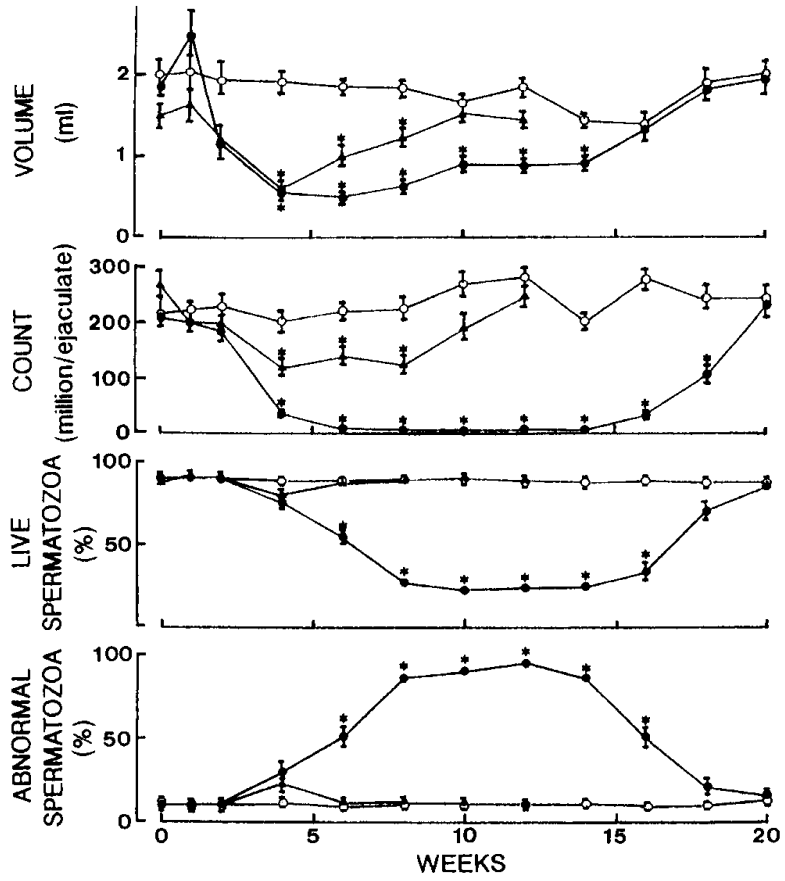


Figure 51 : Volume de l'éjaculât, nombre total de spermatozoïdes éjaculés, pourcentages de spermatozoïdes vivants et anormaux chez des chiens mâles adultes après une injection sous cutanée de microcapsules d'acétate de leuprolide à la dose de 0,1 mg/kg (triangles), 1 mg/kg (ronds peins) ; témoins (ronds vides).*p<0,01(Inaba et al., 1996).

Tableau IX : Taux de pénétration des spermatozoïdes des éjaculâts des chiens après une injection sous cutanée de microcapsules d'acétate de leuprolide à la dose de 1 mg/kg (Inaba et al., 1996).

Nombre de semaines après traitement	Nombre d'ovocytes examinés	Nombre d'ovocytes pénétrés (%)

0	52	41 (79)
8	48	0 (0)[a]
11	49	0 (0)[a]
14	50	0 (0)[a]
22	51	33 (65)

[a]p<0,001

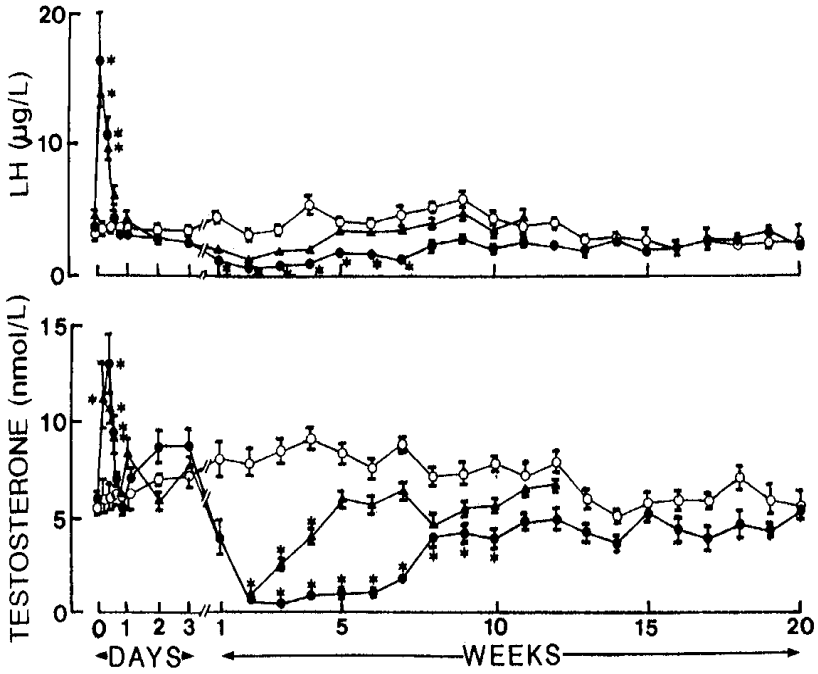


Figure 52 : Concentration en LH et testostérone chez des chiens mâles adultes après une injection sous cutanée de microcapsules d'acétate de leuprolide à la dose de 0,1 mg/kg (triangles), 1 mg/kg (ronds pleins) ; témoins (ronds vides).*p<0,01 (Inaba et al., 1996).

Ils ont conclu de leurs travaux que l'injection de microcapsules d'acétate de leuprolide à la dose de 1 mg/kg constituait une méthode possible de contraception chez le chien mâle. Cette méthode offre l'avantage par rapport à celles déjà existantes d'être totalement réversible. Il reste néanmoins à évaluer les éventuels effets secondaires de ce type de traitement sur des animaux impubères.

b.Traitement des affections prostatiques

En plus de la castration chimique de convenance où les administrations chroniques d'agonistes de la GnRH peuvent être utilisées, l'ensemble des affections de l'appareil génital mâle nécessitant une inhibition des fonctions sexuelles, comme toutes les affections de la prostate par exemple, pourraient faire intervenir ce type de traitement. Le chien servant de modèle de pharmacocinétique extrapolable à l'homme, il serait intéressant de voir si l'ensemble des utilisations des agonistes de la GnRH sous forme d'implants en médecine humaine serait extrapolable à la médecine vétérinaire. Le même type de travaux a été réalisé avec le même agoniste mais sur des injections sous cutanées quotidiennes aux doses de 0,5 à 2,0 µg/kg (Vickery et al., 1985). Le même type de résultats que précédemment a été observé. De plus, le poids prostatique observé a été de 36 % et 68 % du poids prostatique des animaux témoins pour la dose de 2,0 µg/kg et la dose de 0,5 µg/kg respectivement (figure 53). La comparaison entre ces deux doses et celle de l'étude précédente montre que pour ces trois doses, l'effet maximal est toujours atteint mais il est plus rapidement atteint avec une forte dose qu'avec une faible dose.

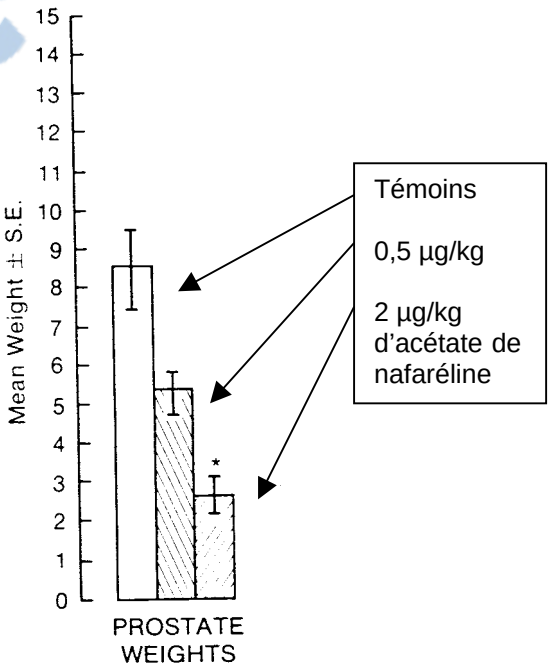


Figure 53 : Poids de la prostate de chiens mâles adultes recevant des injections sous cutanées quotidiennes pendant 44 jours de 0,5 µg/kg ; 2,0 µg/kg d'acétate de nafaréline. *p<0.05 (Vickery et al., 1985a).

Rapport-Gratuit.com

c.Contraception chez la chienne

Les protocoles actuels de contraception chez la chienne utilisent tous des injections sous cutanées, intramusculaires ou des administrations per os de spécialités vétérinaires contenant des stéroïdes ayant une forte activité progestagène. Ces spécialités sont indiquées d'une part en prévention de l'œstrus et d'autre part en interruption du pro-œstrus. Leur efficacité est bonne et permet d'obtenir une absence totale de chaleurs chez la chienne pendant 7 à 14 mois après injection dans le cas d'acétate de médroxyprogestérone. Mais leur utilisation s'accompagne de nombreux effets secondaires non négligeables dus au maintien sur le long terme d'une forte activité progestagène dans l'organisme de la chienne. Les complications fréquemment observées sont : le pyomètre, l'hyperplasie mammaire voire l'apparition de lactation, l'apparition d'un anœstrus prolongé à définitif, un effet potentialisateur sur le diabète et des dépigmentations au lieu d'injection.

La désensibilisation de l'hypophyse par l'administration chronique d'agonistes de la GnRH entraînant une diminution des concentrations circulantes en gonadotrophines et en stéroïdes sexuels observées chez la rate a été évaluée chez la chienne.

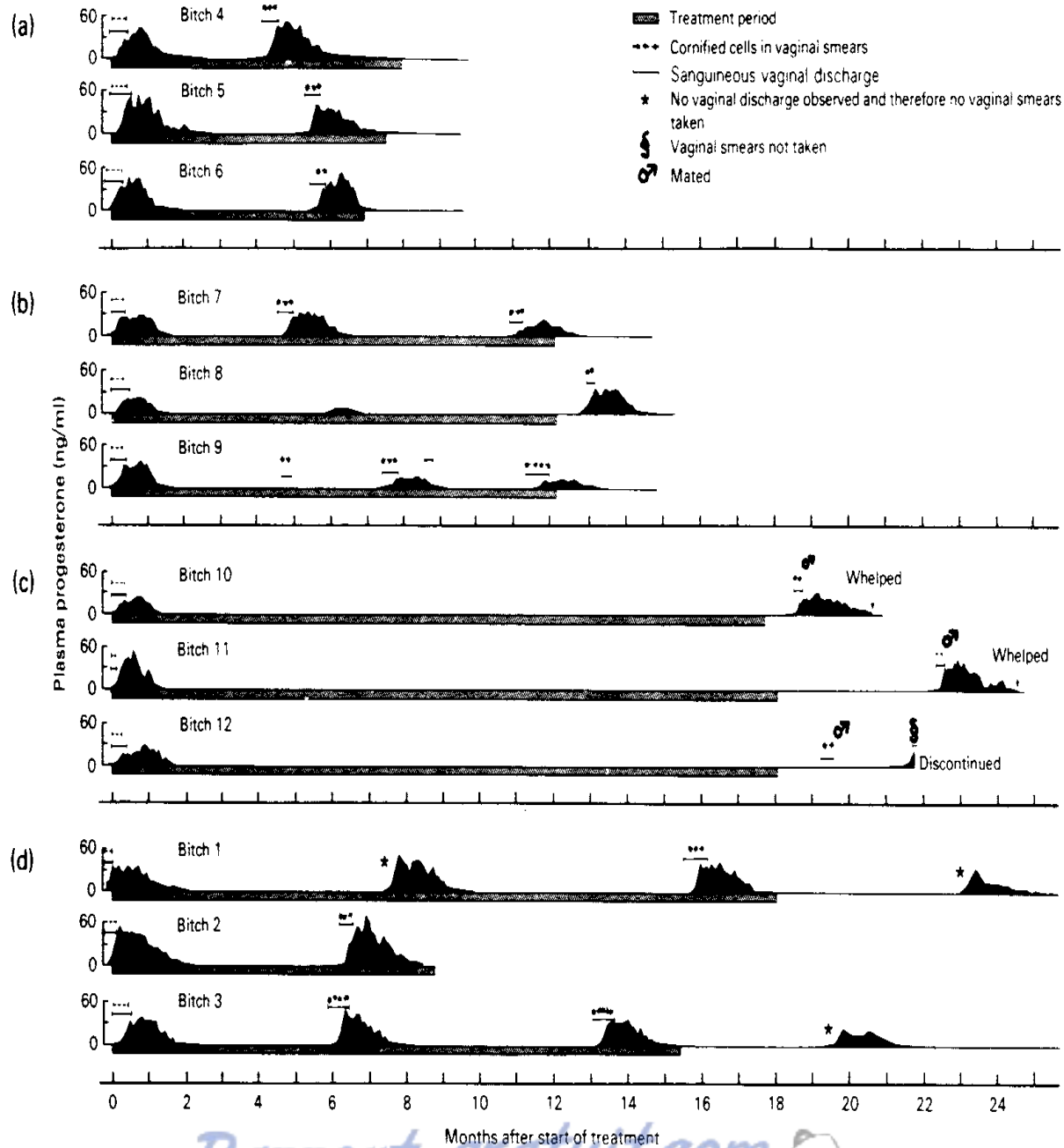
L'équipe de McRae et al. (1985) a évalué l'effet d'une administration chronique d'acétate de nafaréline par implantation sous cutanée de pompes osmotiques pendant une durée allant jusqu'à dix-huit mois chez des chiennes à différents stades de leur cycle de reproduction. Le traitement avec l'agoniste de la GnRH a été testé à trois doses différentes : 2 µg, 8 µg et 32 µg/jour. Dans une première étude, ils ont réalisé l'implantation sous cutanée des pompes osmotiques chez des chiennes cyclées adultes une semaine après le début de l'apparition d'écoulements de sang à la vulve (figure 54). Leurs observations ont été les suivantes :

-l'ovulation imminente au moment de l'implantation n'a pas été affectée quelque soit la dose d'acétate de nafaréline administrée.

-l'augmentation de la concentration en progestérone suivant l'ovulation a été plus faible chez les animaux dosés à 8 et 32 µg/j.

-le traitement continu aux doses de 2 et 8 µg/j n'a pas affecté la survenue d'œstrus réguliers chez les chiennes.

-les chiennes dosées à 32 µg/j d'acétate de nafaréline n'ont exprimé aucune manifestation d'œstrus pendant les dix-huit mois du traitement. Deux de ces chiennes ont déclaré un œstrus 3 et 18 semaines après l'arrêt du traitement. Après saillie, chacune a produit une portée normale de 5 et 6 chiots respectivement.



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Figure 54 : Concentration plasmatique en progestérone et dates d'apparition de saignements vaginaux et cornification vaginale pendant et après le traitement continu de chiennes Beagles cyclées adultes aux doses de (a) 2 µg/j d'acétate de nafaréline, (b) 8 µg/j, (c) 32µg/j. (d) témoin excipient (McRae et al., 1985).

Le même type de protocole a été appliqué à des chiennes adultes cyclées en période d'anœstrus. Les trois chiennes concernées ont montré une cornification du vagin qui a débuté de 4 à 11 jours après le début du traitement et duré pendant 8 à 18 jours. Les chiennes ont montré des saignements à la vulve pendant 10 à 14 jours à partir du 9ème et 10ème jour après le début du traitement. Une augmentation de la concentration plasmatique en progestérone similaire à celle suivant une ovulation chez une chienne non traitée a été observée, mais cette concentration élevée en progestérone n'a été maintenue que de 30 à 36 jours, ce qui est bien inférieur à une phase lutéale normale chez la chienne. Les trois chiennes ont été saillies pendant la période de chaleurs suivant le traitement, l'une d'elles a produit une portée normale. Ces résultats montrent le principal inconvénient des analogues de la GnRH en traitement chronique dans le but de réaliser une stérilisation réversible de convenance chez la chienne : suite au début du traitement, il y a apparition de chaleurs qui peuvent être fécondantes. Le traitement contraceptif étant utilisé chez la chienne de façon à éliminer les troubles comportementaux accompagnant les chaleurs et à éviter les gestations non souhaitées, l'administration chronique d'agoniste de la GnRH semble à elle seule peu adaptée du fait de son premier effet de stimulation.

Récemment, un traitement utilisant un implant sous cutané de desloréline couplé à une administration orale d’acétate de mégestrol a mis en évidence que le progestagène utilisé semblerait inhiber la manifestation de l’œstrus induit par la mise en place de l'implant contenant l'agoniste de la GnRH (Wright et al., 2000).

Une dernière étude a consisté en l'administration continue de 32 µg/j d’acétate de nafaréline chez de jeunes chiennes impubères à partir de quatre mois d'âge et pendant dix-huit mois. Aucune manifestation d’œstrus n'a été observée ni au début ni pendant toute la durée du traitement. La concentration plasmatique en progestérone n'a jamais excédé 0,5 ng/mL. Suite à l'arrêt du traitement, des manifestations d'œstrus ont été observées chez toutes les chiennes 3,5 à 4 mois après l'arrêt du traitement. Ces trois chiennes ont été saillies. Leur concentration plasmatique en progestérone a augmenté de façon normale et a été interprétée comme preuve d'ovulation, mais aucune implantation utérine n'a été mise en évidence et aucune portée n'a été obtenue (McRae et al., 1985).

L'utilisation des agonistes de la GnRH en protocoles de contraception chez la chienne n'apparaît pas encore suffisamment cernée pour être utilisée en routine. Des essais cliniques utilisant les antagonistes de la GnRH seraient intéressants.

d.Contraception chez la chatte

Les protocoles actuels de contraception chez la chatte utilisent aussi les progestagènes, ceux-ci sont beaucoup mieux tolérés chez la chatte que chez la chienne mais nécessitent des administrations parentérales ou per os répétées et contraignantes.

Les évaluations cliniques et pharmacologiques des analogues de la GnRH sont rares chez les félins. Dans une communication récentes, Munson et al. (2000) ont exposé les résultats de leurs travaux sur l'utilisation d'implants contenant 6 mg de desloréline chez dix chattes adultes. Le traitement a entraîné une augmentation de la concentration en œstradiol à sa mise en place, accompagnée ou non d'un comportement d'œstrus et suivi d'une pseudogestation chez sept chattes sur dix. Ensuite les concentrations fécales en œstradiol et progestérone ont diminué jusqu'à se maintenir à des valeurs inférieures à 1-10 ng/g et 1000 ng/g respectivement. Mais une grande hétérogénéité du comportement des animaux en terme de reprise de cyclicité ovarienne et du comportement d'œstrus a ensuite été observée. Un implant d'agoniste de la GnRH semble donc supprimer la cyclicité chez les chattes, mais des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

e.Induction d'œstrus en période d'anœstrus chez la chienne

La maîtrise de la reproduction dans l'espèce canine ne se limite pas aux actions de contraception. La gestion des périodes de reproduction des femelles intéresse certains propriétaires, notamment les éleveurs. La possibilité d'induire chez des chiennes à différents stades de leur anœstrus des chaleurs fécondantes à une date suffisamment précise permettrait une meilleure gestion de la succession des portées dans les élevages de chiens à but commercial. Différents protocoles utilisant des gonadotrophines ou des antidopaminergiques sont utilisés mais leur efficacité est variable (Buff, 2001).

L'induction de l'œstrus chez la chienne par les analogues de la GnRH a été testée en 1989 par Concannon en utilisant de la lutréline en injection sous cutanée pendant 14 jours sur 24 chiennes Beagles en anœstrus. Il a obtenu un taux de succès de 50 % de gestation avec ce type de protocole, mais il conclut qu'il semble que ce protocole soit plus efficace lorsqu'il est débuté tardivement pendant la période d'anœstrus que précocement.

Plus récemment, l'équipe de Inaba et al. (1998) a évalué l'efficacité d'une injection sous cutanée de microcapsules contenant de l'acétate de leuprolide (L. A.) dans l'induction d'œstrus en période d'anœstrus chez des chiennes adultes et chez des chiennes impubères. Les chiennes ont été traitées avec cet agoniste de la GnRH à la dose de 100 µg/kg, 120 ou 150 jours post partum pour les chiennes adultes et à l'âge d'un an pour les chiennes impubères. Toutes ont reçu une injection d'un autre analogue de la GnRH ; la fertiréline, à la dose de 3 µg/kg par voie intramusculaire au premier jour de l'œstrus induit pour stimuler l'ovulation.

Les résultats ont été les suivants :

-les manifestations d'œstrus ont été observées 10,3 ± 0,9 jours suivant injection de L. A. chez toutes les chiennes.

-l'intervalle inter-œstrus chez les chiennes traitées à 120 et 150 jours post partum a été réduit à 191 ± 3 et de 122 ± 3 jours respectivement. Le lot de chiennes utilisées en témoin a eu un intervalle inter-œstrus de 264 ± 11 jours (tableau X).

- toutes les chiennes traitées ont exprimé un comportement d'œstrus et accepté l'accouplement.

-trois des six chiennes (50%) à 120 jours post partum, six des six chiennes (100%) à 150 jours post partum et cinq des six chiennes (83%) impubères sont devenues gestantes et ont produit des portées dont la taille moyenne est de 4,5 ± 0,8 chiots (tableaux X ; XI).

-les profils des concentrations en progestérone et œstrogènes se sont révélés normaux chez les animaux gestants (figures 55 ; 56).

Tableau X : Comparaison des durées des différentes phases du cycle de reproduction en cas d'œstrus induits ou spontanés chez des chiennes Beagles matures. Induction de l'œstrus par une injection sous cutanée d'acétate de leuprolide à la dose de 100 µg/kg et stimulation de l'ovulation par une injection de fertiréline (3 µg/kg) au premier jour des chaleurs observées (Inaba et al., 1998).

Groupe	Nombre de chiennes (n)	Intervalle interœstrus (jours)	Durée du proœstrus (jours)	Durée de l'œstrus (jours)	Durée de la gestation (jours)	Taux de gestation (%)	Taille de la portée (n)
Oestrus spontané	10	264 +/-11[a]	7,8 +/-0,7[a]	8,0 +/-0,3	62,9 +/-0,5	100[a]	4,2 +/-0,4
Induit 120 jours post partum	6	191 +/-3[b]	5,5 +/-0,8[b]	8,3 +/-0,6	62,0 +/-0,6	50[b]	3,5 +/-0,4
Induit 150 jours post partum	6	222 +/-3[b]	5,9 +/-0,5[b]	7,0 +/-0,9	62,5 +/-1,0	100[b]	4,2 +/-1,0

a,b colonnes dont les valeurs sont significativement différentes à p<0,05.

Tableau XI : Comparaison des durées d'œstrus induits ou spontanés chez des chiennes Beagles prépubères. Induction de l'œstrus par une injection sous cutanée d'acétate de leuprolide à la dose de 100 µg/kg et stimulation de l'ovulation par une injection de fertiréline (3 µg/kg) au premier jour des chaleurs observées (Inaba et al., 1998).

Groupe	Nombre de	Age au	Durée du	Durée de	Durée de	Taux de	Taille de la

	chiennes (n)	premier oestrus (jours)	proœstrus (jours)	l'œstrus (jours)	la gestation (jours)	gestation (%)	portée (n)
Oestrus spontané	6	348 +/-29	3,3 +/-1,0	8,6 +/-0,6	62,4 +/-0,7	83	4,2 +/-0,5
Oestrus induit	6	376 +/-3	4,2 +/-1,0	8,7 +/-1,2	61,6 +/-1,7	83	4,3 +/-0,9

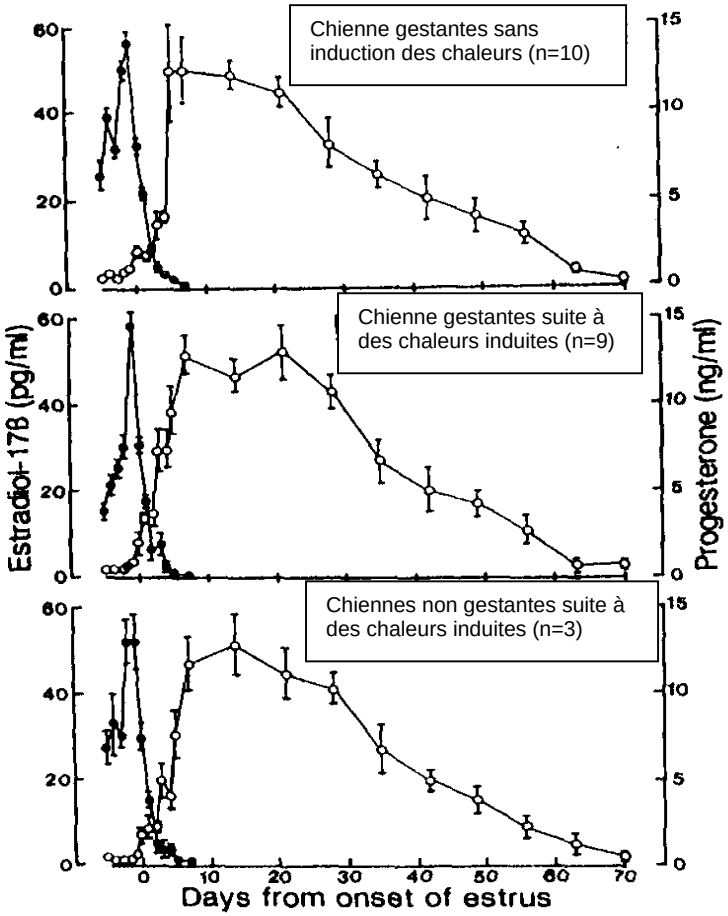


Figure 55 : Concentrations plasmatiques en œstradiol (ronds pleins) et progestérone (ronds vides) chez des chiennes Beagles matures après une injection sous cutanée d'acétate de leuprolide en microcapsules (100 µg/kg). Toutes les chiennes ont été traitées par une injection intramusculaire de fertiréline (3 µg/kg) au premier jour de l'œstrus induit. Valeurs +/- écart type (Inaba et al., 1998).

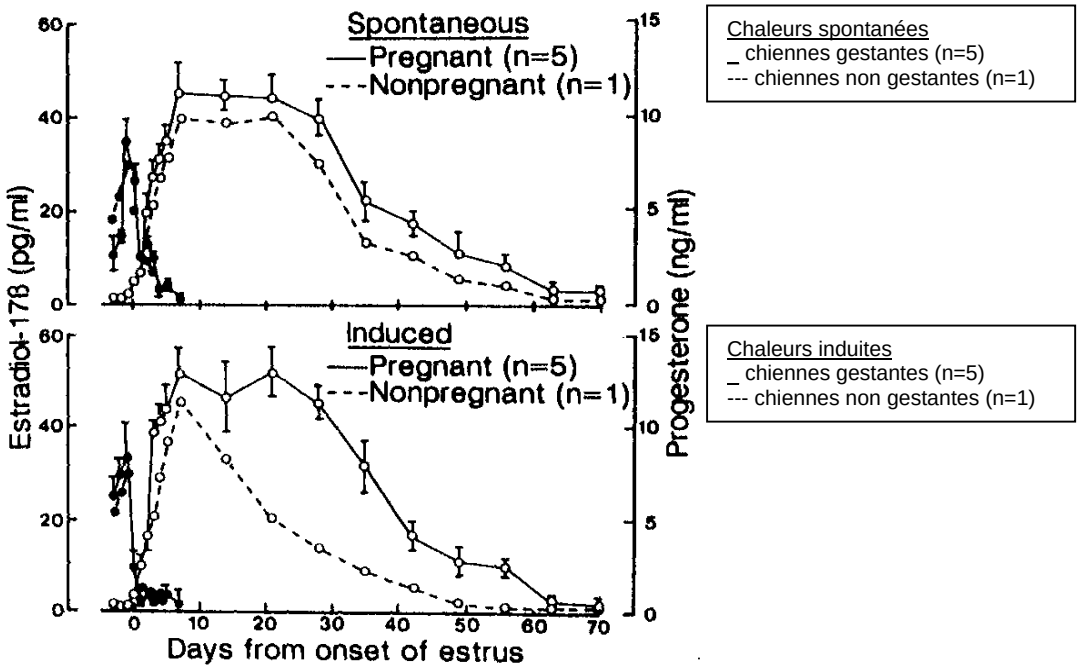


Figure 56 : Concentrations plasmatiques en œstradiol (ronds pleins) et progestérone (ronds vides) chez des chiennes Beagles prépubères après une injection sous cutanée d'acétate de leuprolide en microcapsules (100 µg/kg). Toutes les chiennes ont été traitées par une injection intramusculaire de fertirélin (3 µg/kg) au premier jour de l'oestrus induit. Valeurs +/- écart type (Inaba et al., 1998).

Le taux de gestation obtenu suite à l'induction d'œstrus par l'injection de microcapsules de L. A. est donc voisin de celui obtenu chez des chiennes pour lesquelles l'induction de l'œstrus a été réalisée par l'administration pulsatile de GnRH (Vanderlip et al., 1987). Néanmoins, ces résultats ont été obtenus sur de faibles effectifs. Pendant la période d'anœstrus de la chienne on observe une augmentation de la sécrétion pulsatile de GnRH jusqu'à l'ovulation (Tani et al., 1996). Mais au vu de ces résultats la pulsatilité de la sécrétion de GnRH n'est pas nécessaire à l'induction de l'œstrus et l'induction de l'œstrus est même plus rapide dans le cas d'une administration continue d'un analogue de la GnRH. L'étude de Vanderlip et al. (1987) est donc en d'accord avec les études réalisées sur la vache (D'Occhio et al., 1989) et la jument (Becker et al., 1992) pour lesquelles l'oestrus est obtenu plus rapidement suite à une administration continue de GnRH que suite à une administration pulsatile. À la vue des profils de sécrétion des hormones sexuelles

pendant le traitement ils n'ont pas conclu sur une éventuelle désensibilisation de l'hypophyse pendant ce traitement (figures 55 ; 56).

Inaba et al. (1998) ont également observé comme Concannon (1989) que plus le traitement est réalisé tardivement pendant la phase d'anœstrus plus la réduction de l'anœstrus est importante. Il leur semble aussi qu'il soit plus facile d'induire un œstrus sur des chiennes impubères d'un an que sur des chiennes pubères au milieu de leur anœstrus. Leur protocole semble tout à fait applicable dans la pratique courante mais nécessite encore un ajustement de la dose de l'agoniste de la GnRH.

f.Traitement des tumeurs mammaires chez la chienne

Les tumeurs mammaires constituent une affection très fréquente chez la chienne. On considère que 50% des chiennes non stérilisées présenteront des tumeurs au cours de leur vie et que dans 50% des cas ces tumeurs seront cancéreuses. Le rôle des hormones femelles et principalement celui des œstrogènes dans le développement des tumeurs mammaires des mammifères dont la chienne est établi (Schneider, 1970 ; Owen, 1979 ; Lespagnard et al., 1987). Les hormones ovariennes agissent en synergie avec les hormones hypophysaires, principalement l'hormone de croissance et la prolactine, pour promouvoir le développement des tumeurs mammaires (Schneider et al.,1969 ; 1970). La possibilité d'inhiber l'axe hypothalamo-hypophysaire et de maintenir les concentrations en œstrogènes et progestérones à des valeurs inférieures ou égales à celle de l'état de anœstrus de la chienne a donc été jugée intéressante dans la gestion des tumeurs mammaires dans cette espèce. L'utilisation des agonistes de la GnRH a déjà fait ses preuves en médecine humaine dans la gestion des cancers du sein, mais celle-ci est actuellement surclassée par l'utilisation des antagonistes.

Lombardi et al. (1999) ont réalisé un essai clinique sur 18 chiennes atteintes de tumeurs mammaires hormono-dépendantes de grade T2-T4, N0, M0 (Classification TNM). Neuf chiennes n'ont pas été traitées et ont servi de groupe témoin, les neufs autres ont reçu des injections répétées de 60 µg/kg de goséréline

(agoniste de la GnRH) sous forme de dépôts renouvelés tous les 21 jours pendant douze mois. Ils ont obtenu les résultats suivants :

-le diamètre moyen des tumeurs des animaux traités a diminué de 8,2 % et de 65,3 % au bout de 30 et 360 jours respectivement. De plus, cet effet est resté stable jusqu'au jour 540, c'est-à-dire six mois après la fin du traitement (tableau XII).

-aucune mortalité n'a été observée jusqu'au jour 540 après le début du traitement alors que dans le groupe témoin, ils ont constaté 55% de mortalité au bout de 360 jours et 88% après 540 jours.

-aucune diffusion aux noeuds lymphatiques locaux n'a été mise en évidence chez les animaux traités jusqu'au jour 540 après le début du traitement. Sur la même période, 44% des animaux témoins ont présenté des métastases au bout de 360 jours et 74% après 540 jours (figure 57).

-aucune métastase à d'autres organes n'a été observée au jour 360 et seulement 15 % de métastases ont été observées à la date 540 contre 22% et 33% respectivement pour les témoins aux mêmes moments d'observation (figure 57).

-les concentrations en œstrogènes et progestérone ont progressivement diminué jusqu'à un minimum 63 jours après le début du traitement et ces concentrations se sont maintenues jusqu'au jour 180 du traitement. Suite à l'arrêt du traitement, aucune reprise d'activité ovarienne n'a été mis en évidence 360 jours après le début du traitement.

-aucun effet secondaire particulier n'a été observé.

Ces résultats confirment que les œstrogènes et la progestérone ont un rôle important dans la croissance des tumeurs mammaires chez la chienne. L'efficacité du traitement au long terme avec la goséréline apparaît meilleure que dans l'espèce humaine où seulement 60 % des tumeurs mammaires répondent correctement au traitement, mais l'effectif de l'étude est trop faible pour avoir une signification statistique suffisante. En plus de cet effet indirect par l'intermédiaire des hormones sexuelles, un effet direct des analogues de la GnRH ne peut être éliminé car Sartin et al. (1995) ont mis en évidence des récepteurs à la GnRH sur des tumeurs mammaires de chienne. Cet effet direct est clairement démontré pour les tumeurs mammaires humaines et semble pour certains auteurs être l'effet le plus important dans le cas de l'utilisation des antagonistes de la GnRH. Certaines tumeurs mammaires humaines devenues hormono-indépendante aux œstrogènes et à la

progestérone voient leur croissance inhibée par les antagonistes de la GnRH (Srkalovic et al., 1989). Cet effet pourrait être intéressant à préciser car Yamagami et al. (1996) et Morris et al. (1998) ont montré que la castration chirurgicale n'avait aucun intérêt thérapeutique sur les tumeurs mammaires chez la chienne.

Le protocole de traitement proposé par Lombardi et al. (1999) semble donc apporter un bénéfice important en réduction de la taille des tumeurs, diminution du risque de métastases, et augmentation de la durée de vie. Il serait d'après eux tout à fait praticables chez les chiennes atteintes de tumeurs mammaires. Ce type de traitement pourrait aussi s'inscrire dans le cadre d'une première approche médicale de réduction du volume tumoral avant intervention chirurgicale pour exérèse de la tumeur.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Tableau XII : Concentration en récepteurs aux œstrogènes (ER) et à la progestérone (PR) (fentomoles/mg de protéine) avant le début du traitement et taille de la tumeur (diamètre moyen en cm) 30, 180, 360 et 540 jours après le début du traitement avec de la goséréline (60 µg/kg en injections sous cutanées tous les 21 jours pendant 12 mois) (Lombardi et al., 1999).

			Taille de la tumeur (cm)					
Groupe	ER	PR	Jour					
	fmoles/mg prot.		0	30	90	180	360	540
1	22,0+/-6,1	13,6+/-3,6	5,7+/-1,5	6,2+/-1,6	7,4+/-2,1	8,75+/-2,6	8,9+/-2,9	9,0+/-3,8
2	23,6+/-7,7	17,0+/-6,4	4,9+/-1,4	4,5+/-1,5*	2,6+/-0,8*	2,6+/-0,8**	1,7+/-0,4**	1,8+/-0,3*

1 groupe non traité

2 groupe traité

Résultats exprimés en valeurs moyennes +/- SD (n=9). *p<0,05 ; **p<0,001.

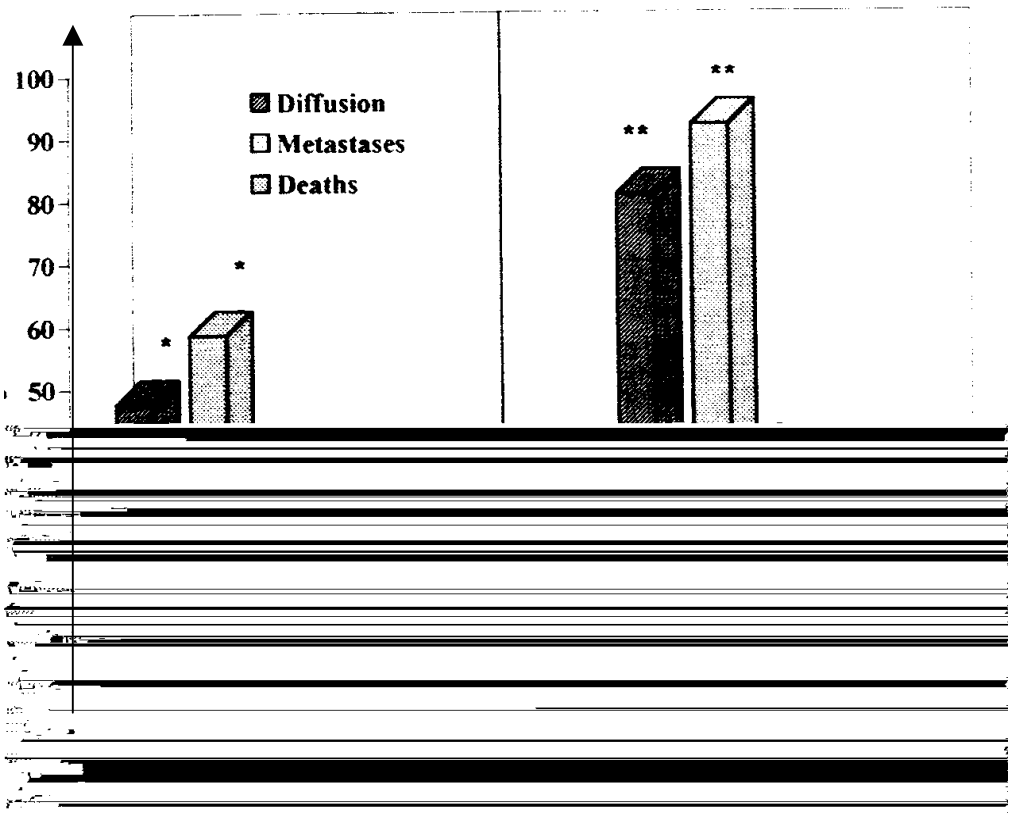


Figure 57 : Effets de la goséréline sur les animaux traités (T) et non traités (NT) 360 et 540 jours après le début du traitement sur la mortalité (Deaths), les métastases dans les nœuds lymphatiques locaux (Diffusion) et dans d'autres organes (Metastases). Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'incidence *p<0.05 ; **p<0.001 (Lombardi et al.,1999).

En bilan de l'ensemble de cette partie traitant des études réalisées chez les carnivores, il apparaît que les analogues de la GnRH seraient intéressants pour le vétérinaire praticien. Comme dans l'espèce humaine qui a déjà été abordée, les agonistes de la GnRH pourraient être utilisés dans les interventions médicales nécessitant une suppression de l'activité des organes reproducteurs. La contraception du mâle et de la femelle, la gestion des affections prostatiques et des tumeurs mammaires entrent dans ce contexte. Cependant des résultats prometteurs suite l'utilisation des antagonistes de la GnRH en médecine humaine à la place des agonistes montrent que ces antagonistes auraient plus d'avenir dans les indications de suppression d'activité des organes sexuels. Des essais cliniques, utilisant les

antagonistes de la GnRH, restent à réaliser chez les carnivores pour la médecine vétérinaire.

Les agonistes restent par contre tout à fait d'actualité en administrations chroniques pour produire une stimulation continue (et non pas une désensibilisation) de l'hypophyse qui permet l'induction d'œstrus chez la chienne en période d'anœstrus. Cette indication sera à nouveau abordée dans les parties suivantes concernant les bovins et les équidés.

Cette partie a porté sur l'utilisation d'administrations chroniques des analogues de la GnRH chez les carnivores domestiques. Ce type d'administrations est également testé chez les carnivores sauvages maintenus en captivité. La contraception réversible et de longue durée ainsi que la diminution de l'agressivité de ces animaux sont particulièrement étudiées. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux observés chez les canidés et félidés domestiques, mais ils restent ponctuels et peu significatifs (Bertshinger et al., 2000).

B.Chez les ruminants

1.Rappel des particularités de la fonction de reproduction chez les bovins.

Les particularités de la fonction sexuelle chez les bovins intéressent surtout la femelle. La cyclicité ovarienne de la vache est d'environ 21 jours avec une variabilité individuelle importante. La durée des chaleurs est de 19 h chez la vache est de 14 heures chez la génisse. L'ovulation a lieu entre 6 et 10 heures après la fin de l'œstrus, l'insémination est réalisée avec un maximum de chances de réussite durant la seconde moitié de l'œstrus (Mialot et Chastant, 2000).

Ces chaleurs ou œstrus s'accompagnent de modifications comportementales et organiques utilisées par les intervenants en élevage pour préciser le début et la durée de cet œstrus. La maîtrise de la cyclicc.33944s dyez troupeaur le débBT/TT4 776j-0.0002

la gestion de la fertilité et de la fécondité des bovins. L'ensemble des interventions actuelles est basé sur des injections d'hormones ovariennes et/ou hypophysaires qui visent à mimer ou à perturber des évènements du cycle ovarien physiologique des bovins. Ce même type d'intervention est en partie réalisable en utilisant les analogues de la GnRH comme l'avons déjà abordé dans l'espèce humaine et l'espèce canine.

2.Particularités des récepteurs à la GnRH chez les bovins

En 1984, Hazum et al. ont réalisé une caractérisation du récepteur à la GnRH des bovins en le comparant à celui du rat. Bien que très voisin de celui du rat, le récepteur des bovins se distingue par des glycosilations différentes et une affinité différente pour les analogues de la GnRH. Le récepteur à la GnRH des bovins a en fait 91 % d'analogie avec le récepteur humain et 86 % avec le récepteur murin dans sa séquence d'acides aminés (Kakar et al., 1993). Ayant identifié la séquence de l'ARNm du récepteur bovin, ces auteurs ont essayé de mettre en évidence l'expression de celui-ci dans d'autres organes en utilisant une méthode de RT/PCR. Ils n'ont mis en évidence aucun récepteur à la GnRH identique à celui séquencé dans l'hypophyse dans aucun des organes et tissus examinés : hypothalamus, hippocampe, testicules, corps jaune, ovaires (contenant des follicules), myomètre et endomètre, surrénales, reins, foie et rate. La recherche de récepteurs à la GnRH ailleurs que dans l'hypophyse avait déjà été réalisé en 1983 par Brown et al. en essayant de mettre en évidence une capacité de liaison à la GnRH dans différents organes. Le résultat avait été une absence de récepteurs à la GnRH sur le corps jaune, les follicules ovariens, le foie, les surrénales, les muscles des bovins ovins et porcins. C'est cette dernière méthode qui avait permis la mise en évidence des récepteurs ovariens à la GnRH chez le rat (figure 58).

Mais en 1988, Ireland et al. ont mis en évidence des protéines GnRH-like chez la vache. Ils ont observé une augmentation de la concentration de ces protéines dans les cellules de la granulosa au cours de la phase de croissance du corps jaune et une diminution de celles-ci au cours de la lutéolyse. De plus en 1994,

Sirotkin et al. ont mis en évidence une action directe de la GnRH naturelle et d'un de ses antagonistes sur des cellules isolées de granulosa de bovins. Cette activité perturberait la stéroïdogenèse en augmentant la production par la granulosa d'œstrogènes et de progestérone et en diminuant celle de testostérone. Funston et al. (1995) ont prouvé une augmentation du taux de clivage des embryons bovins issus de fécondation in vitro en ajoutant au milieu de culture un agoniste de la GnRH. Cet effet est annulé en présence d’un antagoniste, ce qui prouverait une action spécifique des agonistes. Mais aucun récepteur à la GnRH (de type hypophysaire) n’a pu être mis en évidence ni sur les spermatozoïdes ni sur les ovocytes et leur cumulus. Les effets des analogues sur les ovocytes pourraient passer par des récepteurs à des protéines GnRH-like. Ces récepteurs seraient suffisamment différents pour ne pas être détectés par RT/PCR (avec des sondes dirigées contre les récepteurs hypophysaires) et auraient une affinité suffisamment faible pour ne pas être isolés par la liaison de ligand. À l'heure actuelle, l'explication du comportement des bovins face aux administrations des analogues de synthèse de la GnRH ne se fait que par l'intermédiaire des récepteurs hypophysaires, mais l'absence de récepteurs périphériques non identiques à ceux de l'hypophyse et de plus faible affinité n'a pas été démontrée.

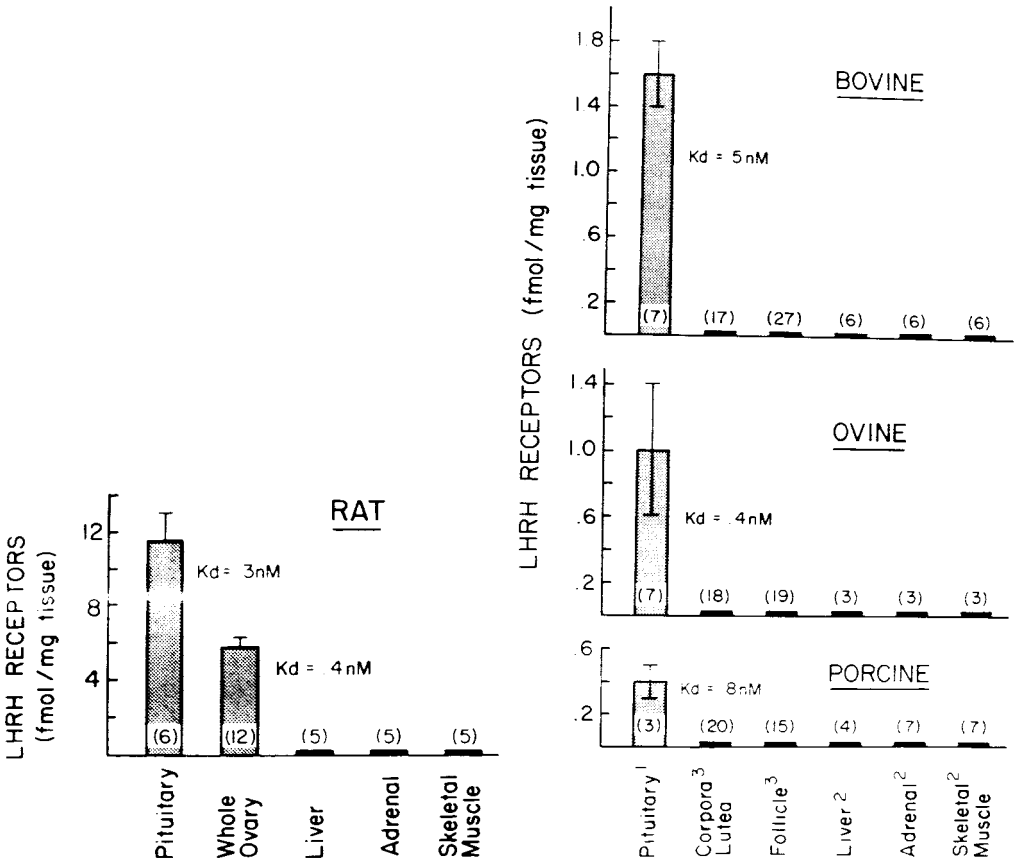


Figure 58 : Concentration tissulaire en récepteurs à la GnRH chez le rat, le bovin, l'ovin et le porcin, mise en évidence par la liaison de GnRH marquée (Brown et al., 1983).

3.Réponse des ruminants aux administrations chroniques d'analogues de la GnRH

a.Chez la vache

i. Effet de l'administration chronique d'agoniste de la GnRH sur la sécrétion de LH et FSH

Différentes études récentes décrivent l'évolution des concentrations en gonadotrophines suite à l'injection de divers implants d'agonistes de la GnRH : desloréline (Rajamahendan et al., 1998), busséréline (Gong et al., 1995 et 1996). Leurs résultats sont concordants et montre une évolution en trois phases : une augmentation des concentrations en FSH et LH est observée immédiatement après la mise en place de l'implant (figure 59 et 60).

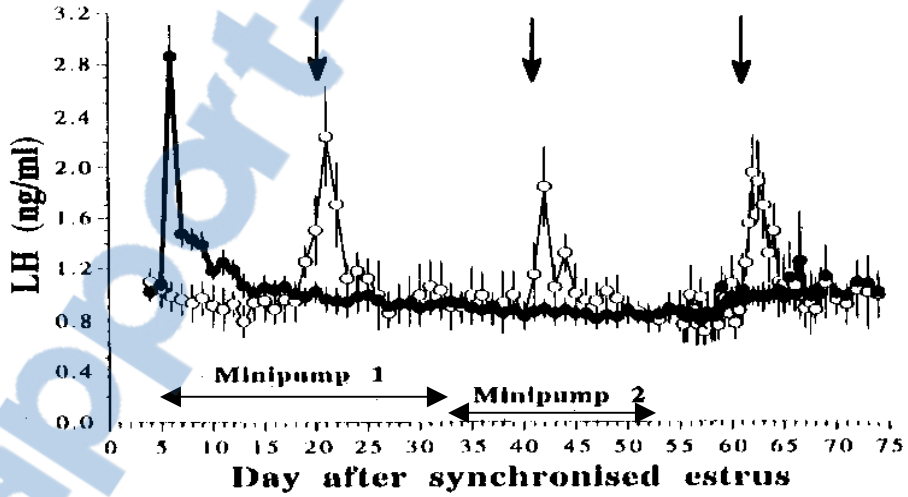


Figure 59 : Concentration plasmatique moyenne en LH chez le groupe témoin (ronds creux) et chez les génisses traitées par un implant (minipump) délivrant 2,5 µg/h de busséréline (ronds pleins). Le premier implant est laissé en place 28 jours, et est remplacé par un second retiré après 20 jours. Les flèches indiquent les manifestations de chaleurs chez le lot témoin (Gong et al., 1996).

Rapport-Gratuit.com

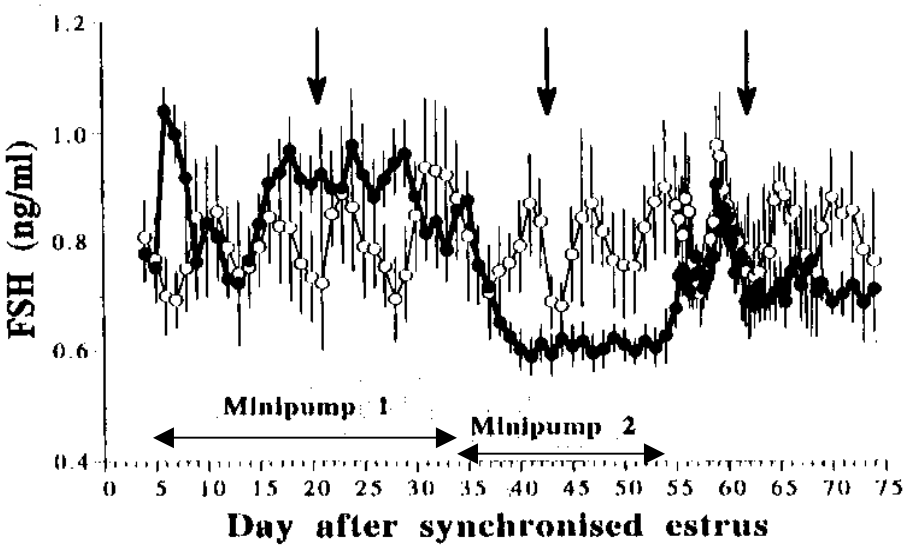


Figure 60 : Concentration plasmatique moyenne en FSH chez le groupe témoin (ronds creux) et chez les génisses traitées par un implant (minipump) délivrant 2,5 µg/h de busséréline (ronds pleins). Le premier implant est laissé en place 28 jours, et est remplacé par un second retiré après 20 jours. Les flèches indiquent les manifestations de chaleurs chez le lot témoin (Gong et al., 1996).

L'augmentation de la concentration de LH est capable d'induire l'ovulation du follicule dominant présent à ce moment, et des corps jaunes accessoires ont été observés suite à ce type de traitement dans toutes les différentes études lorsque la pose de l'implant était réalisée au 5ème jour du cycle (1er jour : jour de l'ovulation). Lorsque l'on renouvelle les implants, on n'observe plus d'augmentation des concentrations en gonadotrophines.

Dans une seconde phase, Gong et al. (1996) ont observé une inhibition de la sécrétion pulsatile de LH après environ 8 jours de traitement. La concentration en LH se maintient ensuite à un niveau basal constant pendant toute la durée du maintien des implants. Selon les auteurs on observe plus un changement du profil de sécrétion de la LH qu'un changement de la concentration circulante de LH. Pendant cette même période, des variations de la concentration en FSH comparables à des variations physiologiques sont observés et sont accompagnées de vagues de croissances folliculaires. Mais une des particularités de ces vagues folliculaires est que le follicule dominant n'excède jamais 7 à 9 mm de diamètre.

La dernière phase, après 40 jours de traitement, est caractérisée par une suppression de la sécrétion basale en FSH. À partir de ce moment la croissance des follicules n'excède plus 4 mm de diamètre.

Ces administrations d'agoniste ont ainsi permis de montrer que la croissance folliculaire jusqu'à 4mm de diamètre est donc indépendante des gonadotrophines chez les bovins, la croissance folliculaire de 4 à 9 mm nécessite une sécrétion pulsatile en FSH et la croissance au-delà de 9 mm nécessite en plus une sécrétion pulsatile en LH.

Au retrait des implants, la sécrétion en FSH retrouve très rapidement ses modalités physiologiques, en environ trois jours, alors que la sécrétion en LH n'est rétablie qu'après le cinq ou sixième jour après retrait des implants (Gong et al., 1996).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

ii.Effet de l'administration chronique d'un agoniste de la GnRH sur la croissance folliculaire

L'évolution des vagues folliculaires dans le cas de l'étude menée par Gong et al. (1996) a déjà été abordée avec l'évolution des concentrations en gonadotrophines et est résumée dans la figure 61.

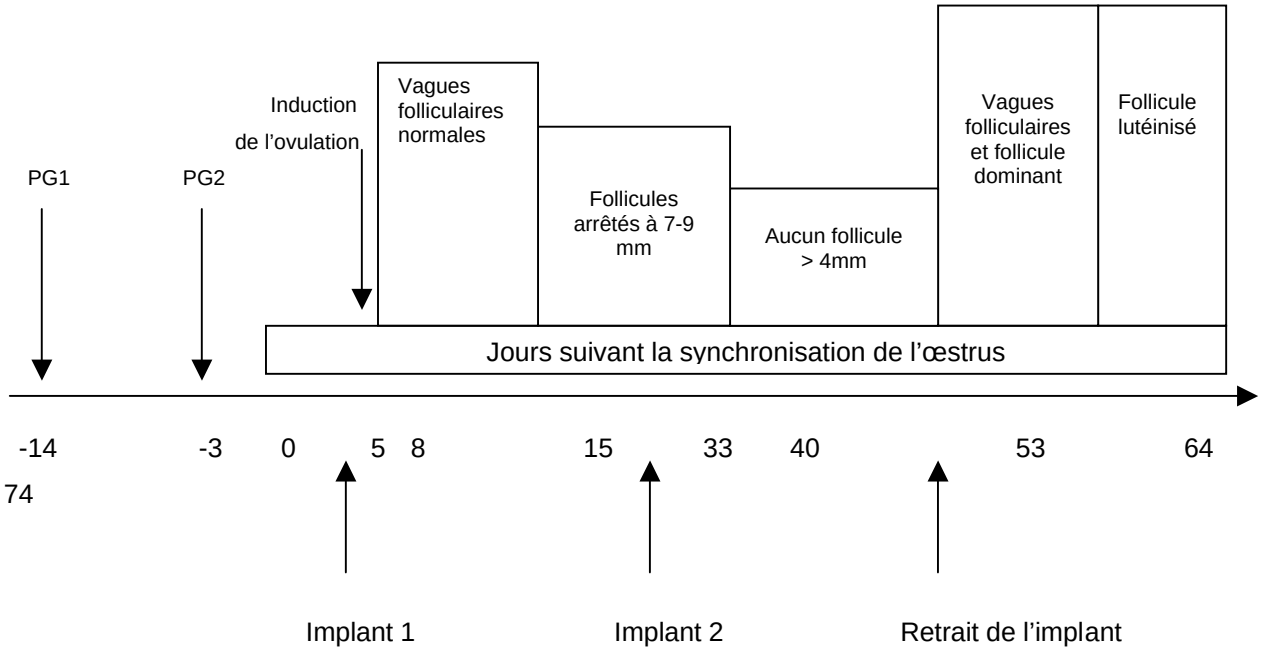


Figure 61 : Résumé schématique de la dynamique folliculaire chez les génisses traitées par 2 implants délivrant 2,5 µg/h de busséréline. Le premier implant est laissé en place 28 jours, et est remplacé par un second retiré après 20 jours. Résultats obtenus par examen échographique quotidien des ovaires. (PG = prostaglandine) (Gong et al., 1996).

Dans le cas de l'étude menée par Rajamahendran et al. (1998) utilisant des implants à base de desloréline sur une période plus courte, une seconde vague folliculaire a été observée suite à l'ovulation induite par la mise en place de l'implant (figure 62). Cette vague est apparue plus précocement que les vagues folliculaires apparaissant chez les animaux témoins ne recevant aucun traitement (les vagues folliculaires des deux lots d'animaux, témoins et traités, avait été synchronisées

avant le début de l'expérience). Mais l'intervalle entre la deuxième et la troisième vague folliculaire a été plus important chez les animaux traités avec un agoniste de la GnRH en administration chronique que chez les animaux témoins. Cet intervalle a été d'autant plus grand que la dose d'agoniste dans l'implant était élevée.

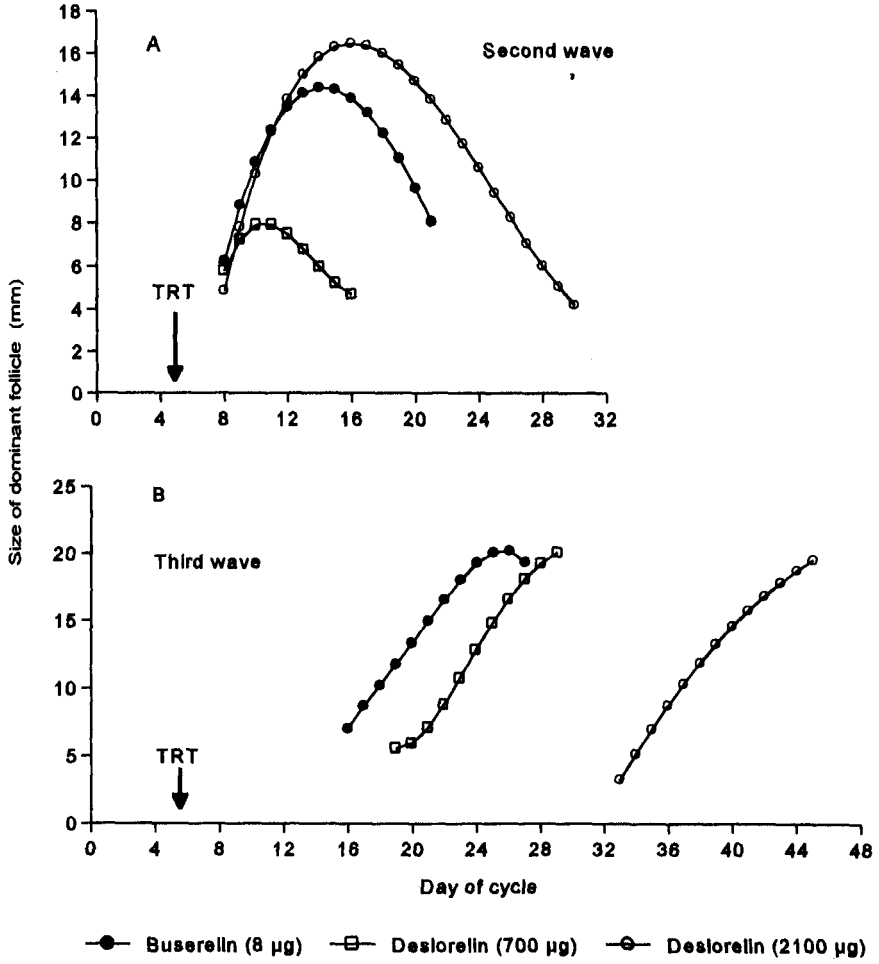


Figure 62 : Croissance et régression de la seconde vague de croissance folliculaire (A) chez les animaux traités avec de la busséréline (8 µg) ou de la desloréline (implants dosés à 700 et 2100 µg). Le traitement est administré au jour 5. Croissance de la troisième vague folliculaire chez ces mêmes animaux (B) (Rajamahendran et al., 1998).

iii.Effet de l'administration d'antagoniste de la GnRH sur l'ovulation

Les effets des antagonistes de la GnRH observés chez les rats de laboratoire (inhibition de la décharge ovulante de LH, perturbation des sécrétions hypophysaires et stéroïdiennes) ont été testées chez les bovins et les ovins.

Rieger et al. (1989) ont testé des administrations intraveineuses de doses variables de [Ac-D-Nal1, D-p-Cl-Phe2, D-Trp3, D-Arg6, D-Ala10]-LHRH, un antagoniste de la GnRH, chez des génisses Prim'Holstein cyclées et synchronisées.

Une première expérience a consisté en l'administration intraveineuse de l'antagoniste 12 heures après la première observation du comportement d'œstrus. Dans ce cas, tous les animaux ont ovulé mais l'intervalle entre le début de l'œstrus et l'ovulation a été significativement plus long pour les groupes traités que pour le groupe témoin avec un retardrus les2 6342395 Tm(roupes tlat40itionoravein1,6 mgisées.)TjETEM

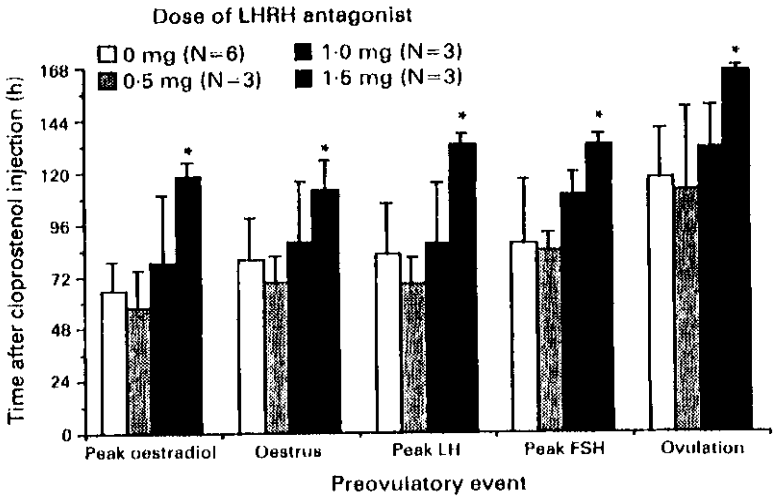


Figure 63 : Effets de différentes doses d'un antagoniste de la GnRH, injecté par voie intraveineuse à des génisses Prim'Holstein 48 et 60 h après une injection de cloprosténol, sur la date de l'œstrus, les pics de concentration en œstradiol, en LH et FSH et sur la date de l'ovulation. *p<0,05 comparé au groupe témoin (Rieger et al., 1989).

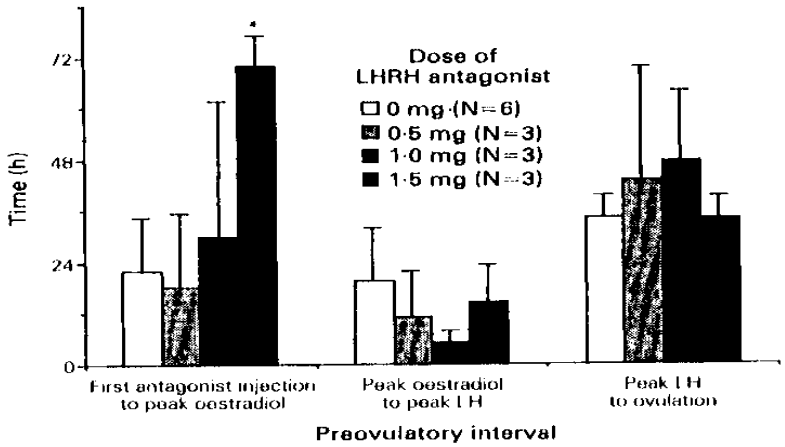


Figure 64 : Effets de différentes doses d'un antagoniste de la GnRH, injecté par voie intraveineuse à des génisses Prim'Holstein 48 et 60 h après une injection de cloprosténol : sur les intervalles entre la 1ère injection d'antagoniste et le pic de concentration en œstradiol, le pic de concentration en œstradiol et le pic de LH, le pic de LH et l'ovulation. *p<0,05 comparé avec le groupe témoin (Rieger et al., 1989).

Le même type d'expérience a été réalisé chez la brebis par Oussaid et al. (1999). Ils ont réalisé une injection sous-cutanée de 0,5 mg d'Antarelix®, un antagoniste de la GnRH, au début de l'œstrus sur des brebis cyclées et synchronisées. L'ovulation a été induite par injection intraveineuse de 3 mg de LH porcine 24 heures après. Toutes les brebis ont été saillies 36 et 48 heures après

l'œstrus et une collecte d'embryons a été réalisée. L'administration de l'antagoniste a induit une diminution de la concentration plasmatique en LH et une augmentation de la concentration en FSH, expliquée par la levée du rétrocontrôle négatif des œstrogènes sur la FSH. Le nombre d'embryons récoltés n'a pas été significativement différent entre le groupe témoin et le groupe traité, mais le nombre de blastocystes a été nettement réduit dans le cas du groupe traité ($p<0,0001$) (tableau XIII).

Dans une deuxième expérience, de la LH a été administrée de façon pulsatile toutes les heures pendant vingt-quatre heures en plus du protocole précédent. La concentration en œstrogènes a alors été restaurée et le pourcentage de blastocystes obtenus a été significativement plus élevé que dans le traitement avec antagoniste sans rétablissement des pulses de LH.

Chez la brebis cyclée, l'inhibition des pulses de LH 24 heures avant le pic préovulatoire de LH n'affecte donc pas l'ovulation dans les protocoles de fécondation in vitro mais est associée avec une chute des concentrations plasmatiques en œstrogènes et une diminution des capacités de développement embryonnaire.

Tableau XIII : Développement d'ovocytes *in vivo* 8 jours après l'injection sous cutanée (SC) de 0,5 mg d'Antarelix® réalisée aux début de l'œstrus sur des brebis. Différence entre a et b significative à p<0,0001 (Oussaid et al., 1999).

Traitement	n brebis	Nombre de corps jaunes	Nombre d'embryons récoltés (%)	Nombre d'ovocytes non fécondés ou d'embryons retardés (%)	Nombre de morulas (%)	Nombre de blastocystes (%)
Antarelix® (0,5 mg SC)	22	97	65 (67)	45 (69,2)	11 (17)	9a (13,8)
Témoin	20	77	52 (67,5)	0	4 (7,6)	48b (92,3)

iv.Effet de l'administration chronique d'un agoniste de la GnRH sur la concentration en progestérone

Là aussi, les résultats des études de Rajamahendran et al. (1998), Gong et al. (1995 et 1996) sont convergents. L'insertion des implants contenant un agoniste de la GnRH provoque une augmentation de la concentration en progestérone dans les 24 heures, concentration qui atteint des niveaux significativement supérieurs chez les animaux traités avec un agoniste de la GnRH que chez les animaux du groupe témoin (Gong et al., 1995 ; Rajamahendran et al., 1998). Cette concentration en progestérone diminue ensuite jusqu'à la limite de détection de leur système de dosage. Cette faible concentration a été maintenue pendant toute la durée du maintien des implants (figure 65). Cette diminution est à mettre en rapport avec la régression observée par échographie des corps jaunes induits et accessoires. Suite au retrait des implants, une augmentation de la concentration en progestérone a été observée dans les dix à quinze jours suivant le retrait et était corrélée à la présence d'un corps jaune sur les ovaires des bovins traités.

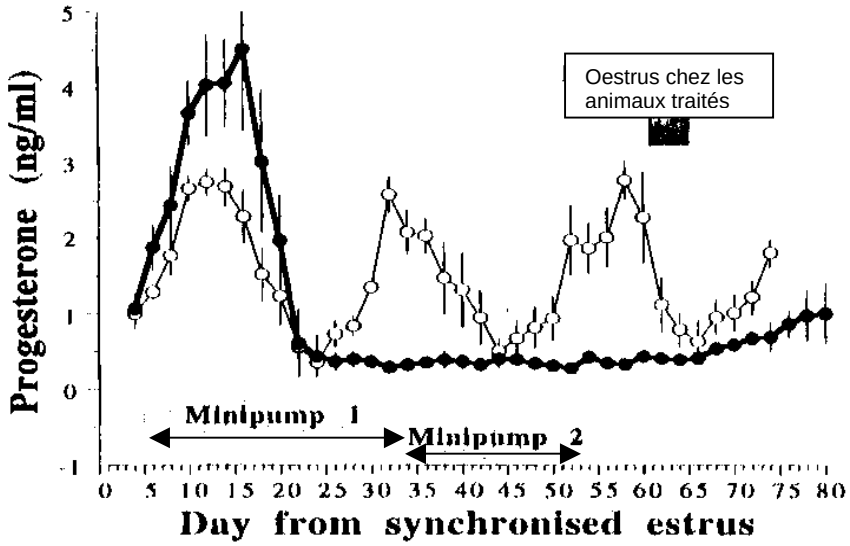


Figure 65 : Concentration plasmatique moyenne en progestérone chez le groupe témoin (ronds creux) et chez les génisses traitées par des implants (minipump) délivrant 2,5 µg/h de busséréline (ronds pleins). Le premier implant est laissé en place 28 jours, il est remplacé par un second retiré après 20 jours (Gong et al., 1996).

b.Chez le bovin mâle.

i.Effet de l'administration chronique d'un agoniste de la GnRH sur les concentrations en gonadotrophines.

Différentes équipes ont étudié l'évolution des concentrations en gonadotrophines chez le bovin mâle soumis à une administration chronique d'un agoniste de la GnRH. Leurs études sont concordantes (Aspden et al., 1996 et 1997a ; Bergfeld et al., 1996a ; D'Occhio et al., 1996a).

Un premier protocole a utilisé des bouvillons (bovins mâles castrés de 30 mois) traités avec 5 implants de desloréline délivrant en moyenne 250 µg/j d'un agoniste de la GnRH pendant quarante-deux jours (Aspden et al., 1996). Pendant ce traitement, les concentrations en LH et FSH ont diminué puis se sont maintenues à un niveau significativement plus bas que dans le groupe témoin, à partir du quatrième jour de traitement pour la LH et du septième jour pour la FSH (figure 66). La concentration en LH des cellules gonadotropes de l'hypophyse a diminué, celle de FSH n'a pas été affectée. Les concentrations en ARNm des gonadotrophines, dans les cellules gonadotropes de l'hypophyse, ont été modifiées par le traitement : diminution significative de la concentration des ARNm des sous unités béta des deux gonadotrophines, alors que la concentration en ARNm de la sous unité alpha n'a pas été pas affectée (figure 67). Donc chez les animaux castrés, l'administration chronique d'un agoniste de la GnRH entraîne une diminution de la synthèse et/ou de la libération de FSH et de LH.

Rapport-Gratuit.com

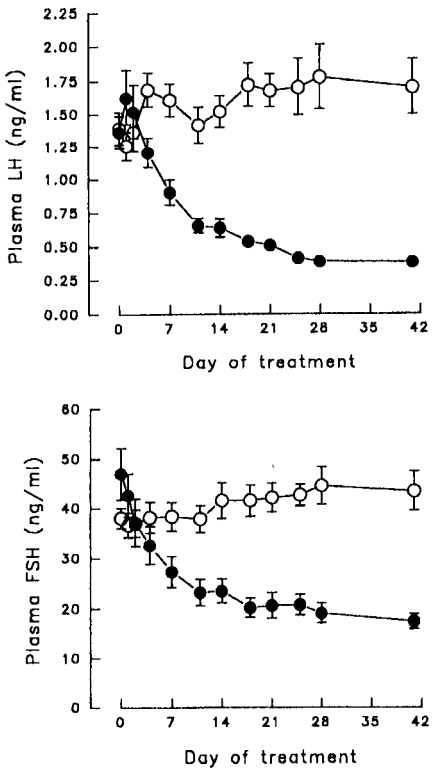


Figure 66 : Concentrations plasmatiques en LH et FSH dans le groupe témoin (ronds creux) et dans le groupe de bouvillons traité avec un implant de desloréline (Aspden et al., 1996).

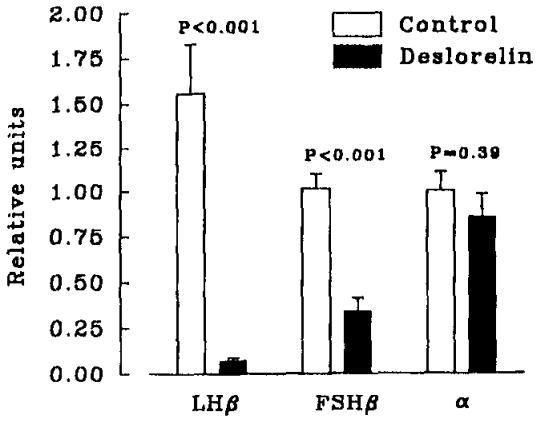


Figure 67 : Concentration pituitaire en ARNm des sous unités béta et alpha de LH et FSH chez les bouvillons traités par un implant de desloréline par rapport au lot témoin (control) (Aspden et al., 1996).

Ces résultats sont à mettre en parallèle avec ceux de Bergfeld et al. (1996a) et D'Occhio et al. (1996a) obtenus sur des taurillons (bovins mâles non castrés de 13

mois) pour lesquels, pendant toute la durée de traitement avec le même agoniste de la GnRH, la concentration moyenne en LH est comparable à celle des animaux témoins mais la sécrétion observée n'est plus pulsatile (figure 68).

Pendant les huit jours qui ont suivi le retrait des implants, la concentration plasmatique en LH a diminué. La sécrétion pulsatile de LH s'est rétablie ensuite à une concentration moyenne identique à celle du groupe témoin.

Pendant toute la période du maintien des implants et pendant une durée variable après leur retrait, l'hypophyse est restée insensible aux injections de GnRH naturelle, exogène (absence de réponse avec un pulse de LH). Les résultats sont identiques à ceux observés chez des mâles castrés pour les concentrations intrahypophysaires en gonadotrophines et en ARNm codant pour celles-ci (Aspden et al., 1997b). Ceci montre que la régulation de la production d'ARNm des gonadotrophines dans les cellules gonadotropes de l'hypophyse est indépendante du rétrocontrôle gonadique puisque les modifications ont aussi été observées sur les animaux castrés.

En bilan, pendant toute la durée du traitement avec un agoniste de la GnRH chez les bovins mâles non castrés, l'hypophyse est insensible à des stimulations exogènes par d'autres agonistes de la GnRH. Mais l'hypophyse maintient une sécrétion non pulsatile de LH à des concentrations moyennes identiques à celles des animaux non traités alors qu'à l'arrêt du traitement, cette sécrétion diminue et l'hypophyse reste insensible pendant une période d'environ 8 jours. Il y aurait l'association d'une désensibilisation et d'une stimulation continue des cellules gonadotropes de l'hypophyse pendant la période du traitement. A l'arrêt du traitement, la stimulation continue disparaîtrait mais les cellules gonadotropes seraient réfractaires aux stimulations physiologiques et exogènes.

L'ensemble de ces observations montre que la désensibilisation de l'hypophyse des bovins mâles au cours d'un traitement chronique avec des agonistes de la GnRH n'est pas classique et est mal expliquée. Une action directe des agonistes de la GnRH sur les testicules ou un rétrocontrôle particulier des androgènes sont à envisager pour expliquer les différences observées entre les mâles castrés et non castrés.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

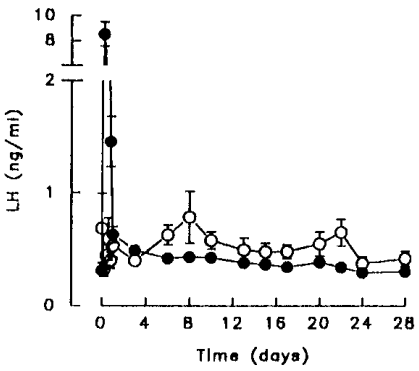


Figure 68 : Concentrations plasmatiques en LH dans le groupe témoin (ronds creux) et dans le groupe de taurillons traités avec un implants de desloréline (Bergfeld et al., 1996a).

ii.Effet de l'administration chronique d'un agoniste de la GnRH sur la concentration en testostérone.

L'évolution de la concentration plasmatique en testostérone chez des bovins mâles soumis un traitement chronique avec un agoniste de la GnRH a été étudié par Bergfeld et al. (1996a) et D'Occhio et al. (1996a). Ils ont soumis des taurillons (jeunes bovins mâles non castrés) à un traitement utilisant un implant de desloréline. Ils ont dans les deux cas observé suite à l'administration de l'implant une augmentation immédiate et significative de la concentration moyenne en testostérone chez les animaux traités. Cette concentration supérieure s'est maintenue pendant tout le temps du traitement (figure 69). Après retrait des implants, une chute de la concentration de testostérone à des taux inférieurs à ceux des animaux témoins a été observée dans les huit jours suivant le retrait. Puis cette concentration a à nouveau augmenté progressivement jusqu'à revenir un niveau comparable à celui des animaux témoins entre 16 et 20 jours après l'arrêt du traitement.

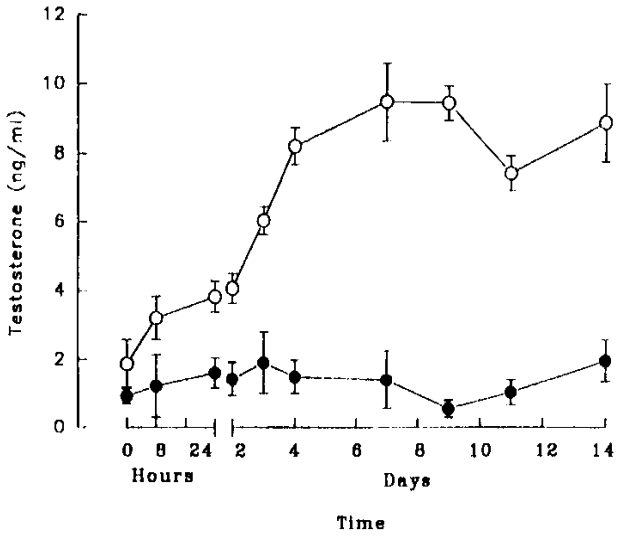


Figure 69 : Concentrations plasmatiques en testostérone chez des taureaux témoins (ronds pleins) et chez des taureaux traités par un implant de desloréline (ronds vides). Résultats en moyenne +/- SEM (n=5) (D'Occhio et al., 1996a).

Ce comportement de la testostérone suite au retrait des implants est comparable à celui observé pour la LH étudié dans le paragraphe précédent. Il n'y a pas encore une explication certaine de la raison pour laquelle une concentration moyenne égale en LH chez les animaux traités avec un implant d'agoniste de la GnRH et chez les animaux témoins s'accompagne d'une concentration significativement plus élevée en testostérone chez les animaux traités. Une des hypothèses explicatives est que dans le cas des animaux traités, la sécrétion hypophysaire en LH est continue dans le temps alors qu'elle est réalisée de façon pulsatile chez les animaux témoins. Or Melson et al. (1986) ont démontré que sous un traitement chronique avec un agoniste de la GnRH, la sécrétion de LH est réalisée sur un mode continu chez le taureau et s'accompagne d'une augmentation du nombre de récepteurs à la LH sur les cellules de Leydig. La pulsatilité de la sécrétion de LH serait donc nécessaire, chez le taureau ou le taurillon, au maintien d'un nombre physiologique de récepteurs à la LH sur les cellules de Leydig et au maintien de concentrations physiologiques en testostérone chez ces animaux.

4.Utilisation des analogues de la GnRH en reproduction assistée chez les ruminants.

a.Utilisation d’un antagoniste de la GnRH dans un protocole de superovulation chez la chèvre

L'amélioration génétique de l'espèce caprine utilise en partie les mêmes biotechnologies de la reproduction que l'espèce bovine (insémination artificielle, superovulation, fécondation in vitro et production d'embryons). La méthode de reproduction assistée classique chez les chèvres utilise des éponges délivrant de la progestérone pour synchroniser les œstrus. Les chèvres sont inséminées après le retrait des éponges avec une réussite d'environ 60 % (Baril et al., 1996). Cependant, dans les protocoles de superovulation avec insémination artificielle et récolte des embryons, la réussite n'est pas aussi bonne. La détérioration des résultats serait en partie due à la mauvaise détermination du moment de l'ovulation. Une des solutions pour améliorer les résultats est de multiplier les inséminations qui suivent le retrait du traitement à la progestérone. Mais cette solution, bien qu'elle offre des résultats satisfaisants, s'avère trop contraignante.

La possibilité d'obtenir une meilleure synchronisation de l'ovulation permettrait de limiter le nombre d'inséminations et de rendre ces protocoles plus pratiques. Une façon de synchroniser l'ovulation est de la déclencher par une administration de LH exogène. Cette méthode n'est utilisable que si l'administration se situe avant la décharge ovulante physiologique de LH. La possibilité d'inhiber cette décharge ovulante permet d'être sûr que l'ovulation ne sera déclenchée que par l'administration de la LH exogène. Les analogues de la GnRH permettent cette action, en inhibant directement la sécrétion des gonadotrophines dans le cas des antagonistes ou en désensibilisant l’hypophyse à la GnRH dans le cas d'une administration chronique d'un agoniste de la GnRH.

Baril et al. (1996) ont testé un protocole associant :

-des éponges intravaginales délivrant de la progestérone pour synchroniser les animaux

-une injection de cloprosténol pour lyser le ou les corps jaunes présents.

-des injections successives de FSH (20 µg) et de pLH (66 µg) pour stimuler la croissance folliculaire (pLH = LH d’origine porcine)

-une injection sous cutanée d'un antagoniste de la GnRH (Antarelix® à la dose de 0,5 mg) pour inhiber la décharge ovulante de LH endogène.

-une injection intraveineuse massive de LH (3 mg) pour déclencher l'ovulation.

Le protocole est détaillé dans la figure suivante (figure 70).

J 0		Mise en place de l'éponge intravaginale contenant 45 mg d'acétate de fluorogestone.
J 9	7h	40 µg FSH + 50 µg cloprosténol
	19h	40 µg FSH
J 10	7h	20 µg FSH
	19h	20 µg FSH
J 11	7h	20 µg FSH + 66 µg pLH + Retrait de l'éponge.
	19h	20 µg FSH + 66 µg pLH + 0,5 mg Antarelix®
J 12	03h	20 µg FSH + 66 µg pLH
	11h	20 µg FSH + 66 µg pLH
	19h	3 mg pLH (voie intraveineuse)
J 13	11h	Insémination artificielle par laparoscopie

Figure 70 : Traitement de superovulation chez la chèvre utilisant une insémination à heure fixe et un antagoniste de la GnRH (Antarelix®)(Baril et al., 1996).

Avec ce protocole, aucune décharge ovulante de LH n'a été observée. L'insémination a été réalisée 16 heures après l'injection de LH et un nombre similaire d'embryons transférables a été obtenu par rapport à la méthode utilisant une insémination artificielle en fonction de la survenue de l'œstrus (tableau XIV). Ce nouveau protocole permet donc de réaliser les inséminations en aveugle sans aucun contrôle du comportement d'œstrus chez les animaux.

Tableau XIV : Nombre d'embryons collectés et nombre de noyaux par embryon par stade de développement embryonnaire sur des embryons collectés après traitement de superovulation de routine ou incluant un antagoniste de la GnRH (Antarelix®) chez la chèvre (Baril et al., 1996).

Développement embryonnaire	Traitement de superovulation					
	Routine			Avec Antarelix®		
	Nombre d'embryons	Nombre de noyaux/embryon		Nombre d'embryons	Nombre de noyaux/embryon	
		Moyen	Intervalle		Moyen	Intervalle
Morula précoce	5	15	11-19	8	17,3	14-23
Morula	9	48	29-85	38	38,1	15-94
Blastocyste	4	60	44-74	26	87,2	52-116
Blastocyste expansé	6	110	60-151	11	126,1	95-164
Blastocyste sans zone pellucide	8	179	109-270	1	158	/

b.Utilisation d’implants d’agoniste de la GnRH dans des protocoles de superovulation chez la génisse.

Comme dans l'espèce caprine précédemment évoquée, les protocoles de superovulation sont utilisés dans l'espèce bovine dans les schémas d'amélioration génétique. Les protocoles classiques de superovulation consistent en une synchronisation des cycles ovariens des bovins à l'aide d'implants contenant de la progestérone et en une stimulation de la croissance des follicules par des administrations de FSH. Suite à ces traitements, une insémination artificielle est réalisée, suivie d'une récolte des embryons formés. Une grande variabilité des résultats est observée dans ce type de protocole. En particulier, l'ensemble des follicules stimulés par les injections répétées de FSH n'ovulent pas (D'Occhio et al., 1997). Une des explications est que la décharge ovulante de LH survient trop précocement dans la croissance de ces follicules pour que ceux-ci puissent ovuler normalement. La possibilité de maîtriser le déclenchement de l'ovulation permettrait ainsi d'obtenir des temps de maturation folliculaire suffisants et donc des nombres d'ovocytes produits plus importants. Les agonistes de la GnRH en administration continue permettent d'obtenir une désensibilisation de l'hypophyse à la GnRH produite par l'hypothalamus. Ainsi ils inhibent indirectement la décharge ovulante physiologique de LH. L'ovulation peut donc être déclenchée par une administration de LH exogène comme nous l'avons déjà abordé pour l’espèce caprine.

D'Occhio et al. (1997 et 1998) ont testé différents protocoles de superovulation chez la génisse. Dans une étude menée en 1997 ils ont testé un protocole associant :

-un implant contenant un agoniste de la GnRH (desloréline) pour inhiber la décharge ovulante de LH.

-un implant de norgestomet pour synchroniser les cycles ovariens et pour inhiber la décharge ovulante de LH.

-des injections successives de FSH pour stimuler la croissance folliculaire.

-une injection intramusculaire de LH pour déclencher l'ovulation.

-une insémination artificielle au moment de l'injection de LH, répétée 12 et 24 heures après.

Ils ont comparé ce protocole avec un protocole de superovulation classique incluant une insémination à la fin de l’œstrus et deux autres 12 et 24 heures après.

Les résultats qu'ils ont obtenus en termes de nombre et de qualité d'embryons transférables sont à peu près identiques pour les deux protocoles avec un avantage pour celui avec agoniste (tableau XV). Mais le protocole utilisant un implant d'agoniste de la GnRH dispense de l'observation de l'œstrus (celui-ci apparaît suite à la mise en place de l'implant). Ils ont jugé que des études ultérieures seraient à mener pour préciser la dose et le moment optimal pour l'injection de LH.

Tableau XV : Nombre et caractéristiques des embryons et états des ovaires suite à deux types de protocole de superovulation chez la génisse. Protocole du groupe A, classique (implant de progestagène, stimulations à la FSH et insémination sur chaleurs observées), protocole du groupe B utilisant en plus un implant de desloréline (agoniste de la GnRH), une injection de LH pour déclencher l'ovulation et trois inséminations à heure fixe (D'Occhio et al., 1997).

	Nombre total d'embryons collectés	Nombre d'embryons transférables	Nombre de follicules n'ayant pas ovulé
Groupe A	11,0 ± 2,8 (6)	*5,8 ± 1,8 (6)	*10,3 ± 3,5 (6)
Groupe B	15,2 ± 1,4 (5)	*7,3 ± 2,1 (4)	*5,6 ± 1,7 (5)

Résultats en moyennes +/- SEM et significativement différents à *$p<0.05$ dans une même colonne. Les valeurs entre parenthèses sont les effectifs de génisses.

Suite à cette première étude, ils ont testé le même type de protocole sans implant de norgestomet (D'Occhio et al., 1997). Le protocole précis est présenté dans la figure 71.

Dans ce dernier protocole, l'injection de LH destinée à provoquer l'ovulation est réalisée douze heures après le moment de la décharge physiologique de LH endogène. Le fait de retarder l'ovulation a permis d'obtenir une proportion plus importante de follicules mûrs capables de répondre au stimulus de l'ovulation. Suite à l'ovulation, ces génisses ont présenté des taux de progestérone plasmatique supérieurs à ceux du lot témoin mais il n'a pas été précisé si ces taux supérieurs étaient à relier à un nombre plus important de corps jaunes ou à des corps jaunes plus actifs.

Comparé au protocole précédemment testé, ils ont montré que l'implant contenant l'agoniste de la GnRH seul était capable d'inhiber la décharge ovulante de LH et qu'un implant contenant un progestagène n'était pas nécessaire. Par rapport au protocole classique n'utilisant pas un implant d'un agoniste de la GnRH, ils ont obtenu une meilleure synchronisation des ovulations (tableau XVI). Pour eux des études ultérieures seraient à mener pour affiner cette synchronisation et limiter le nombre d'inséminations artificielles nécessaires. Dans l'état actuel, ce protocole offre toujours l'avantage de permettre des inséminations à heures fixes sans observation du comportement d'œstrus chez les génisses, mais des études statistiquement plus rigoureuses seraient à mener pour conclure sur les avantages réels de ces nouveaux protocoles.

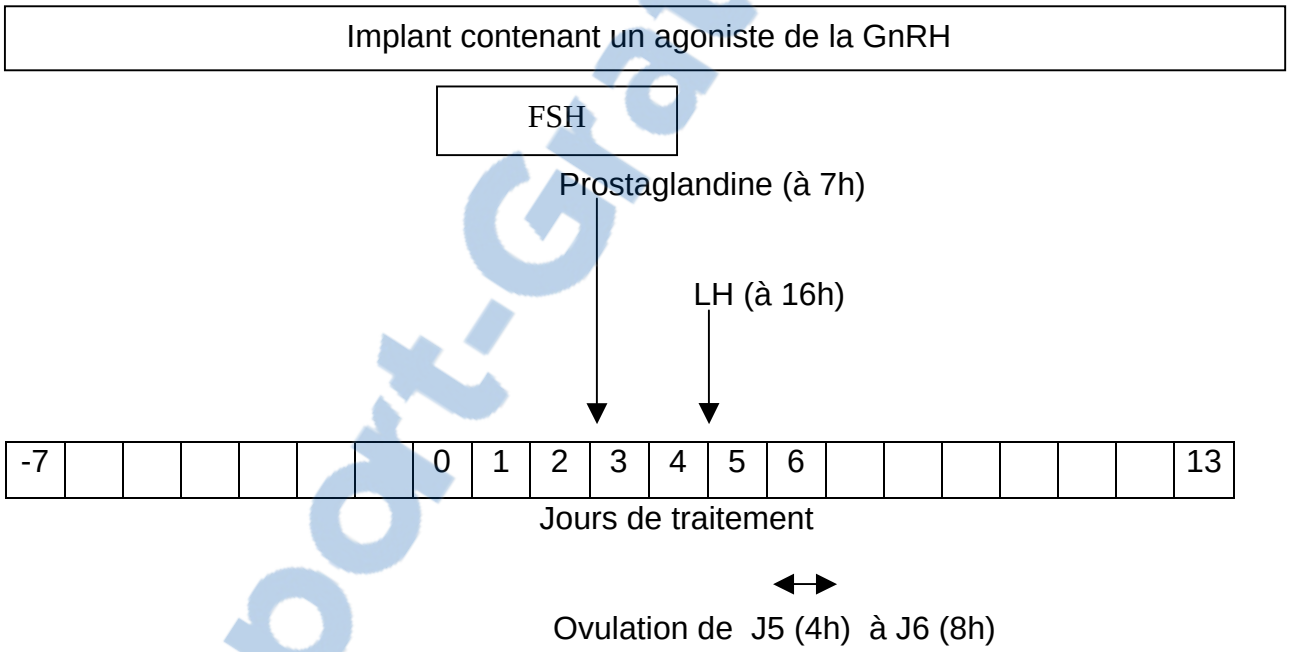


Figure 71 : Protocole de superovulation utilisant un implant d'un agoniste de la GnRH chez la génisse (implant auriculaire de desloréline). Stimulation folliculaire par deux injections intramusculaires quotidiennes de FSH aux doses de 40 mg à J0, 30 mg à J1, 20 mg à J2, 10 mg à J3 (D'Occhio et al., 1997).

Tableau XVI : Proportion cumulée de génisses ayant ovulé après un traitement avec de la FSH de J0 à J3, une injection de prostaglandine à J2 (7h) et retrait de l'implant de norgestomet à J2 (6h) pour le groupe témoin. Les génisses du groupe traité ont un implant de desloréline depuis J-7, un traitement FSH et prostaglandine identique mais une injection de LH à J4 (4h) (D'Occhio et al., 1998).

Rapport-Gratuit.com

Jour du protocole et heure	Témoins	Traités (agoniste GnRH-LH)
J5 0h	0/8[a]	0/8 [a]
J5 8h	2/8 [a]	0/8 [a]
J5 16h	5/8 [a]	0/8[b]
J6 0h	6/8 [a]	4/8 [a]
J6 8h	7/8 [a]	7/8 [a]
J6 16h	7/8 [a]	7/8 [a]

a,b : les proportions d'une même ligne et d'exposant différents sont significativement différentes à $p<0,05$.

c.Utilisation d'implants contenant un agoniste de la GnRH dans un protocole de synchronisation des chaleurs pour insémination artificielle sur des vaches subfertiles en lactation.

Chez la vache laitière, une des causes de la mortalité embryonnaire précoce serait l'insuffisance de la concentration plasmatique en progestérone, particulièrement chez les animaux à faibles notes d'état. La possibilité d'induire la formation de corps jaunes sécrétant une quantité suffisante de progestérone permettrait de limiter ces mortalités embryonnaires précoces (Ambrose et al., 1998). L'étude de Rajamahendran et al. (1998) a montré que l'utilisation d'implants contenant un agoniste de la GnRH (desloréline) administrés au cinquième jour du cycle (premier jour du cycle = début de l'œstrus) pouvait induire la formation de corps jaunes accessoires chez des vaches n'assurant pas de lactation. La formation de ces corps jaunes accessoires est accompagnée d'une concentration plasmatique en progestérone supérieure aux animaux non traités.

Afin d'évaluer l'effet éventuellement positif sur la fertilité des vaches en lactation d'un implant contenant un agoniste de la GnRH, Ambrose et al. (1998) ont testé les protocoles suivants sur 16 vaches Prim'Holstein multipares à 60 ± 3 jours de lactation et de note d'état de 2,25 (sur une échelle allant de 1 à 5) et de stade du cycle ovarien totalement inconnu.

Ces 16 bovins ont reçu :

-à J-9 une injection intramusculaire de cystoréline (agoniste de la GnRH, 100 µg)

-à J-2 une injection intramusculaire de luprostiol (prostaglandine F 2 alpha, 25 mg)

Ensuite à J0 :

-soit une nouvelle injection de cystoréline (concerne un 1er sous groupe de 8 vaches).

-soit la pose d'un implant sous cutané de desloréline dosé à 700 µg (concerne un 2ème sous groupe de 8 vaches).

Tous les animaux ont été inséminés 16h après ces dernières interventions et sans observation des chaleurs.

Une partie des résultats obtenus est résumée dans le tableau XVII. Tous les animaux traités par un implant de desloréline ont eu une première phase de vague folliculaire retardée par rapport aux autres et une concentration plasmatique en progestérone supérieure du jour de l'insémination jusqu'à 16 jours après ($p<0,01$).

L'ovulation induite par la pose d'un implant contenant un agoniste de la GnRH permettrait une meilleure maturation folliculaire et l'établissement d'un corps jaune plus fonctionnel. Ce traitement semble favorable à la réussite en insémination chez des animaux en mauvais état d'engraissement sans observation des chaleurs. Des travaux futurs leur semblent nécessaires pour préciser les doses des différents principes actifs.

Tableau XVII : Ovulations simples ou doubles et gestations confirmées 28 jours après insémination chez des vaches en lactation à 2,25 de note d'état avec un traitement soit cystoréline-cystoréline, soit cystoréline-implant de desloréline et insémination 16h après la dernière injection (Ambrose et al., 1998).

	Nombre de vaches ayant ovulé (%)	Nombre d'ovulations doubles (%)	Nombre de gestations confirmées 28 jours après insémination (%)
Groupe cystoréline-cystoréline	5/8 (62,5+/-12,9%)	0/8 (0%)	1/8 (12,5+/-15,6%)

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Groupe cystoréline-desloréline	8/8 (100%) p<0,06	3/8 (37,5+/-12,9%) p<0,06	5/8 (32,5+/-15,6%) p<0,04

d.Réduction de l'anœstrus post partum chez la vache allaitante par un implant contenant un agoniste de la GnRH.

La période d'anœstrus post partum de la vache allaitante est supérieure à celle de la vache laitière. Une réduction de cette période permet de réduire l'intervalle entre vêlages et de se rapprocher d'une production d'un veau par vache par an. Cet anœstrus est dû à une absence d'activité ovarienne. La reprise de l'activité ovarienne s'accompagne d'une augmentation de la concentration moyenne en LH et d'une augmentation de la fréquence des sécrétions de LH par l'hypophyse.

La possibilité de stimuler cette activité avec des agonistes de la GnRH en administrations ponctuelles a déjà été testée suivant divers protocoles, mais les stimulations obtenues ont abouti à la production de corps jaunes de courte durée de vie, incompatibles avec un maintien de la gestation chez l'animal (D'Occhio et al., 1989 ; Roberts et al., 1989).

L'utilisation d'implants délivrant un agoniste de la GnRH a été testée par différentes équipes qui ont obtenu des résultats divergents (D'Occhio et al., 1989 ; Roberts et al., 1989 ; Roberge et al., 1992). Roberts et al. (1989) ont obtenu suite à des injections d'un agoniste de la GnRH en microcapsules une augmentation de la concentration plasmatique en LH mais pas de réduction de la période d'anœstrus post partum. D'Occhio et al. (1989) ont implanté des mini-pompes osmotiques délivrant de la buséréline à des vaches non cyclées : ce traitement a entraîné une augmentation des concentrations en LH comme dans l'étude précédente et des ovulations qui ont abouti à des corps jaunes de durée de vie anormalement courte. Ces deux équipes ont conclu leurs études en indiquant que la reprise de l'activité ovarienne en période d'anœstrus post partum n'était pas dépendante uniquement

d'une augmentation de la concentration plasmatique en LH, mais que les modalités de cette sécrétion et de celle de la FSH seraient à étudier plus précisément.

Une dernière étude plus récente a, elle, obtenu des résultats positifs dans l'administration de microcapsules d'un agoniste de la GnRH chez des vaches allaitantes (Roberge et al., 1992). Ils ont administré ce traitement à 23 vaches allaitantes de race Angus à cinq jours post partum. Grâce à ce traitement ils ont observé une réduction significative de l'intervalle entre le vêlage et les premières manifestations d'œstrus, mais l'intervalle entre le vêlage et la première insémination fécondante n'a pas été significativement réduit chez les animaux traités (tableau XVIII). L'étude des profils de sécrétion des gonadotrophines a montré qu'immédiatement suite à l'injection des microcapsules de l'agoniste de la GnRH, il y a une augmentation des concentrations en LH et FSH mais ensuite on n'observe aucune augmentation des concentrations moyennes de ces gonadotrophines de 10 à 40 jours post partum par rapport aux animaux témoins, alors que l'étude de la fréquence des pulses de LH montre que celle-ci est significativement supérieure 10 et 30 jours post partum chez les animaux traités par rapport aux animaux témoins. Ce deux derniers résultats divergent par rapport aux deux travaux précédemment cités. Des études ultérieures portant notamment sur différentes doses d'agoniste seraient à réaliser car cette dernière étude utilise une dose nettement plus faible que les deux précédentes.

Tableau XVIII : Nombre de jours post partum jusqu'au premier œstrus et jusqu'à l'insémination fécondante chez des vaches allaitantes Angus traitées au 5ème jour post partum avec un agoniste de la GnRH en microcapsules (Roberge et al., 1992).

	Traitement postpartum		Différence en jours
	Témoins (n = 31)	Agoniste de la GnRH en microcapsules (n = 23)	
Nombre de jours post partum jusqu'au premier œstrus	55,9 +/- 4,7	43,7 +/- 4,2	12,2*
Nombre de jours post partum jusqu'à l'insémination fécondante	76,9 +/- 7,9	68,9 +/- 7,9	7,8

Résultats exprimés en moyennes +/- SE. Différence significative à *p<0,05.

e.Contraception chez la génisse pour contrôler la période de mise à la reproduction.

L'élevage de bovins allaitants en grands lots d'animaux pose d'importants problèmes de maîtrise de la reproduction. En effet ce type d'élevage mélange des animaux de classes d'âge différentes et de sexes différents. La maîtrise des taureaux étant difficile dans ce type d'élevage extensif, la possibilité d'avoir des moyens de contraception sur les génisses, voire les vaches, permet de maintenir les taureaux en présence de ces femelles pendant toute l'année tout en ayant une période de reproduction définie.

L'administration chronique des agonistes de la GnRH perturbe l'activité ovarienne comme nous l'avons déjà abordé. La possibilité d'arrêter pendant un laps de temps donné et de façon réversible les croissances des vagues folliculaires des bovins est un moyen de contraception qui peut être réalisé à l'aide d'implants délivrant de façon continue des agonistes de la GnRH. D'Occhio et al. (1996b et 2000) ont réalisé différentes études dans ce but. En 1996, ils ont montré que des implants contenant de la buséréline ou de la desloréline étaient capables d'inhiber de façon réversible la croissance des vagues folliculaires chez des génisses. L'homogénéité du retour en activité des ovaires a été meilleure lorsque que le retrait de l'implant était réalisé avant la fin de son action, plutôt que lorsque l'on laissait celui-ci en place. Ces auteurs suggèrent que les génisses se comportaient de façon assez homogène face à ce type de traitement, mais que les caractéristiques pharmacologiques des implants utilisés n'étaient pas constantes.

Des travaux plus récents (D'Occhio et al., 2000) réalisés sur des génisses et vaches croisées Zébu ont montré un effet contraceptif efficace pendant 230 à 330 jours chez ces animaux mis en pâture en présence de taureaux (deux durées pour deux doses différentes de l'agoniste). L'effet contraceptif est bien dû à un arrêt des vagues folliculaires et à l'inhibition des ovulations et cet effet est fonction du dosage des implants (tableau XIX). À la fin du traitement, la réversibilité a été totale et des gestations normales ont été observées. Ce type de traitement pourrait très bien

s'inscrire à l'avenir dans la gestion de grands troupeaux d'animaux, car il permet suite à l'administration du traitement de maintenir des animaux de classes d'âge différentes et des sexes différents sur les mêmes pâtures tout en sachant de façon suffisamment précise à quelle date vont se réaliser les accouplements et donc à quelle date vont être regroupées les mises bas. D'autre part ce type de traitement pourrait très bien être administré à des génisses de façon à éviter que celles-ci ne soient saillies de façon trop précoce.

Tableau XIX : Paramètres de reproduction de génisses observées après un traitement de 12 mois par des implants sous cutanés de desloréline. Génisse de 26 mois d'âge au début du traitement et en élevage extensif en présence de taureaux pendant toute la durée du traitement (D'Occhio et al., 2000).

Paramètres de reproduction	Dose de l'agoniste de la GnRH dans l'implant			Génisses témoins
	Faible	Moyenne	Elévée	
Taille des follicules				
Petits (<5 mm)	1/48 (2%)	10/48 (20%)	37/45 (77%)	_
Moyens (6-9 mm)	1/48 (2%)	0/48 (0%)	1/45 (2%)	_
Grands (>10 mm)	6/48 (12%)	10/48 (20%)	3/45 (6%)	_
Corps jaunes	4/48 (8%)	2/48 (4%)	1/45 (2%)	_
Gestations	36/48 (75%)	25/48 (52%)	3/45 (6%)	44/47 (93%)

En conclusion de cette partie concernant les ruminants, il apparaît tout d'abord que le comportement des bovins mâles et femelles face aux administrations chroniques d'analogues de la GnRH n'est pas encore cerné. La désensibilisation de l'hypophyse et l'éventuelle mise en jeu de récepteurs à la GnRH autres qu'hypophysaires reste à préciser. Dans le cadre de l'inhibition de la production des gonadotrophines par les analogues de la GnRH, des résultats prometteurs on été obtenus avec des protocoles de superovulation et de contraception. Comme chez l'humain et les carnivores, les antagonistes apparaissent intéressants dans ce type d'utilisation et pourraient chez les bovins permettre un contrôle très précis de l'ovulation.

Les agonistes en administrations chroniques dans un but de stimulation continue de l'hypophyse pour réduire l'anœstrus post partum ou favoriser la survie du corps jaune de gestation n'ont pas encore donné de résultats satisfaisants chez les bovins.

C.Utilisation d’implants contenant des analogues de la GnRH chez la jument.

1.Rappels de physiologie de la reproduction équine.

La puberté chez la jument apparaît à des âges différents en fonction de la saison de sa naissance. Une jument née en janvier-février sera pubère l'été suivant sa naissance, à l'âge de 18 mois, alors qu'une jument née en mai-juin ne sera pubère qu'à l'âge de deux ans. Le cheval est une espèce à cycles de reproductions de type de polyœstriens saisonniers. L'activité sexuelle est maximale pendant la période d'éclairement maximal c'est-à-dire en juin, juillet et août dans l'hémisphère nord et décembre, janvier et février dans l'hémisphère sud. En France la saison de monte officielle s'étend du 15 février au 15 juillet et ne correspond donc pas à la période physiologique habituelle de fertilité.

En saison de reproduction, la durée du cycle sexuel moyen d'une jument est de 21 jours. La durée de l’œstrus s'étend de 3 à 12 jours avec une moyenne de 6 à 7 jours. Le dioestrus s'étend sur 12 à 18 jours avec une moyenne de 15 jours et s'avère être la durée la plus constante du cycle tout au long de l'année. Pour prévoir le retour en chaleur, il est préférable de calculer avec la durée du dioestrus de l'animal. On cherchera donc les manifestations de l'œstrus suivant environ quinze jours après la fin de l'œstrus précédent et non 21 jours après le début de l'œstrus précédent.

La croissance folliculaire s'effectue en deux vagues au cours du cycle : une première vague qui dure de cinq à six jours dont la majeure partie des follicules s'atrophient et une deuxième vague qui débute peu avant l'œstrus et aboutit à la maturation de deux follicules. 16 % des juments présentent plusieurs ovulations qui ont lieu soit en même temps, soit à un ou deux jours d'intervalle. La maturation folliculaire dure une quinzaine de jours et le follicule mûr mesure de 30 à 80 mm de diamètre. L'ovulation a lieu environ deux jours avant la fin des chaleurs. Suite à l’ovulation il y a mise en place d'un corps jaune qui se maintient jusqu'à environ quinze jours après l'ovulation, mais en été ce corps jaune peut se maintenir jusqu'à 20 jours après l'ovulation. La reproduction de la jument se fait par monte naturelle ou par insémination.

2.Contrôle de l’ovulation de la jument par des implants délivrant un agoniste de la GnRH.

La reproduction chez la jument par monte naturelle ou par insémination artificielle nécessite une répétition des inséminations ou des montes car la relation entre le début des chaleurs, la décharge ovulante de LH et l'ovulation n'est pas constante dans le temps. Une explication est que la demi-vie de la LH équine n'est pas inférieure à 40 minutes comme chez les autres mammifères mais en moyenne supérieure à 40 heures. D'autre part l'accouplement n'a pas d'effets potentialisateurs sur l'ovulation (Jöchle et Trigg, 1994).

Afin d'obtenir une meilleure synchronisation des ovulations après la détection des chaleurs, différents protocoles utilisent des injections de hCG (gonadotrophine chorionique humaine) pour mimer la décharge ovulante de LH et provoquer l'ovulation. Les résultats sont bons mais suite à des administrations répétées de cette molécule il y a formation d'anticorps chez l'animal qui devient réfractaire aux effets de l'hCG (Wilson et al., 1990). La GnRH et ses agonistes sont donc intéressants dans le but d'augmenter la production de gonadotrophines car ils ne sont pas immunogènes.

En 1994, Jöchle et Trigg ont publié un bilan de quatre ans d'essais cliniques sur 1294 juments utilisant un implant sous-cutané de desloréline (Ovuplant®). Sur toutes ces juments, la détection des chaleurs a été réalisée grâce à un étalon ou à des dosages successifs de progestérone. Dès la détection des chaleurs, un examen échographique des ovaires a été réalisé toutes les 24 à 48 heures. A la mise en évidence d'un follicule de plus de 30 mm de diamètre, les juments ont reçu une injection sous cutanée de l'implant contenant l'agoniste de la GnRH.

Avec ce traitement, 80 % des juments ont ovulé dans les 48 heures qui ont suivi l'injection. Ceci a permis une réduction de 55% du délai séparant l’observation d’un follicule de plus de 30 mm de diamètre et l'ovulation (figure 72). Ce type d'implant utilisant un agoniste de la GnRH injecté dès la mise en évidence d'un follicule de plus de 30 mm de diamètre permettrait donc de s'assurer d'une ovulation dans les 48 heures suivantes. Le nombre d'inséminations et de saillies à réaliser pourrait être ainsi réduit en conséquence.

Aucun effet secondaire de type mortalité embryonnaire, diminution des réussites en gestation, avortement, mortinatalité n'a été observé. Des administrations

répétées de ce type d'implant ont toujours montré la même efficacité. Ces résultats ont été confirmés par Mumford et al. (1997) et Meyers et al. (1997).

Une augmentation de la dose de traitement de cinq à dix fois la dose recommandée a mis en évidence des signes de désensibilisation de l'hypophyse avec une augmentation de la durée de l'œstrus, une augmentation des concentrations plasmatiques en LH mais une diminution de celle en FSH. Chez les animaux traités à dix fois la dose recommandée, la croissance folliculaire s'est arrêtée pendant quinze jours. Ces observations ont été confirmées par Fitzgerald et al. (1993b) suite à l'administration d'implants d'acétate de goséréline. Dans cette dernière expérience, une diminution inconstante de la concentration plasmatique en LH a été observée, de même que des persistances de corps jaunes et des augmentations de durée des phases folliculaires.

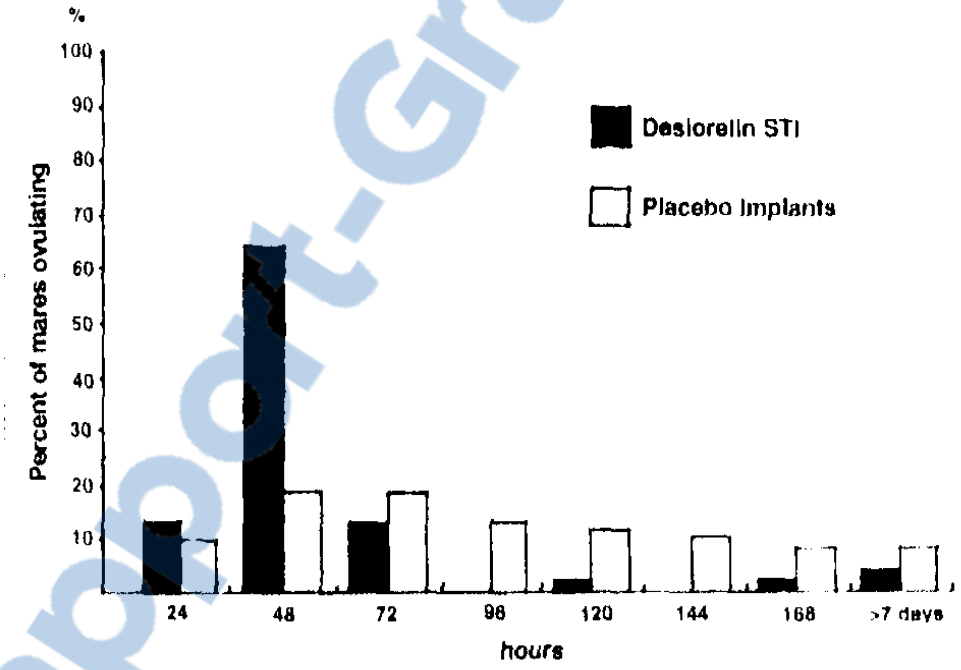


Figure 72 : Intervalles entre l'injection d'un implant d'un agoniste de la GnRH (desloréline STI = Short Term Implant) et l'ovulation chez des jument traitées et témoins (Placebo implants) (P<0,02 pour toutes les valeurs) (Jöchle et Trigg, 1994).

3.Induction d'œstrus en période d'anœstrus chez la jument avec des implants d'agonistes de la GnRH.

Rapport-Gratuit.com

La possibilité de démarrer une gestation chez la jument en dehors de la saison de monte classique permet une production de poulains de façon plus étalée sur l'année. Cela peut aussi permettre d'obtenir des animaux de classes d'âge différentes par rapport à la saison normale de reproduction et de compétition.

La période d'anœstrus chez la jument est comme chez les autres espèces caractérisée par de faibles concentrations plasmatiques en gonadotrophines et un arrêt de la croissance des follicules ovariens. L'utilisation des agonistes de la GnRH afin d'augmenter les concentrations en gonadotrophines et afin de relancer l'activité des ovaires a été testée à différentes périodes de la saison d'anœstrus des juments.

Une première expérience réalisée dans l'hémisphère nord (période de reproduction optimale de juillet à août) a utilisé des implants sous-cutanés délivrant de l'acétate de goséréline en débutant le traitement au mois de février. Toutes les juments de l'essai présentaient avant traitement des follicules de diamètres inférieurs à 20 mm et de faibles concentrations en gonadotrophines et en progestérone. Le protocole utilisé a permis d'induire des ovulations en période d'anœstrus mais la reproductibilité des résultats sur deux années de suite n'a pas été satisfaisante. Ce traitement n'a donc pas été jugé compatible avec une utilisation en routine par les auteurs (Fitzgerald et al., 1993a).

La deuxième expérience réalisée dans l'hémisphère sud (période de reproduction optimale de janvier à février) a utilisé des implants de desloréline (Ovuplant®) sur des juments en période de transition entre la période d'anœstrus et le début de la période d'activité sexuelle (administration des traitements de septembre à novembre)(McKinnon et al., 1996).

Dans un premier essai sur des juments d'activité ovarienne inconnue en septembre, ils ont obtenu une augmentation du nombre de juments ovulant dans les dix jours suivant l'injection par rapport au lot témoin ($p<0,01$).

Dans un deuxième essai, ils n'ont administré le traitement que sur des juments présentant des follicules de diamètres supérieurs à 30 mm au mois d'octobre. Huit des dix juments traitées ont ovulé dans les dix jours suivant l'injection alors qu'aucune des juments du groupe témoin (présentant aussi des follicules de diamètres supérieurs à 30 mm au mois d'octobre) n'a ovulé dans les dix jours ($p<0,0005$). Ils ont de plus observé une augmentation des intervalles entre les

ovulations suivantes chez les animaux traités (25+/-3,8 jours) comparé aux animaux témoins (19,7+/-1,9 jours) ($p<0,002$).

Ils ont conclu de ce dernier résultat que l'utilisation des implants de desloréline était tout à fait adaptée pour faire démarrer des gestations en fin de période d'anœstrus chez la jument.

En bilan, il apparaît que dans l'espèce équine les utilisations envisagées des analogues de la GnRH ne concernent actuellement que les agonistes dans un rôle de stimulation continue de l'hypophyse. Ces molécules permettent d'éviter les utilisations répétées des gonadotrophines contre lesquelles les chevaux s'immunisent fréquemment. Dans cette optique l'utilisation d'implants de courte durée apparaît validée pour obtenir une meilleure synchronisation de l'ovulation chez la jument. L'induction de chaleurs en période d'anœstrus, avec le même type de traitement, offre comme chez la chienne de meilleurs résultats en fin de période d'anœstrus.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

D.Utilisation d'implants d'agonistes de la GnRH comme alternative à la castration chirurgicale des mâles en production porcine.

La viande des porcs mâles non castrés produit une odeur incommodante à la cuisson et un goût non compatible avec sa commercialisation. Ces deux inconvénients sont principalement dus à la présence d'androsténone et de skatole dans les graisses de la viande des porcs non castrés (Bonneau, 1982). Environ 38% des mâles non castrés envoyés à l'abattoir présentent ces inconvénients (Desmoulin et al., 1982). L'androsténone est produite dans les testicules parallèlement aux autres stéroïdes mâles et se concentre dans les tissus adipeux (Bonneau, 1988). Le skatole est un produit de la dégradation intestinale du tryptophane, sa concentration dans les graisses semble liée à celle de l'androsténone (Lundstrom, 1988).

Afin d'éviter la détérioration de la qualité de la viande de porc par ces deux substances, la castration des porcelets mâles est pratiquée à l'âge de deux semaines. L'inconvénient est que chez les mâles castrés, on observe un indice de consommation et des qualités de carcasse inférieurs à ceux des mâles entiers (Patterson et Lightfoot, 1984).

L'administration chronique d'agoniste de la GnRH provoque comme nous l'avons déjà abordé une désensibilisation de l'hypophyse, une diminution des concentrations circulantes en gonadotrophines et une chute de la production des stéroïdes sexuels chez certaines espèces. Reid et al. (1996) ont étudié les effets d'une injection intramusculaire de microsphères libérant un agoniste de la GnRH pendant 4 mois chez des porcelets. Ils ont comparé des porcelets mâles castrés à l'âge de deux semaines à des porcelets mâles non castrés recevant l'injection de l'agoniste de la GnRH à l'âge de 66 jours.

Une diminution significative de la concentration en androgènes a été observée au moment de l'abattage des animaux non castrés et traités par rapport aux animaux ni castrés ni traités (tableau XX).

Tableau XX : Concentrations plasmatiques moyennes en testostérone, delta-4 androstènedione et poids des testicules chez des porcelets : mâles castrés, non castrés, non castrés et traités avec un implants d'agonistes de la GnRH. Ces

résultats ont été obtenus après abattage des animaux, après 116 jours de traitement pour les animaux traités (Reid et al., 1996).

	Mâles castrés (n=40)	Mâles non castrés (n=40)	Mâles non castrés et traités (n=40)
Testostérone (nmol/L)	0,68 +/- 0,33*	26,36 +/- 9,87*	12,5 +/- 7,44*
Delta-4 androstènedione (nmol/L)	0,27 +/- 0,05*	4,35 +/- 1,28*	2,06 +/- 1,33*
Poids des testicules	/	203 +/- 55*	36,8 +/- 11,8*

*Valeurs d'une même ligne significativement différentes à p<0,01.

Les trois groupes d'animaux n'ont présenté aucune différence significative en terme de gain moyen quotidien et d'indice de consommation. Mais les animaux non castrés et traités ont présenté un pourcentage de viande dans la carcasse inférieur (p<0,001) et une épaisseur de gras dorsal supérieure (p<0,001) par rapport aux animaux ni castrés, ni traités. L'épaisseur de gras dorsal était supérieure chez les animaux castrés et traités par rapport aux animaux castrés (p<0,05) (tableau XXI).

Tableau XXI : Pourcentage de viande dans la carcasse et épaisseur de gras dorsal chez des porcs mâles : castrés, non castrés, non castrés et traités avec un implant d'un agoniste de la GnRH (Reid et al., 1996).

	Mâles castrés (n=40)	Mâles non castrés (n=40)	Mâles non castrés et traités (n=40)
Pourcentage de viande dans la carcasse (%)	49,7	$50,2^{b}$	$49,1^{b}$
Epaisseur de gras dorsal (mm)	$19,4^{c}$	$17,6^{b}$	$20,8^{bc}$

b : résultats significativement différents à p<0,001

c : résultats significativement différents à p<0,05

En ce qui concerne les paramètres de qualités culinaires (comportement à la cuisson) aucune différence n'a été mises en évidence entre les trois groupes d'animaux. Le goût des viandes des animaux castrés et non castrés et traités n'était pas significativement différents (p<0,001). Ces deux groupes sont significativement

différents sur ce critère avec le groupe des animaux non castrés dont la viande présente un arrière goût prononcé ($p<0,001$).

Il apparaîtrait donc que l'administration à des porcelets mâles de 66 jours d'un implant délivrant pendant 4 mois un agoniste de la GnRH permet une diminution de la production des androgènes, des perturbations minimes des paramètres de croissance et de qualité de carcasse et une qualité gustative de la viande comparable à celle de porcelets castrés chirurgicalement à l'âge de 15 jours. L'utilisation de microsphères d'agonistes de la GnRH serait donc envisageable en alternative médicale à la castration chirurgicale des mâles en production porcine (Reid et al., 1996).

CONCLUSION

La régulation de la fonction de reproduction est en partie centralisée par la sécrétion hypothalamique de GnRH dans le système porte hypophysaire. Cette sécrétion physiologiquement pulsatile stimule les sécrétions de LH et de FSH qui elles-mêmes modulent l'activité des organes sexuels. Les modifications apportées aux analogues de la GnRH par rapport au décapeptide naturel sont principalement des modifications des sites de clivage de la molécule retardant ainsi son catabolisme, des augmentations des constantes d'affinités de la molécule avec ses récepteurs et le remplacement des acides aminés responsables de l'activation du couple hormone-récepteur par d'autres induisant un blocage de celui-ci pour la production des antagonistes.

Les administrations de ces analogues, au potentiel biologique différent de celui de la GnRH naturelle, maintiennent dans tout l'organisme des concentrations élevées et durables de ces agonistes et antagonistes de la GnRH. Dans le cas des agonistes en administration chronique, la réponse des cellules gonadotropes de l'hypophyse se décompose en une première phase de stimulation de la sécrétion de LH, cohérente avec le rôle d'agoniste, et en une deuxième phase de désensibilisation avec une modification des modalités de la sécrétion de LH qui est fonction de l'espèce concernée. Cette désensibilisation de l'hypophyse consiste en une absence de réaction des cellules gonadotropes aux sécrétions hypothalamiques de GnRH. Les raisons de cette désensibilisation sont complexes et apparaissent être la combinaison de modifications des interactions entre les agonistes de la GnRH et leur récepteur et de saturation des seconds messagers intracellulaires aboutissant la sécrétion des gonadotrophines. Dans le cas des antagonistes, ces analogues établissent une compétition avec l'hormone naturelle pour l'occupation des récepteurs à la GnRH. Une administration de ceux-ci entraîne une diminution immédiate de la libération de LH et, de façon moins constante, de FSH en fonction des espèces.

Des travaux expérimentaux réalisés principalement chez le rat n'ont pas été toujours extrapolables à d'autres espèces du fait des particularités de la fonction de reproduction de celles-ci. Les réponses aux protocoles d'administrations chroniques des agonistes et antagonistes de la GnRH ont donc été évaluées dans différentes

espèces. Les résultats obtenus ont permis d'envisager des utilisations médicales propres à chaque espèce de ces protocoles.

Pour l'espèce humaine, l'utilisation des protocoles d'administration chronique d'agonistes de la GnRH permet une inhibition réversible de la sécrétion de LH entraînant une diminution de la concentration plasmatique des stéroïdes sexuels et une diminution de l'activité des organes sexuels. Ces effets sont exploités à des fins médicales dans la gestion des affections hormono-dépendantes ou nécessitant une mise au repos des organes sexuels. Les mêmes effets sans première phase de stimulation sont obtenus avec les antagonistes. Ces antagonistes, dont l'action est également réversible, remplacent progressivement les agonistes en administration chronique dans les indications d'inhibition des sécrétions hypophysaires en gonadotrophines. La possibilité de stopper ponctuellement, avec les antagonistes, la réponse de l'hypophyse aux stimulations hypothalamiques est intégrée dans des protocoles de synchronisation des cycles sexuels utilisés en reproduction assistée humaine.

La réponse des carnivores domestiques, et principalement du chien, est comparable à celle de l'homme. Dans cette espèce, les administrations chroniques d'agonistes de la GnRH pourraient s'inscrire dans des protocoles de maîtrise de la reproduction, d'une part en remplacement des protocoles de castration chimique actuels et d'autre part, en protocoles d'induction de chaleurs en période d'anœstrus chez la chienne. Ce mode de castration chimique est également intéressant dans la gestion des affections hormono-dépendantes des organes sexuels du mâle et de la femelle.

Soumis à une administration chronique d'agonistes de la GnRH, les bovins ont la particularité de présenter une désensibilisation de l'hypophyse avec une sécrétion de LH continue et non plus pulsatile. La concentration plasmatique moyenne en LH est comparable à celle physiologiquement observée et on constate une augmentation des concentrations en stéroïdes sexuels. Les administrations chroniques d'agonistes et d’antagonistes influent sur la succession des vagues folliculaires et sont utilisées dans des protocoles de reproduction assistée nécessitant une stimulation et une synchronisation des cycles ovariens. Les administrations chroniques d'agonistes sont également utilisées en castration chimique réversible chez la génisse et la vache.

Chez la jument, les administrations chroniques d'agonistes de la GnRH sont utilisées, à des doses inférieures à celles induisant une désensibilisation, sous forme d'implants de courte durée et permettent une stimulation continue de l'hypophyse.

Cet effet est utilisé pour synchroniser les ovulations suite à la détection des chaleurs et pour induire des chaleurs en fin de période d'anœstrus dans cette espèce.

Les qualités gustatives de la viande des porcs mâles sont influencées par la production des stéroïdes sexuels. L'inhibition de la production d'androgènes par la mise en place d'implants d'agonistes de la GnRH chez des porcelets mâles pourrait consister en une alternative à la castration chirurgicale dans cette espèce.

Les réactions des cellules gonadotropes de l'hypophyse face aux administrations chroniques d'agonistes de la GnRH sont difficilement extrapolables d'une espèce à l'autre. Les utilisations actuelles et envisagées des modifications des modes de sécrétion des gonadotrophines sont propres à chaque espèce. Les antagonistes de la GnRH, encore peu évalués pour la médecine vétérinaire, pourraient s'inscrire dans différentes indications de thérapeutique et de maîtrise de la reproduction des animaux de compagnie et de rente.

BIBLIOGRAPHIE

AMBROSE JD, PIRES MF, MOREIRA F, DIAZ T, BINELLI M, THATCHER WW (1998). Influence of deslorelin (GnRH-agonist) implant on plasma progesterone, first wave dominant follicle and pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology,* **50**, 1157-1170.

ARIMURA A, VILCHEZ-MARTINEZ JA, COY DH, HIROTSU Y, SCHALLY AV (1974). (D-Ala6, Des-Gly-NH2 10)-LH-RH-Ethylamide: a new analogue with unusually high LH-RH/FSH-RH activity. *Endocrinology,* **95**, 1174-1177.

ASPDEN WJ, RAO A, SCOTT PT, CLARKE IJ, TRIGG TE, WALSH J, D'OCCHIO MJ (1996). Direct actions of the luteinizing hormone-releasing hormone agonist, deslorelin, on anterior pituitary contents of luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH), LH and FSH subunit messenger ribonucleic acid, and plasma concentrations of LH and FSH in castrated male cattle. *Biol. Reprod.,* **55**(2), 386-392.

ASPDEN WJ, VAN REENEN N, WHYTE TR, MACLELLAN LJ, SCOTT PT, TRIGG TE, WALSH J, D'OCCHIO MJ (1997a). Increased testosterone secretion in bulls treated with a luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) agonist requires endogenous LH but not LHRH. *Domest. Anim. Endocrinol.,* **14**(6), 421-428.

ASPDEN WJ, RAO A, ROSE K, SCOTT PT, CLARKE IJ, TRIGG TE, WALSH J, D'OCCHIO MJ (1997b). Differential responses in anterior pituitary luteinizing hormone (LH) content and LH beta- and alpha-subunit mRNA, and plasma concentrations of LH and testosterone, in bulls treated with the LH-releasing hormone agonist deslorelin. *Domest. Anim. Endocrinol.,* **14**, 429-437.

BAJUSZ S, KOVACS M, GAZDAG M, BOKSER L, KARASHIMA T, CSERNUS VJ, JANAKY T, GUOTH J, SCHALLY AV (1988). Highly potent antagonists of LHRH free of edematogenic effects. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* **85**, 1627-1641.

BARIL G, POUGNARD JL, FREITAS VFJ, LEBOEUF B, SAUMANDE J (1996). A new method for controlling the precise time of occurrence of the preovulatory gonadotropin surge in superovulated goats. *Theriogenology,* **45**, 697-706.

BARRON JL, MILLAR RP, SEARLE D (1982). Metabolic clearance and plasma half disappearence time of D-Trp6 and exogenous LHRH. *J. Clin. Endocr. Metab.,* **54**, 1169-1173.

BASHIN S, BERMAN N, SWERDLOFF RS (1994). FSH escape during chronic GnRH agonist and testosterone treatment. *J. Androl.,* **15**, 386-391.

BEATTIE JL (1982). Hypophysiotropic Releasing-Inhibiting Hormones. In Zaneled (LJD) and coll., *Biochemistry of mammalian reproduction*.1ère Ed.,JOHN WILEY and sons, NEW YORK. 287-296.

BECKER SE, JOHNSON AL (1992). Effects of GnRH infused in a pulsatile or continuous fashion on serum gonadotropin concentrations and ovulation in the mare. *J. Anim. Sci.,* **70**, 1208-1215.

Rapport-gratuit.com

BEHRE HM, NASHAN D, HUBERT W (1992). Depot GnRH agonist blunts the

BRUGERE H (1998). Reproduction 1/ Phénomènes généraux et mécanismes 2/ Etude spéciale dans quelques espèces d'intérêt vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité pédagogique de Physiologie et Thérapeutique, 108p.

BUFF S (2001). Protocoles d'induction de l'œstrus chez la chienne. *Point Vétérinaire.*, **32**(212), 16-21.

CALDANI M, CARATY A, PELLETIER J, THIERY JC, TYLLET Y (1991). La libération pulsatile de LH et son contrôle. *In* : THIBAULT C, LEVASSEUR MC. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Paris, Edition Marketing, 71-87.

CARATY A, ORGEUR P, THIERY JC (1982). Mise en évidence d'une sécrétion pulsatile du LHRH dans le sang porte hypophysaire chez les brebis par une technique originale de prélèvements multiples. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **295**(III),103-110.

CASSINA MP, MUSGROVE LC, DUCK LW, SELLERS JC, NEILL JD (1997). Dual intracellular pathways in GnRH induced desensitization of LH secretion . *Life Science,* **64**, 2215-2223.

CATT KJ, HARWOOD JP, AGUILERA G, DUFAU ML (1979). Hormonal regulation of peptide receptor and target cell responses. *Nature*, **280**, 109-116

CHIEN YW (1992). Systemic delivery of peptide-based pharmaceuticals, in: J. Swarbrick (Ed.), Drugs and the Pharmaceutical Sciences 50, Novel Drug Delivery Systems, 2nd ed., Marcel Dekker, New York, 631-745.

CHOW MM, KIGHT KE , GOTHIFT Y, ALOK D, STUBBLEFIELD J, ZOHAR Y (1998). Multiple GnRHs present in a teleost species are encoded by separate genes: analysis of the sbGnRH and cGnRH-II genes from the striped bass, Morone saxatilis. *J. Mol. Endocrinol.,* **21**, 277-289.

CLAYTON RN, SHAKESPEAR RA, MARSHALL JC (1977). Effect of testosterone and oestradiol on LHRH degradation by purified pituitary plasma membrans. *Acta. Endocr. (Kbh)*, **85** (Suppl. 212), 68-73.

CLAYTON RN, HARWOOD JP, CATT KJ (1979). GnRH analogue binds to luteales cells and inhibits progesterone production. *Nature,* **282**, 90-92.

CLAYTON RN, KATIKINENI M, CHAN V, DUFAU ML, CATT KJ (1980). Direct inhibition of testicular function by GnRH: mediation by a specific GnRH receptor in interstitial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* **77**, 4459-4463.

CLAYTON RN ,CATT KJ (1981). GnRH receptors: characterisation, physiological regulation and relation ship to reproductive function. *Endocrine Rev.,* **2**, 186-209.

CLAYTON RN (1989). Gonadotrophin-releasing hormone: its actions and receptors. *J. Endocrinology,* **120**, 11-19.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

CONCANNON PW (1989). Induction of fertile oestrus in anoestrus dogs by constant infusion of GnRH agonist. *J. Reprod. Fert. Suppl.,* **39**, 149-160.

CONN PM, ROGERS DC, STEWART JM, NIEDEL J, SHEFFIELD T (1982). Conversion of GnRH antagonist to an agonist. *Nature,* **296**, 653-657.

COPELAND KC, AUBERT ML, PAUNIER L, SIGONENKO PC (1977). Measurement of urinary LHRH. *Acta Endocr. (Kbh),* **85**(Suppl. 212), 70-76.

CORNEA A, JANOVICK JA, LIN X, CONN PM (1999). Simultaneous and independent visualisation of the GnRH receptor and its ligand: evidence for independent processing and recycling in living cells. *Endocrinology,* **10**, 4272-4280

COY DH, HORVATH A, NEKOLA MV, COY EJ, ERCHEGYI J, SCHALLY AV (1982). Peptide antagonists of LHRH : large increases in antiovulatory activities produced by D-amino acids in the six position. *Endocrinology*, **110**, 145-147.

CSERNUS VJ, SZENDE B, SCHALLY AV (1990). Release of peptides from sustained delivery systems (microcapsules and microparticules) *in vivo. Int. J. Peptide Protein Res.,* **35**, 557-565.

CUI J, SMITH RG, MOUNT GR, LO JL, YU J, WALSH TF, SINGH SB, DEVITA RJ, GOULET MT, SCHAEFFER JM, CHENG K (2000). Identification of Phe313 of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor as a site critical for the binding of nonpeptide GnRH antagonists. *Mol. Endocrinol.,* **14**(5), 671-681.

DESMOULIN B, BONNEAU M, FROUIN A, BIDART JP (1982). Consumer testing of pork and processed meat from boars, the influence of fat androstenone level. *Livest. Prod. Sci.*, **9**, 707-715.

D'OCCHIO MJ, GIFFORD DR, EARL CR, WEATHERLY T, VON RECHENBERG W (1989). Pituitary and ovarian responses of post-partum acyclic beef cows to continuous long-term GnRH and GnRH agonist treatment. *J. Reprod. Fertil*., **85**(2), 495-502.

D'OCCHIO MJ, ASPDEN WJ (1996a). Characteristics of luteinizing hormone (LH) and testosterone secretion, pituitary responses to LH-releasing hormone (LHRH), and reproductive function in young bulls receiving the LHRH agonist deslorelin: effect of castration on LH responses to LHRH. *Biol. Reprod*., **54**(1), 45-52.

D'OCCHIO MJ, ASPDEN WJ, WHYTE TR (1996b). Controlled, reversible suppression of estrous cycles in beef heifers and cows using agonists of gonadotropin-releasing hormone. *J. Anim. Sci.* **74**(1), 218-225.

D'OCCHIO MJ, SUDHA G, JILLELLA D, WHYTE T, MACLELLAN LJ, WALSHJ, TRIGG TE, MILLER D (1997). Use of a GnRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulation in heifers superstimulated with FSH: a new model for Superovulation. *Thériogenology,* **47**, 601-613.

D'OCCHIO MJ, SUDHA G, JILLELLA D, WHYTE T, MACLELLAN LJ, WALSH J, TRIGG TE, MILLER D (1998). Close synchrony of ovulation in superstimulated heifer that have a down regulated anterior pituitary gland and are induce to ovulate with exogenous LH. *Theriogenology*, **49**(3), 637-644

D'OCCHIO MJ, FORDYCE G,WHYTE TR, ASPEN WJ, TRIGG TE (2000). Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. *Anim. Reprod. Sci.,* **60-61**, 433-442.

FEKETE M, WITTLIFF JL, SCHALLY AV (1989). Characteristics and distribution of receptors for D-Trp-6-LHRH, somatostatin, epidermal growth factor, and sex steroids in 500 biopsy samples of human breast cancer . *J. Clin. Lab. Anal.,* **3**, 137-147.

FITZGERALD BP, MEYER SL, AFFLECK KJ, SILVIA PJ (1993a). Effect of a constant administration of GnRH agonist on reproductive activity in mares:induction of ovulation during seasonal anestrus. *Am. J. Vet. Res.,* **54**, 1735-1745;

FITZGERALD BP, PETERSON KD , SILVIA PJ (1993b). Effect of a constant administration of GnRH agonist on reproductive activity in mares: preliminary evidence on suppression of ovulation during the breeding season. *Am. J. Vet. Res*., **54**, 1746-1751.

FOREST MG, LEVASSEUR MC (1991). La puberté. *In* : THIBAULT C, LEVASSEUR MC. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Paris, Edition Marketing, 551-571.

FUJINO M, KOBAYASHI S, OBAYASHI M, SHINAGAWA S, FUKUDA T, KITADA C et al (1972). Structure activity relationships in the C-terminal part of LHRH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **49**, 863-867.

FUNSTON RN, SEIDEL GE Jr (1995). Gonadotropin-releasing hormone increases cleavage rates of bovine ovocytes fertilized in vitro. *Biol. Reprod*., **53**(3), 541-545.

GABRILOVE JL, LEVINE AC, KIRSCHENBAUM A, DROLLER M (1986). Effect of a GnRH analogue (Leuprolide) on benign prostatic hypertrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* **64**, 1331-1333.

GEORGE M, LHOMME C, LEFORT J, GRAS C, COMARU SCHALLY AM, SCHALLY AV (1989). Long term use of an LHRH agonist in the management of uterine leiomyomas: a study of 17 cases. *Int. J. Fertil.,* **34**, 19-24.

GOLAN A, BUKOVSKY I, PANSKY M, SCHNEIDER D, WEINRAUB Z, CASPI E (1993). pre-operative GnRH agonist treatment in surgery for uterine leiomyomata. *Human Reproduction,* **8**, 450-452.

GONG JG, BRAMLEY TA, GUTIERREZ CG, PETERS AR, WEBB R (1995). Effects of a chronic treatment with a GnRH agonist on peripheral concentration of FSH and LH, and ovarian function in heifers. *J. Reprod. Fertil.,* **105**, 263-270.

GONG JG, CAMPBELL BK, BRAMLEY TA, GUTIERREZ CG, PETERS AR, WEBB R (1996). Suppression in the secretion of follicle-stimulating Hormone and Luteinizing Hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a GnRH agonist. *Biol. Reprod.,* **55**, 68-74.

GONZALEZ BARCENA D, VADILLO BUENFIL M, GOMEZ ORTA F, GARCIA MF, CARDENAS CORNEJO I, GRAEF SANCHEZ A, COMARU SCHALLY AM, SCHALLY AV (1994). Responses to the antagonistic analog of LHRH (SB-75, Cetrorelix) in patients with benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer. *Prostate,* **24**, 84-92.

GUNDMUNDSSON JA, NILLIUS SJ, BERGQUIST C (1984). Inhibition of ovulation by intranasal nafarelin, a new superactive agonist GnRH. *Contraception*, **30**, 107-114.

HALMOS G, SCHALLY AV, KAHAN Z (2000). Down-regulation and change in subcellular distribution of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone in OV-1063 human epithelial ovarian cancers during therapy with LH-RH antagonist Cetrorelix. *Int. J. Oncol*., **17**(2), 367-373.

HANDELSMAN DJ, SWERDLOFF RS (1986). Pharmacokinetics of GnRH and its analogs. *Endocrine Rev.,* **7**, 95-105.

HARWOOD JP, CLAYTON RN, CATT KJ (1980). Ovarian GnRH receptors. I. properties and inhibition of luteal cell function. *Endocrinology,* **82**, 407-413.

HAYES FJ, TAYLOR AE, MARTIN KA, HALL JE (1998). Use of a GnRH antagonist as a physiologic probe in polycystic ovary syndrome: assessment of neuroendocrine and androgen dynamics. *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* **83**, 2343-2349.

HAZUM E, KEINAN D (1984). Characterization of GnRH receptors in bovine pituitary membranes. *Mol. Cell. Endocrinol.,* **35**, 107-111.

HAZUM E, KEINAN D (1985). GnRH action is mediated by dimerization of occupied receptors. *Biophys. Res. Commun.,* **133**, 449-453.

HAZUM E, CONN PM (1988). Molecular mechanism of gonadotrophin releasing hormone (GnRH) action. I. the GnRH receptor. *Endocrine Reviews,* **9**, 379-384.

HERNANDEZ E (2000). Embryo implantation and GnRH antagonists. *Human Reproduction,* **15**, 1211-1216.

HOMBURG R, LEVY T, BERKOVITZ D, FARCHI J, FELDBERG D, ASHKENAZI J and al. (1993). GnRH agonist reduces the miscarriage rate for pregnancies achieved in women with polycystic ovarian syndrom. *Fertility and Sterility,* **59**, 527-531.

HSUEH AJW, ADASHI EY, TUCKER E, VALK C, LING NC (1983). Relative potencies of GnRH agonist and antagonist on ovarian and pituitary functions. *Endocrinology,* **112**, 689-697.

HUDON E, RONDEAU JJ, LENEART V, WORTHRICH P, BOUTIGNON F, DEGHENGHI R and al. (1997). Radioimmunoassay of meterelin and pharmacokinetics after a single injection and implant administration in dogs. *Journal of Pharmaceutical Sciences,* **86**, 172-177.

INABA T,UMEHARA T, MORI J, TORII R, TAMADA H, SAWADA T (1996). Reversible suppression of pituitary-testicular function by a sustained- release formulation of a GnRH agonist (leuprolide acetate) in dogs. *Theriogenology*, **46**, 671-677.

INABA T, TANI H, GONDA M, NAKAGAWA A, OHMURA M, MORI J, TORII R, TAMADA H, SAWADA T (1998). Induction of fertile estrus in bitches using a sustained-release formulation of a GnRH agonist (leuprolide acetate). *Theriogenology*, **49**(5), 975-982.

INADA K, TOMINAGA T, TOI M, YAMAMOTO Y, ABE M, YAMASHITA J and al. (1996). Protective effect of leuprolide acetate on 7,12-DMBA-induced mammary carcinogenesis in rats. *European Journal of surgical oncology.* **22**, 583-587.

IRELAND JJ, ATEN RF, BEHRMAN HR (1988). GnRH-like Proteins in cows: concentration during corpora lutea development and selective localisation in granulosal cells. *Biol. Reprod*., **38**, 544-550.

JOCHLE W, TRIGG TE (1994). Control of ovulation in the mare with Ovuplant^{R}. A short-term release implant (STI) containing the GnRH analogue deslorelin acetate:studies from 1990 to 1994. *Journal of Equine Veterinary Science,* **14**, 632-644.

KAKAR SS, RAHE CH, NEILL JD (1993). Molecular cloning, sequencing, and characterizing the bovine receptor for gonadotropin releasing hormone (GnRH). *Domest. Anim. Endocrinol*., **10**(4), 335-342.

KARTEN MJ, RIVIER JE (1986). Gonadotrophin- Releasing Hormone analog design. Structure-function studies toward the development of agonists an antagonists: rationale and perspectives. *Endocrine Rev*., **7**, 44-66.

KETTEL LM, MURPHY AA, MORALES AJ, RIVIER J, VALE W, YEN SSC (1993). Rapid regression of uterine leiomyomas in response to daily administration of GnRH antagonist. *Fertil*. *Steril.,* **60**, 642-646

KING JA, MILLAR RP (1980). Comparative aspects of LHRH structure and function in vertebrate phylogeny. *Endocrinology,* **106**, 707-717.

KNOBIL E (1980). Neuroendocrine control of the mentrual cycle. *Recent prog. Horm. Res.,* **36**, 53-58.

KOPPAN M, KOVACS M, MEZO I, FLERKO B (1998). Electrochemical stimulation of the median eminence evokes FSH but not LH release after LHRH antagonist treatment in vivo and in vitro. *Journal of Neuroendocrinology,* **10**, 213-236.

KORKUT E, BOKSER L, COMARU-SCHALLY AM, GROOT K, SCHALLY AV (1991). Inhibition of growth of experimental prostate cancer with sustained delivery systems (microcapsules and microgranules) of the LH-RH antagonist SB-75. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* **88**, 844-48.

KOTTLER ML, COUNIS R, BOUCHARD P (1999). Mutations of the GnRH receptor gene: a new cause of autosomal recessive hypogonadotropic hypogonadism. *Arch. Med. Res.,* **30**, 481-485.

KOVACS M, SCHALLY AV, CSERNUS B, REKASI A (2001). LHRH antagonist cetrorelix down regulates the mRNA expression of pituitary receptors for LHRH by unteracting the stimulatory effect of endogenous LHRH . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* **98**, 1829-1834.

LACOSTE D, CANDAS B, NORMAND M, LABRIE F (1990). Model of distribution and metabolism of a GnRH superagonsit in dogs. *American Physiologycal Society,* **90**, 468-474.

LECOMTE P (1984). Les analogues du GnRH aspects théoriques. Applications pratiques. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.,* **13**, 363-373.

LEIVA LA, DE LA LASTRA M (1993). LH-releasing activity of hypothalamic extracts not attributable to GnRH. *Neuroendocrinology*, **57**(4), 615-620.

LEMAY A, QUESNEL G (1982). Potential new treatment of endometriosis: reversible inhibition of pituitary-ovarian function by chronic intranasal administration of a LHRH agonist. *Fertil. Steril.,* **38**, 376-379.

LESPAGNARD L, KISS R, DANGUY A, LEGROS N, LENGLET G, DEVLEESCHOUWER N and al (1987). In vitro studies of canine mammary tumors: influence of 17Beta Estradiol and Progesterone on cell kinetics parameters. *Oncology,* **44**, 292-301.

LEVINE JE, RAMIREZ VD (1980). In vivo release of LHRH with Push pull cannulae from the mediobasal hypothalamus of ovariectomized, steroidprimed Rats. *Endocrinology,* **111**, 1782-1790.

LEVINE JE, PAU KYF, RAMIREZ VD, JACKSON GL (1982). Simultaneous measurement of LHRH and LH release in unanesthized, ovariectomized Sheep. *Endocrinology,* **111**, 1449-1445.

LEWY H, NAOR Z, ASHKENAZY IE (1996). Rythmicity of LH secretion expressed in vitro. *Eur. J. Endocrinol.,* **135**, 455-463.

LOMBARDI P, FLORIO S, PAGNINI U, CRISPINO A, AVALLONE L (1999). Ovarian function suppression with a GnRH analogue: D-ser(But[t])[6]-Arzgly[10]-LHRH (Goserelin) in hormone dependent canine mammary cancer. *J. Vet. Pharmacol. Therap.,* **22**, 56-61.

LUNDSTROM K, MALMFORS B, STERN S, PETERSON H, MORTENSEN AB, SORENSEN SE (1988). Skatole, androstenone and taint in boars fed two different diets. *Livest. Prod. Sci.*, **18**, 55-67.

MARCONDES JAM, ABUJAMRA AC, MINANNI SL, MENDONCA BB, NERY M, LERARIO AC and al. (1993). Long term treatment of central precocious puberty with a long acting analogue of LH-RH (D-Tryp6-GnRH) in monthly injections. *Horm. Metab. Res.*, **25**, 105-109.

MATHE G, KEILING R, PREVOT G, VO VAN ML, GASTIABURU J, VANNETZEL JM, DESPAX R, JASMIN C and al (1987). LHRH agonist: breast and prostate cancer. *In* : KLIJN JGM, PARIDAENS R, FOEKENS JA. Hormonal manipulation of cancer: Peptides growth factors, and new (anti) steroidal agents. New York, Raven Press, 315-319.

McKINNON AO, VASEY JR, LESCUN TB, TRIGG TE (1996). Repeated use of a GnRH analogue deslorelin (Ovuplant) for hastening ovulation in the transitional mare. *Equine Vet. J.,* **29**, 153-155.

MCRAE GI, ROBERTS BB, WORDEN AC, BAJKA A, VICKERY BH (1985). Long-term reversible suppression of oestrus in bitches with nafarelin acetate, a potent LHRH agonist. *J. Reprod. Fertil*., **74**(2), 389-397

MELSON BE, BROWN JI, SCHOENEMANN HM, TARNAVSKY GK, REEVES JJ (1986). Elevation of serum testosterone during chronic LHRH agonist treatment in the bull. *J. Anim. Sci.*, **62**, 199-207.

MEYERS PJ, BOWMAN T, BLODGETT G, CONBOY HS, GIMENEZ T, REID MP and al. (1997). Use of the GnRH analogue, deslorelin acetate, in a slow-release implant to accelerate ovulation in oestrus mares. *Vet. Record,* **140**, 249-252.

MIALOT JP, CHASTANT S (2000). Reproduction bovine infertilité femelle. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. Unité pédagogique de Pathologie de la Reproduction, 87p.

MILLAR R, CONKLIN D, LOFTON-DAY C, HUTCHINSON E, TRSKIE B, ILLING N, SEALFON SC, HAPGOOD J (1999). A novel human GnRH receptor homolog gene: abundant and wide tissue distribution of the antisense transcript. *J. Endocrinol.,* **162**, 117-126.

MONAHAN MW, AMOSS MS, ANDERSON HA, VALE W (1973). Synthetic analogs of the LHRH with increased agonist or antagonist properties. *Biochemistry,* **12**, 4616-4620.

MORRIS JS, DOBSON JM, BOSTOK DE, O'FARREL E (1998). Effect of ovariohysterectomy in bitches with mammary neoplasms. *Vet. Record,* **142**, 656-658.

MUMFORD EL, SQUIRES EL, JOCHLE E, HARRISON LA, NETT TM, TRIGG TE (1997). Use of deslorelin short-term implants to induce ovulation in cycling mares during three consecutive estrous cycles. *Anim. Reprod. Sci.,* **39**, 129-140.

MUNSON L, ASA CS, BAUMAN J, JOCHLE W, TRIGG TE (2000). Effects of the GnRH-analog deslorelin on oestrus cycle, behavior and health of cats in a controlled trial. *In:* The 4th international symposium on canine and feline reproduction and the 2nd congress of the european veterinary society for small animal reproduction. Oslo, Norway, 29 June-1July 2000. p 24.

NESTOR JJ Jr (1984). Development of agonistic LHRH analogs. *In* : VICKERY BH, NESTORS JJ JR, HAFEZ ESE. LHRH and its analogs. MTP Press, Lancaster, UK, p 3.

NUNEZ L, FAUGHT WJ, FRAWLEY LS (1998). Episodic GnRH gene expression revealed by dynamic monitoring of luciferase reporter activity in single, living neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., **95**, 9648-9653.

OKADA H (1997). One and three-month release injectable microspheres of the LH-RH superagonist leuprorelin acetate. *Advanced Drug Delivery Review,* **28**, 43-70.

OLIVENNES F, FANCHIN R, BOUCHARD P, ZIEGLER D, TAIEB J, SELVA J, FRYDMAN R (1994). The single or dual administration of the GnRH antagonist Cetrorelix in an in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertility and Sterility,* **62**, 468-476

ORY SJ (1983). Clinical uses of LHRH. *Fertility and Sterility,* **39**, 577-591.

OUSSAID B, MARIANA JC, PUOLIN N, FONTAINE J, LONERGAN P, BECKERS JF (1999). Reduction of developmental competence of sheep ovocytes by inhibition of LH pulses during the follicular phase with a GnRH antagonist. *Journal of Reproduction and Fertility,* **117**, 71-77.

OWEN LN (1979). A comparative study of canine and human breast cancer. *Investigation in Cell. Pathology*, **2**, 257-275.

PARMAR H, LIGHTMAN SL, ALLEN L, PHILLIPS RH, EDWARDS L, SCHALLY AV (1985). Randomised controlled study of orchydectomy vs long-acting D-TRP-6-LHRH microcapsules in advanced prostatic carcinoma. *Lancet,* **30**, 1201-1205.

PATTERSON RLS, LIGHTFOOT AL (1984). Effect of sex grouping during growth on 5-alpha-androstenone development in boars at three commercial slaughter weights. *Meat Sci.*, **10**, 253-263.

PELLETIER J (1971). Le contrôle de la sécrétion et de la décharge de LH chez les mammifères. *In* : HERLANT M. Fonctions gonadotropes et rapports hypothalomo-hypophysaires chez les animaux sauvages. 1ère édition, Paris, Masson, 274p.

PERRIN MH, RIVIER JE, VALE WW (1980). Radioligand assay for GnRH: relative potencies of agonists and antagonists. *Endocrinology,* **106**, 1289-1296.

PETERS CA, WALSH PC (1987). The effect of nafarelin acetate, a LHRH agonist, on benign prostatic hyperplasia. *New England Journal of Medecine,* **3**, 599-604.

PINSKI J, YANO T, , GROOT K, MILOVANOVIC S, SCHALLY AV (1992). Comparison of biological effects of a sustained delivery system and nonencapsuled LH-RH antagonist SB-75 in rats. *Peptides*, **13**, 905-911.

PINSKI J, YANO T, SZEPESHAZI K, GROOT K, SCHALLY AV (1993). Recovery pituitary- gonadal function in male rats after long-term suppression induced by a single injection of microcapsules of LH-RH antagonist Cetrorelix (SB-75). *J. Androl.*, **14**, 164-169.

PLANT TM (1986). Gonadal regulation of hypothalamic GnRH release in primates. *Endocrine Rev.*, **7**, 75-88.

QIU Y, JOHNSON HW, REILAND TL, FU LU MY (1999). Sublingual absorption of leuprolide: comparison between human and animal models. *Internationnal Journal of Pharmaceutics,* **179**, 27-36.

RADULOVIC S, COMURA-SCHALLY AM, MILOVANOVIC S, SCHALLY AV (1993). Somatostatin analogue RC-160 and LH-RH antagonist SB-75 inhibit growth of MIA PaCa-2 human pancreatic cancer xenografts in nude mice. *Pancreas,* **8**, 88-97.

RAJAMAHENDRA R, AMBROSE JD, SCHMITT EJP, THATCHER MJ, THATCHER WW (1998). Effects of buserelin injection and deslorelin (GnRH-agonist) implants on plasma progesterone, LH, accessory CL formation, follicle and corpus luteum dynamics in holstein cows. *Theriogenology,* **50**, 1141-1155.

REDDING TW, KASTIN AJ, GONZALEZ-BARCENA D,COY DH, COY EJ, SCHALCH DS, SCHALLY AV (1973). The half life, metabolism, and excretion of tritiated LHRH in man. *J. Clin. Endocr. Metab.,* **37**, 626-631.

REDDING TW, SCHALLY AV (1983). Inhibition of mammary tumour growth in rats and mice by administration of agonistic and antagonistic analogues of LHRH. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* **80**, 1459-1462.

REEVES JJ, SEGUIN C, LEFEBVRE FA, KELLY PA, LABRIE F. (1980). Similar LHRH binding sites in rats anterior pituitary and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* **77**, 5567-5571.

REID J, DUFOUR JJ, SIRARD MA (1996). Effect of a single injection of a long-acting GnRH agonist on prepubertal male and female pigs on reproductive organs, growths performance and sensory qualities of roasts. *Reprod. Nutr. Dev.,* **36**(3), 321-332.

RIEGER D, ROBERGE S, COY DH, RAWLING NC(1989). Effect of an LHRH antagonist on gonadotrophin and oestradiol secretion, follicular development, oestrus and ovulation in Holstein heifers. *J. Reprod. Fert*., **86**, 157-164.

RapportGratuit.com

ROBERGE S, SCHRAMM RD, SCHALLY AV, REEVES JJ (1992). Reduced postpartum anestrus of suckled beef cows treated with microencapsulated luteinizing hormone-releasing hormone analog. *J. Anim. Sci.* **70**(12), 3825-3830.

ROBERTS AJ, CHANG CF, SCHALLY AV, REEVES JJ (1989). Luteinizing hormone concentrations in serum of postpartum beef cows injected with microencapsulated luteinizing hormone-releasing hormone analog. *J. Anim. Sci.*, **67**(10), 2730-2734.

SANTEN RJ, MANNI A, HARVEY H, REDMOND C (1990). Endocrine treatment of breast cancer in women. *Endocrin. Rev.*, **11**, 221-265.

SARTIN EA, RAHE CH, WRIGHT JC, SARTIN JL (1995). LHRH, estrogen and progesterone receptors in canine mammary lesions and tumor cell lines. *Anticancer Research,* **15**, 2029-2032.

SCHAISON G (1982). LHRH chez l'homme. Données actuelles. *Ann. Endocrin.,* **43**, 247-258

SCHALLY AV, KASTIN AJ, ARIMURA A (1971). Hypothalamic FSH and LH regulating hormone: structure, physiology, and clinical studies. *Fertil. Steril.,* **22**, 703-719;

SCHALLY AV, ARIMURA A, COY DH (1980). Recent approaches to fertility control based on derivatives of LHRH. In :MUNSON PL, DICZFALUSY E, GLOVER J, OLSON RE (eds) *Vitamins and Hormones,* **38**, 257-263.

SCHALLY AV, COMARU SCHALLY AM (1997). Rational use of agonists and antagonists of LHRH in the treatment of hormone-sensitive neoplasms and gynaecologic conditions. *Advanced Drug delivery Reviews,* **28**, 157-169.

SCHALLY AV (1999a). LH-RH analogues: I. Their impact on reproductive medicine. *Gynecol Endocrinol.,* **13**(6), 401-409.

SCHALLY AV (1999b). Luteinizing hormone-releasing hormone analogs: their impact on the control of tumorigenesis. *Peptides*, **20**(10), 1247-1262.

SCHNEIDER R, DORN CR, TAYLOR DO (1969). Factors influencing canine mammary cancer development and post surgical survival. *Journal of National Cancer Institute.* **43**, 1249-1261.

SCHNEIDER R (1970). Comparaison of age, sex and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer,* **26**, 419-426.

SCHWAHN M, SCHUPKE H, GASPARIC A, KRONED, PETER G, HEMPEL R and al (2000a). Disposition and metabolisme cetrorelix, a potent LH-RH antagonist, in rats and dogs. *Drug metabolism and disposition*, **28**, 10-20.

SCHWAHN M, NAGARAJA NV, DERENDORF H (2000b). Population pharmacokinetic/ pharmacodynamic modeling of cetrorelix, a novel LH-RH antagonist, and testosterone in rats and dogs. *Pharmaceutical research*., **17**, 328-335.

SHACHAM S, CHEIFETZ MN, LEWY H, ASHKENAZI IE, BECKER OM, SEGER R, NAOR Z (1999). Mechanism of GnRH receptor signaling: from the membrane to the nucleus. *Annales d'Endocrinologie,* **60**, 79-88.

SIROTKIN AV, TARASENKO LV, NITRAY J, BULLA J (1994). Direct action of LH-RH and its antagonist on isolated bovine granulosa cells steroidogenesis. *J. Endocrinol. Invest.,* **17**, 723-728.

SORENSEN S, RONDEAU JJ, LENEARTS V, BOUTIGNON F, WUTHRICH P, DEGHENGHI R and al. (1996). Radio immunoassay of antarelix a LH-RH antagonist, in plasma and its application for pharmacocinetic study in dogs. *Journal of immunoassay,* **17**, 205-226.

SRKALOVIC G, SZENDE B, REDDING TW, GROOT K, SCHALLY AV (1989). Receptors for D-Trp6-LH-RH, somatastatin, and insulin-like growth factor I in MXT mouse mammary carcinoma. *Peptide receptors in breast cancer,* **192**, 209-217.

STOJILKOVIC SS, TORSELLO A, IIDA T, ROJAS E, CATT KJ (1992). Calcium signaling and secretory responses in agonist-stimulated pituitary gonadotrophs. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.,* **41**, 453-467.

SWIFT AD, CRIGHTON DB (1979). Relative activity, plasma elimination and tissue degradation of synthetic LHRH and certain of its analogues. *J. Endocr.*, **80**, 141-152.

TANI H, INABA T, TAMADA H, SAWADA T, MORI J, TORII R (1996). Increasing GnRH release by periperfused hypothalamus from early to late anoestrus in the beagle bitch. *Neurosci. Lett.*, **207**, 1-4.

TOLIS G, ACKMAN D, STELLOS A, MEHTA A, LABRIE F, FAZEKAS ATA, COMARU-SCHALLY AM, SCHALLY AV (1982). Tumor growth inhibition in patients with prostatic carcinoma treated with LHRH agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* **79**, 1658-1662.

VANDERLIP SL, WING AE, FELT P, LINKIE D, RIVIER J, CONCANNON PW, LASLEY BL (1987). Ovulation induction in anoestrus bitches by pulsatile administration of GnRH. *Lab. Anim. Sci.,* **34**, 459-464.

VICKERY BH, MCRAE GI, BERGSTROM K, BRIONES W, WORDEN A, SEIDENBERG R, SCHANBACHER BD, FALVO R (1983). Effects of an LHRH agonist analog upon sexual function in male dogs. *J. Androl.,* **5**, 28-42.

VICKERY BH, MCRAE GI, BRIONES W, ROBERTS BB, WORDEN A, SCHANBACHER BD, FALVO R (1985). Dose-response studies on male reproductive parameters in dogs with nafarelin acetate, a potent LHRH agonist. . *J. Androl.,* **6**, 53-60.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

VILLALOBOS C, NUNEZ L, FRAWLEY LS, SANCHO JG, SANCHEZ A (1997). Multiresponsiveness of single anterior pituitary cells to hypothalamic releasing hormones: a cellular basis for paradoxical secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* **94**, 14132-14137.

WASS JA, BESSER GM, GOMEZ-PAN A, SCANLON MF, HALL R, KASTIN AJ and al. (1979). Comparaison of long acting analogs of LHRH in man. *Clin. Endocrinol.,* **10**, 419.

WHITE RB, EISEN JA, KASTEN TL, FERNALD RD (1998). Second gene for GnRH in humans. *Proc. Natl. Acad; Sci. USA.,* **95**, 305-309.

WILSON CG, DOWNIE CR, HUGUES JP, ROSER JF (1990). Effects of repeated hCG injections on reproductive efficiency in mares. *Equine Vet. Sci.,* **10**, 301-308.

WRIGHT PJ,VERSTEGEN JP, ONCLIN K, JOCHLE WJ, ARMOUR AF,MARTIN GB, TRIGG TE (2000). Progestin treatment suppresses the oestrous response to the GnRH analogue deslorelin in the bitch. *In:* The 4th international symposium on canine and feline reproduction and the 2nd congress of the european veterinary society for small animal reproduction. Oslo, Norway, 29 June- 1July 2000. p 24.

YAMAGAMI T, KOBAYASHI T, TAKAHASHI K, SUGIYAMA M (1996). Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant mammary tumours. *Journal of Small Animal Practice,* **37**, 462-464.

YANO T, PINSKI J, HALMOS G, SZEPESHAZI K, GROOT K, SCHALLY AV (1994). Inhibition of growth of OV-1063 human epithelial ovarian cancer xenografts in nude mice by treatment with LH-RH antagonist SB-75. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**, 7090-7094.

YU WH, KARANTH S, WALCESZEWKA A, SOWER SA, McCANN SM (1997). A hypothalamic follicle stimulating hormone releasing decapeptide in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* **94**, 9499-9503.

ZARATE A, CANALES ES, STHORY I (1981). Anovulatory effect of a LHRH antagonist in women. *Contraception,* **24**, 315-320.

ZOLMAN JC (1985a). Dynamic model of gonadotropin-releasing hormone receptor function. *Am. J. Physiol.,* **248**(3 Pt 2), R312-319.

ZOLMAN JC, THEODOROPOULOS TJ (1985b). Regulation versus modulation in GnRH receptor function. *Am. J. Med. Sci.,* **289**(3), 91-97.

ZORN JR, TANGER C, ROGER M, GRENIER J, COMARU-SCHALLY AM, SCHALLY AV (1986). Therapeutic hypogonadism induced by a delayed-release preparation of microcapsules of D-Trp-6-LHRH: a preliminary study in eight women with endometriosis. *Int. J. Fertil.,* **31**, 11-27.

PERSPECTIVES D'UTILISATION DES ADMINISTRATIONS CHRONIQUES D'AGONISTES ET D'ANTAGONISTES DE LA GnRH EN MEDECINE VETERINAIRE

KESSLER Thomas

RESUME

La Gonadotrophine Releasing Hormone (GnRH) joue un rôle majeur dans la régulation de la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires qui, elles, modulent l'activité des organes sexuels. Cette étude bibliographique porte sur les administrations chroniques des analogues de la GnRH. L'administration chronique d'agoniste ou d'antagonistes de la GnRH provoque une désensibilisation des cellules gonadotropes qui aboutit une diminution de la production d'hormone lutéinisante (LH) ou à une modification de son mode de sécrétion en fonction de l'espèce étudiée. Les modifications de la sécrétion de l'hormone de stimulation folliculaire (FSH) sont inconstantes et mal expliquées. Les administrations chroniques d'agonistes de la GnRH sont actuellement couramment utilisées en médecine humaine et progressivement avantageusement remplacées par les antagonistes. Ces administrations chroniques d'agonistes et d'antagonistes ne sont actuellement utilisées qu'au stade expérimental en médecine vétérinaire, mais elles apparaissent prometteuses en thérapeutique et en maîtrise de la reproduction chez les carnivores domestiques. De même, leurs utilisations sont en cours de développement pour l'amélioration des protocoles de reproduction assistée chez les bovins, caprins, équidés et porcins.

Mots clés : analogues de la GnRH, administration chronique, désensibilisation hypophysaire, maîtrise de la reproduction, homme, carnivores, équidés, animaux de rente.

JURY :
Président Pr
Directeur Mme CHASTANT-MAILLARD
Assesseur Mme GRIMARD-BALLIF
Invité M

Adresse de l'auteur :
KESSLER Thomas
32A route Joffre
68290 MASEVAUX

PERSPECTIVES OF USE OF CHRONIC ADMINISTRATIONS OF GnRH AGONISTS AND ANTAGONISTS IN VETERINARY MEDICINE.

KESSLER Thomas

SUMMARY

The Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) plays an essential role in regulation of pItuitary's gonadotropins secretion which govern the activity of reproductive organs. This bibliographic study deals with the chronic administrations of GnRH analogues. Chronically administered GnRH agonists or antagonists induce a desensitization of gonadotrope cells and lead to a decrease in Luteinizing Hormone secretion or in a modification of its secretion's mode according to the studied species. The modifications of Follicle Stimulating Hormone secretion are inconstant and not explained. Chronic administrations of GnRH agonists are now currently used in human medicine and progressively advantageously replaced by antagonists. The antagonists are at present just used in experimental stage in veterinary medicine, but they appear to be promising in therapeutics and in reproduction control in pets. In the same way, their uses are in development for the amelioration of controlled reproduction's protocol for bovine, caprine, mare and pig.

KEY WORDS : GnRH analogues, chronic administration, pituitary desensitization, control of reproduction, human, pets, mare, cattle.

JURY :
President Pr
Director Mme CHASTANT-MAILLARD
Assessor Mme GRIMARD-BALLIF
Guest M

Author's address :
KESSLER Thomas
32A route Joffre
68290 MASEVAUX