

Université de Montréal

**Conséquences à long terme d'une restriction de croissance intra-
utérine sur l'axe reproducteur du rat.**

Par

Rébecca GAUDET

Programme de sciences biomédicales
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences (M.Sc.)
en sciences biomédicales

Août 2006

© Rébecca Gaudet, 2006



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Conséquences à long terme d'une restriction de croissance intra-
utérine sur l'axe reproducteur du rat.**

Présenté par :

Rébecca GAUDET

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Puttaswamy Manjunath :	Président-rapporteur
Dre Michèle Brochu :	Directrice de recherche
Dr Lawrence C. Smith :	Membre du jury

RÉSUMÉ

La théorie de la programmation fœtale propose que des maladies de l'âge adulte telles que l'hypertension et les troubles cardiovasculaires auraient une origine fœtale. Également, plusieurs études chez l'humain et l'animal suggèrent que le petit poids de naissance serait associé à un retard pubertaire et/ou à une perturbation du développement de l'ovaire et du testicule. Nous avons créé un modèle de restriction de croissance intra-utérine (RCIU) en donnant à des rates une diète faible en sodium pour la dernière semaine de gestation. Nous avons déjà observé que l'environnement fœtal défavorable créé entraîne des conséquences à long terme sur les systèmes rénal et cardiaque. L'hypothèse émise est que l'altération de l'environnement intra-utérin par la restriction sodique maternelle entraîne des conséquences fonctionnelles à long terme sur la puberté et le développement des gonades et de l'axe hypophysaire-gonadique (HG) du fœtus RCIU. Les objectifs spécifiques sont de déterminer, chez des rats nés de mères ayant reçu ou non la diète faible en sodium, la date d'apparition de l'ouverture vaginale chez les femelles et de la séparation balano-prépuçiale chez les mâles comme indice de la puberté. Ensuite, à l'âge adulte, l'expression génique et protéique de composantes de l'axe HG, la concentration de stéroïdes sexuels sériques et tissulaires gonadiques et l'histologie des gonades seront déterminées. Les résultats obtenus suggèrent que la RCIU aurait, chez le mâle, une influence sur la puberté et favoriserait une accumulation de testostérone gonadique. Chez la femelle RCIU, l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse est augmentée et associée à une production accrue d'estradiol dans l'ovaire. Ces travaux démontrent ainsi la possibilité d'un dimorphisme sexuel en réponse à un environnement fœtal défavorable chez le rat au niveau de l'axe HG et de l'arrivée de la puberté.

MOTS-CLÉS

Programmation fœtale, environnement fœtal défavorable, puberté, système reproducteur, fonction ovarienne, fonction testiculaire, stéroïdogénèse, hormones sexuelles, gonadotrophines, fertilité.

ABSTRACT

The hypothesis of fetal programming proposes that chronic diseases could originate during fetal development. Several studies in human and animal suggest also that low birth weight is associated with delay in onset of puberty and perturbation of gonadal development. To study this phenomenon, we created an animal model of intrauterine growth restriction (IUGR) by providing a low-sodium diet to rats during the last week of gestation. We already observed that this adverse intrauterine environment (AIE) entails long term consequences on renal and cardiac systems. The hypothesis of the present report is that the alteration of intrauterine environment by the maternal low-sodium diet involves long term outcomes on onset of puberty and on pituitary-gonadal (PG) axis development. The aim is to evaluate the date of vaginal opening in females and of balano-prepuccial separation in males as sign of onset of puberty. At adult age, we determined gene and protein expression of several PG axis components, serum and gonadal concentrations of sexual steroids and gonadal histology. These results suggest that IUGR delays the onset of puberty and stimulate the accumulation of gonadal testosterone in males. In IUGR females, gene expression of rate-limiting steroidogenesis enzymes is augmented and correlate with an elevation of ovarian estradiol. This work shows a possibility of sexual dimorphism in response to AIE concerning PG axis and onset of puberty in rat.

KEY WORDS

Fetal programming, adverse intrauterine environment, fetal growth retardation, puberty, reproductive tract, gonadal function, steroidogenesis, sexual hormones, gonadotropins, fertility.

TABLE DES MATIÈRES

PAGE DE PRÉSENTATION DU MÉMOIRE	i
PAGE DE PRÉSENTATION DU JURY	ii
RÉSUMÉ ET MOTS-CLÉS	iii
ABSTRACT AND KEY WORDS	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
Liste des figures et tableaux	vii
Liste des abréviations	viii
1. <u>INTRODUCTION</u>	1
1.1 <u>L'ENVIRONNEMENT FŒTAL ET SES CONSÉQUENCES</u>	2
1.1.1 RESTRICTION DE CROISSANCE INTRA-UTÉRINE	2
1.1.1.1 Étiologies	3
1.1.1.2 Conséquences	4
1.1.2 DÉFINITION DE LA PROGRAMMATION FŒTALE	5
1.1.3 ÉTUDES ÉPIDÉMIOLOGIQUES : POIDS DE NAISSANCE ET FONCTION REPRODUCTRICE	6
1.1.4 MODÈLES ANIMAUX DE PROGRAMMATION FŒTALE	8
1.1.4.1 Aperçu des modèles de programmation fœtale de l'axe reproducteur	9
1.1.5 NOTRE MODÈLE : LA RESTRICTION SODIQUE	10
1.2 <u>AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSIAIRE-GONADIQUE</u>	11
1.2.1 HYPOTHALAMUS	11
1.2.1.1 Anatomie et embryologie	11
1.2.1.2 Fonction endocrine	12
1.2.1.2.1 La gonadolibérine	13
1.2.1.2.1.1 Action sur l'hypophyse	13
1.2.2 HYPOPHYSE	14
1.2.2.1 Anatomie et embryologie	14
1.2.2.2 Fonction endocrine	16
1.2.2.2.1 Hormones glycoprotéiques	16
1.2.2.2.1.1 L'hormone folliculo-stimulante et son récepteur	17
1.2.2.2.1.2 L'hormone lutéinisante et son récepteur	17
1.2.2.2.2 Régulation par les hormones ovariennes	18
1.2.2.2.3 Régulation par les hormones testiculaires	20
1.2.3 DÉVELOPPEMENT DES GONADES ET EMBRYOLOGIE	20
1.2.3.1 Différenciation sexuelle	20
1.2.3.2 Croissance pré- et postnatale des gonades	23

1.2.4 OVAIRES	
1.2.4.1 Anatomie et structure	26
1.2.4.1.1 Récepteurs aux estrogènes	27
1.2.4.2 Ovogenèse et développement folliculaire	28
1.2.4.3 Stéroïdogénèse ovarienne	29
1.2.4.4 Cycle de la reproduction chez la femme	31
1.2.4.5 Cycle de la reproduction chez la rate	32
1.2.5 TESTICULES	
1.2.5.1 Anatomie et structure du testicule	34
1.2.5.1.1 Récepteur aux androgènes	35
1.2.5.2 Spermatogenèse	36
1.2.5.2.1 Régulation hormonale de la spermatogenèse	37
1.2.5.3 Stéroïdogénèse testiculaire	39
1.3 <u>PUBERTÉ ET LA MATURATION DE L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSIAIRE</u>	39
1.3.1 PUBERTÉ	39
1.3.2 DÉCLENCHEMENT DE LA PUBERTÉ	40
1.3.2.1 Hypothèse du gonadostat	43
1.3.2.2 Hypothèse de la maturation du SNC	43
1.3.2.3 Facteurs déclenchants	44
1.4 <u>HYPOTHÈSE DE TRAVAIL ET OBJECTIFS</u>	47
2. <u>ARTICLE</u>	48
<i>LOW-SODIUM INDUCED INTRA-UTERINE GROWTH RESTRICTION IN RAT: IMPACT ON ONSET OF PUBERTY AND GONADAL STEROIDS LEVELS IN ADULTHOOD</i>	
3. <u>DISCUSSION</u>	73
4. <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	81
5. <u>REMERCIEMENTS</u>	89

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Coupe sagittale de l'encéphale : localisation de l'hypothalamus et de l'hypophyse.	12
Figure 2.	L'hypothalamus, l'hypophyse et leur vascularisation.	14
Figure 3.	Développement gonadique à la 8 ^e semaine de grossesse.	23
Figure 4.	Différenciation des organes génitaux internes féminins et masculins au 4 ^e mois de grossesse.	23
Figure 5.	Histologie de l'ovaire.	26
Figure 6.	Ovogenèse.	29
Figure 7.	Stéroïdogénèse ovarienne.	30
Figure 8.	Résumé des interactions hormonales dans les cycles menstruel et ovarien.	32
Figure 9.	Morphologie des cellules vaginales aux différentes phases du cycle oestral chez la rate.	34
Figure 10.	Anatomie interne du testicule.	34
Figure 11.	Spermatogenèse et développement des cellules spermatogéniques.	37
Figure 12.	Régulation hormonale des fonctions testiculaires.	38

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Maturation développementale dans le temps des fonctions de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique chez le rat.	16
Tableau 2.	Classement des souches de rats de laboratoire les plus utilisées.	79

LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C	: Degrés Celsius
ABP	: Protéine liante des androgènes (<i>Androgen binding protein</i>)
ACTH	: Adrénocorticotropine
ADN	: Acide désoxyribonucléique
AMH	: Hormone anti-mullérienne (<i>Anti-mullerian hormone</i>)
ANP	: Peptide natriurétique auriculaire (<i>Atrial natriuretic peptide</i>)
AR	: Récepteur aux androgènes
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
ATP	: Adénosine triphosphate
C	: Carbone
CGP	: Cellules germinales primordiales
Cx43	: Connexine 43
DHEA	: Déhydroépiandrostérone
DHEAS	: Déhydroépiandrostérone-sulfate
DHT	: Dihydrotestostérone
DIO	: Rat souffrant d'obésité induite par la diète (<i>Diet induced obesity</i>)
E2	: Estradiol
EFD	: Environnement foetal défavorable
ER	: Récepteur aux estrogènes
FSH	: Hormone folliculo-stimulante (<i>Follicle-stimulating hormone</i>)
FSHr	: Récepteur de l'hormone folliculo-stimulante
G	: Jour de gestation
GH	: Hormone de croissance (<i>Growth hormone</i>)
GnRH	: Gonadolibérine (<i>Gonadotrophin releasing hormone</i>)
hCG	: Gonadotrophine chorionique ou choriogonadotrophine humaine (<i>Human chorionic gonadotrophin</i>)
HG	: Hypophysaire-gonadique
HHG	: Hypothalamo-hypophysio-gonadique
HIF-1 α	: Facteur 1 alpha inductible par l'hypoxie (<i>Hypoxia inducible factor 1 α</i>)
HSD	: Hydroxystéroïde déhydrogénase
K ⁺	: Potassium
kb	: Kilobases
kDa	: Kilodaltons
LH	: Hormone lutéinisante (<i>Luteinizing hormone</i>)

LH/CGr	: Récepteur de la LH et de la choriogonadotrophine humaine
LHr	: Récepteur de l'hormone lutéinisante
Na⁺	: Sodium
NADH	: Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NO	: Monoxyde d'azote (<i>Nitric oxyde</i>)
O₂	: Oxygène
OV	: Ouverture vaginale
P	: Post-natal
PA	: Pression artérielle
PK	: Protéine kinase
PKA	: Protéine kinase A
PKB	: Protéine kinase B
PKC	: Protéine kinase C
PRA	: Activité rénine plasmatique (<i>Plasma renin activity</i>)
PRL	: Prolactine
RCIU	: Restriction de croissance intra-utérine
RLF	: Facteur similaire à la relaxine (<i>Relaxin-like factor</i>)
RT	: Transcription inverse (<i>Reverse transcription</i>)
RT-PCR	: Transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
SBP	: Séparation balano-prépuçiale
scc	: Enzyme clivant la chaîne carbonée latérale (<i>Side chain cleavage</i>)
SD	: Sprague-Dawley
SHR	: Rat spontanément hypertendu (souche) (<i>Spontaneous Hypertensive Rat</i>)
SNA	: Système nerveux autonome
SNC	: Système nerveux central
SRAA	: Système rénine-angiotensine-aldostérone
SRY	: Gène de la région déterminante du sexe sur le chromosome Y (<i>Sex determining region Y gene</i>)
StAR	: Protéine régulatrice de la stéroïdogénèse (<i>Steroidogenic acute regulatory proteine</i>)
WKY	: Wistar Kyoto
X	: Chromosome sexuel X
Y	: Chromosome sexuel Y
ZDF	: Rat Zucker diabétique (<i>Zucker Diabetic Fatty</i>)

INTRODUCTION

1.1 L'ENVIRONNEMENT FŒTAL ET SES CONSÉQUENCES

La condition de la grossesse est importante à considérer lorsque vient le temps de comprendre et d'expliquer l'apparition à l'âge adulte de maladies chroniques spécifiques au sexe. Il va sans dire qu'une insulte fœtale est tout aussi dommageable pour les organes reproducteurs que pour les autres systèmes du corps, seulement cela semble plus complexe à étudier vu les multiples facettes du problème (endocrinologie, cycle menstruel, différences entre les deux sexes, système nerveux central (SNC), etc.). Le fait que certaines conditions pathologiques de la fonction reproductrice pourraient avoir des origines fœtales prend toute son importance lorsque l'on songe aux conséquences qu'a la diminution de la fertilité des êtres humains sur la société et les générations futures. La recherche se penche de plus en plus sur les troubles de la fonction reproductive qui représentent un sujet chaud à l'heure actuelle. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'influence de l'environnement intra-utérin sur le développement foetal et particulièrement sur les conséquences au niveau de l'axe reproducteur.

1.1.1 LA RESTRICTION DE CROISSANCE INTRAUTÉRINE

Trois conditions dont deux pathologiques entourent la notion de faible poids de naissance. La condition normale réfère à un bébé en santé, mais de petite constitution. Les situations pathologiques sont les accouchements pré-terme et la restriction de croissance intra-utérine (RCIU). Aux États-Unis, la RCIU est à l'origine d'une augmentation de 6 à 10 fois de la mortalité périnatale (Vandenbosche & Kirchner, 1998). Avant le début des années 60, on assumait qu'un nouveau-né de poids inférieur à 2 500g souffrait de retard de croissance. Depuis, le débat est considérable au sujet des limites à utiliser pour les bébés nés petits pour leur âge gestationnel. Maintenant, un diagnostic de RCIU est posé lorsque le poids du nouveau-né se trouve sous le 10^e percentile pour l'âge gestationnel (Resnik, 2002).

La RCIU est généralement classifiée en deux catégories : symétrique et asymétrique. La RCIU symétrique concerne un fœtus dont le corps entier est proportionnellement plus petit, caractérisé par une tête, un squelette et une circonférence abdominale de dimensions inférieures. Ce type de RCIU apparaît lors d'une insulte précoce dite interne, telle une infection ou un syndrome congénital(e), une anomalie chromosomique, un facteur toxique ou autre. La croissance et la division cellulaires en sont ainsi diminuées. Ces bébés naissent de poids et de longueur plus faibles et une récupération

pondérale lors de la croissance post-natale est rarement observée chez eux. La RCIU asymétrique est plus sévère et les fœtus en souffrant ont une tête de grosseur normale, mais une circonférence abdominale moindre causée par la diminution des masses musculaire et graisseuse. Cette croissance asymétrique est la conséquence de la non disponibilité de substrats nécessaires au métabolisme fœtal causée par des facteurs provenant de l'extérieur, le plus souvent par une anomalie vasculaire maternelle réduisant la perfusion utéro-placentaire. L'atteinte survient généralement plus tard dans la grossesse, au moment où la croissance des cellules se fait en taille plutôt qu'en nombre. Un recouvrement de croissance est plus souvent observé dans ce cas (Kanaka-Gantenbein *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2006; Peleg *et al.*, 1998; Resnik, 2002).

1.1.1.1 Étiologies

Les fœtus nés avec RCIU forment la constituante pathologique d'un groupe de bébés dits nés petits pour l'âge gestationnel (*small-for-gestational-age*). Plusieurs de ces enfants sont normaux, mais plus petits de par la constitution génétique de leurs parents. De nombreux facteurs peuvent être à l'origine de la RCIU. C'est donc par rétrospection et après la naissance que l'on peut faire la distinction entre un bébé qui en a souffert et un bébé normal de plus petite constitution (Peleg *et al.*, 1998).

Des RCIU de cause connue (environ 60%), le tiers est attribuable à des variants génétiques (aberrations chromosomiques et autres désordres génétiques) alors que deux tiers sont déterminés par des facteurs environnementaux tels que les conditions maternelles (infection chronique, atteinte rénale ou vasculaire, éclampsie), placentaires (infection intra-utérine, insuffisance utéro-placentaire, autres anomalies du placenta) et extrinsèques (environnement socio-économique, abus de substances nuisibles (tabac, alcool, drogues et médicaments) par la mère ou sa malnutrition). Environ 40% des cas de RCIU sont idiopathiques. Une diminution de l'expansion du volume circulant maternel a toutefois été corrélée avec une certaine proportion de ces cas de RCIU (Rosso *et al.*, 1993; Kanaka-Gantenbein *et al.*, 2003).

D'autres causes ont été mises en évidence dans la genèse de la RCIU. L'hypoxie a des effets via la transcription du facteur HIF-1 α (*hypoxia inducible factor*) qui, à son tour, active la transcription des gènes en réponse aux concentrations d'oxygène (O₂). L'O₂ contrôle le développement de l'arbre vasculaire villositaire et de la prolifération trophoblastique et a donc un impact sur le transport placentaire (Myatt, 2006). L'altération de la nutrition maternelle durant la grossesse a un impact direct à plusieurs

niveaux, notamment sur la synthèse du monoxyde d'azote (NO) et des polyamines. Ceci peut réduire le débit sanguin fœto-placentaire, ou encore augmenter la pression artérielle fœtale en réduisant la vasodilatation dépendante du NO (Wu *et al.*, 2004). Par ailleurs, le stress oxydatif est augmenté durant la grossesse normale, et cette augmentation est exacerbée lors d'une complication telle que la prééclampsie (Wang *et al.*, 1992). Le trophoblaste produit des espèces réactives dérivées de l'oxygène (stress oxydatif); il exprime la NADPH oxydase qui est la majeure source enzymatique de superoxydes. L'expression de cette enzyme est d'ailleurs augmentée lors de la prééclampsie (Cui *et al.*, 2006). Le stress oxydatif peut donc altérer le développement du placenta et avoir des conséquences sur le fœtus. Des altérations dans l'expression placentaire de certains transporteurs de glucose et d'acides aminés ont également été rapportées dans des cas de grossesses avec RCIU (Myatt, 2006).

La disponibilité des nutriments et des acides aminés peut altérer les patrons d'expression de certains gènes, cela se traduit par des changements sur la structure de la chromatine. On parle de phénomènes épigénétiques. Les mécanismes les plus connus sont la méthylation de l'ADN et les modifications des histones (acétylation ou méthylation). En effet, il a été démontré chez le rat en période néonatale qu'une insuffisance utéroplacentaire était liée à une hypométhylation du gène p53 au niveau du rein (Pham *et al.*, 2003), aussi bien qu'à une hypométhylation globale de l'ADN et à une hyperacétylation des histones au niveau hépatique (MacLennan *et al.*, 2004). Des travaux sur la souris montrent également qu'un supplément de donneurs de groupements méthyl- et de cofacteurs (acide folique, vitamine B-12) dans la diète maternelle augmente la méthylation des îlots CpG sur le locus particulier *A^v*, responsable de la couleur du pelage. Ces patrons de méthylation ont persisté jusqu'à l'âge adulte (Waterland & Jirtle, 2004; Wu *et al.*, 2004). Bien que très récent, l'aspect épigénétique demeure extrêmement intéressant afin d'expliquer les conséquences à long terme de la RCIU induit par un changement de diète maternelle. Ceci pourrait donc être un élément clé dans la programmation fœtale.

1.1.1.2 Conséquences

La plupart des enfants nés avec RCIU présentent un taux de croissance normal. Cependant, des études ont démontré qu'au moins le tiers de ceux-ci n'atteindront jamais une taille normale. Plus l'enfant est petit et l'âge gestationnel bas, moins il aura de chance de récupérer (Peleg *et al.*, 1998).

Plusieurs complications ont été observées chez les enfants nés avec une RCIU ; en effet, celles-ci dépendent de la période de la grossesse où se produit l'insulte et sont aussi nombreuses que les causes. Si l'on exclut les plus graves atteintes fœtales telles l'aneuploïdie, les infections et les malformations congénitales, les fœtus ayant souffert d'une privation faible à modérée d'oxygène et de nutriments survivent. Ce manque peut entraîner plusieurs atteintes métaboliques : hypoxie néonatale, encéphalopathie, hypoglycémie, polycythémie, hypocalcémie, hypothermie et bien d'autres. Ces enfants ont bien évidemment un risque élevé de morbidité et de mortalité néonatales (Murphy *et al.*, 2006;Resnik, 2002).

Plusieurs travaux chez l'homme et chez l'animal suggèrent que la RCIU aurait des conséquences à long terme sur le développement cardiovasculaire et métabolique : hypertension, diabète de type II, maladies coronariennes, cholestérol, syndrome métabolique, syndrome de l'ovaire polykystique (Barker, 1997c;Barker, 1997b;Barker, 1997a). Le développement neurologique est également lié au degré de retard de croissance ; aussi a-t-il été démontré qu'en plus d'accroître le risque de paralysie cérébrale, la RCIU est liée à des troubles d'ajustement psychosocial, une diminution du quotient intellectuel ainsi qu'à des déficits d'attention et de performance (Kanaka-Gantenbein *et al.*, 2003;Peleg *et al.*, 1998;Resnik, 2002).

1.1.2 DÉFINITION DE LA PROGRAMMATION FOETALE

L'hypothèse des origines fœtales des maladies de l'adulte propose que l'individu en développement s'adapte aux changements de nutrition et de statut endocrinien survenant *in utero*. Ceci peut modifier la structure, le fonctionnement ou le métabolisme de façon permanente et prédispose l'individu à des maladies de l'âge adulte telles diverses affections cardiovasculaires, métaboliques et endocriniennes. Un stimulus ou une insulte survenant à une période critique ou sensible du développement fœtal peut avoir des effets à long terme sur l'individu. C'est ce qu'on appelle la programmation fœtale. Une insulte qui se produirait en période de division rapide des cellules, par exemple, pourrait réduire le nombre de cellules dans certains organes et ce, de façon permanente. Au point de vue de l'évolution, ce phénomène reflète les avantages de la plasticité pendant le développement embryonnaire précoce. Par exemple, la maladie coronarienne pourrait être une conséquence de l'adaptation fœtale à une malnutrition qui est bénéfique pour la survie du bébé à court terme, au risque de lui nuire plus tard dans sa vie (Barker, 1997c;Godfrey & Barker, 2000).

Un grand nombre d'études ont documenté la programmation fœtale en utilisant une variété d'espèces dont l'environnement intra-utérin a été altéré de différentes manières. L'induction d'un environnement fœtal défavorable par un stress maternel, une hypoxie, une administration de glucocorticoïdes, une manipulation de la diète ou une insuffisance placentaire mène à des anomalies post-natales à long terme des fonctions cardiaque, vasculaire, métabolique et endocrinienne (changements de la pression artérielle (PA), du taux de cholestérol, de la balance hépatique du glucose et du développement rénal par exemple) chez le rat, l'agneau, le cobaye, le singe, le porc, le cheval et les primates (Fowden *et al.*, 2006). C'est ainsi dire que ces travaux sont essentiels pour l'étude des maladies de l'humain adulte (Godfrey & Barker, 2000).

1.1.3 ÉTUDES ÉPIDÉMIOLOGIQUES : POIDS DE NAISSANCE ET FONCTION REPRODUCTRICE

En ce qui a trait aux études sur la programmation fœtale, les maladies cardiaques et l'hypertension sont sans doute les premières à avoir été investiguées et sont depuis les plus étudiées. Un des signes de la détresse fœtale est la redistribution du flot sanguin vers le cœur et le cerveau au détriment d'autres organes tels le rein, le pancréas et le foie, qui peuvent en souffrir et ne pas se développer adéquatement. Bien que des groupes se soient déjà intéressés aux effets à long terme de la nutrition maternelle sur le potentiel de reproduction de la progéniture (Alden, 1970), ce n'est que récemment que des associations entre la RCIU et des désordres de la fonction reproductrice chez l'humain ou l'animal ont été documentées (Delemarre-van de Waal HA *et al.*, 2002; Engelbregt *et al.*, 2000; Ibanez *et al.*, 2000b; Ibanez *et al.*, 2000a).

En 1998, des études menées par un groupe hollandais ont suggéré que la RCIU pouvait affecter la croissance de l'ovaire lors du développement embryologique, celui-ci étant anatomiquement près du rein. Dans une population de bébés autopsiés après mort périnatale, ils ont retenu quatre nouveaux-nés atteints de RCIU sévère et quatre témoins, paires selon l'âge gestationnel. Leurs travaux ont démontré une diminution de la proportion de follicules primordiaux chez les RCIU par rapport aux fœtus normaux et suggèrent que les femmes nées avec RCIU pourraient ainsi rencontrer des problèmes de fertilité à long terme (de Bruin *et al.*, 1998). Par la suite, d'autres groupes se sont intéressés au syndrome de l'ovaire polykystique et ont démontré une association intéressante avec l'environnement prénatal. Une étude sur 235 femmes suggère en effet que le syndrome aurait des origines intra-utérines. Les auteurs proposent que le fait d'être nées post-terme ou avec un poids élevé pourrait avoir résulté en une altération permanente du contrôle hypothalamique de la relâche

d'hormone lutéinisante (LH, *luteinizing hormone*), donnant ainsi lieu aux désordres rencontrés chez les femmes atteintes du syndrome de l'ovaire polykystique. Les patrons de relâche hormonale et de sensibilité des tissus qui s'établissent *in utero* pourraient donc influencer le développement d'une maladie à l'âge adulte (Godfrey & Barker, 2000). Par ailleurs, une étude d'ultrasonographie menée par l'équipe de Ibáñez et collègues sur 12 jeunes filles nées avec un petit poids a démontré des poids ovarien et utérin réduits comparativement aux témoins (Ibanez *et al.*, 2000b). Persson et collègues ont également trouvé que la puberté chez de jeunes filles nées petites pour l'âge gestationnel était devancée de quelques mois. Le même phénomène n'a toutefois pu être observé chez les garçons (Persson *et al.*, 1999).

La programmation de l'axe reproducteur a fait l'objet de quelques revues de littérature intéressantes (Davies & Norman, 2002; Hokken-Koelega, 2002; Rhind *et al.*, 2001). D'après des données éparées, les auteurs ont proposé plusieurs hypothèses. On y explique que l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique (HHG) est plus ou moins sensible à divers stimuli de l'environnement selon la période fœtale. De façon plus précise, la testostérone et l'estradiol (E2) jouant un rôle-clé dans la différenciation sexuelle, des perturbateurs endocriniens, comme des composés chimiques synthétiques, peuvent altérer les niveaux de ces hormones et leurs actions subséquentes et ainsi avoir un impact négatif sur le développement du système reproducteur (Davies & Norman, 2002). En fait, la programmation peut se faire autant par des changements aux niveaux hypothalamique et hypophysaire qu'au niveau des gonades. Le stade de développement fœtal auquel chacun de ces organes est sensible aux perturbations est différent. L'affection ne sera pas la même dépendant de l'insulte en question, mais sera d'autant plus grande si le stress survient en période de développement et de différenciation rapides des gonades. L'effet à l'âge adulte varie également selon l'organe affecté et l'âge auquel le fœtus a été exposé (Rhind *et al.*, 2001).

Pour sûr, les relations entre les paramètres périnataux, le développement sexuel hormono-dépendant et le risque de maladies à long terme ont suscité récemment un intérêt grandissant. Étant relativement peu documenté, il reste difficile de départager le tout à propos de ce sujet précis qu'est la programmation fœtale de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique. Les observations qui en ressortent sont parfois divergentes et manquent peut-être de consistance (Davies & Norman, 2002). Rhind et collègues soutiennent également que plusieurs mécanismes sous-tendant les effets de la sous-nutrition maternelle sur la progéniture restent incompris, de même que l'importance des retards de développement durant la première moitié de la grossesse en lien avec la capacité subséquente

de se reproduire dans la vie (Rhind *et al.*, 2001). Il va sans dire que les percées solides sont peu nombreuses dans ce domaine et que l'on doit poursuivre les travaux pour éclaircir les mécanismes environnant la programmation foetale et ses conséquences.

1.1.4 MODÈLES ANIMAUX DE PROGRAMMATION FOETALE

Il est plutôt malaisé d'étudier le phénomène de programmation foetale chez l'humain étant donné sa longévité et l'influence des multiples facteurs extérieurs incontrôlables, tels que le mode de vie, l'apport nutritionnel, le tabagisme et l'abus d'autres substances nuisibles, sans oublier tout le volet des émotions et du stress qui ont un impact réel sur la condition physique. Jusqu'à ce jour, plusieurs approches expérimentales chez l'animal ont permis d'induire un environnement foetal défavorable, la RCIU étant une des conséquences possibles. Les principaux modèles animaux se classent dans trois grandes catégories : les modèles nutritionnels qui consistent en une modification de la diète maternelle, ceux où une insulte de type hormonal est faite, comme une exposition *in utero* à différents stéroïdes et enfin les modèles où une chirurgie est pratiquée afin de réduire le flot sanguin placentaire. Plusieurs groupes étudient même le devenir des foetus (surtout au niveau de la fonction reproductive) exposés à une substance toxique *in utero* (Guillette, Jr. & Gunderson, 2001).

Il existe plusieurs manœuvres permettant d'induire une restriction de croissance du foetus via la nutrition maternelle, telles que la réduction de l'apport protéique (Langley & Jackson, 1994) qui est à ce jour étudiée de façon extensive, la sous-nutrition par une restriction calorique (Woodall *et al.*, 1996) ainsi que la déficience de la diète en un nutriment spécifique (vitamine, minéral) comme le fer (Crowe *et al.*, 1995). Autant chez l'humain que chez l'animal, il a également été prouvé qu'une diminution du poids de naissance est observée suite à une exposition du foetus aux glucocorticoïdes pendant le développement intra-utérin (Reinisch *et al.*, 1978). L'exposition foetale à des perturbateurs endocriniens tels que les stéroïdes fait également l'objet de plusieurs travaux. Par exemple, l'exposition prénatale aux androgènes chez l'agneau cause un délai de l'apparition des pics de LH et d'hormone folliculostimulante (FSH, *follicle stimulating hormone*) chez la femelle et altérerait donc le rétrocontrôle positif de l'E2 (Sharma *et al.*, 2002).

1.1.4.1 Aperçu des modèles de programmation fœtale de l'axe reproducteur

Les principales études animales se penchent notamment sur les indices d'apparition de la puberté, le poids des organes reproducteurs et la morphologie de leurs cellules, les concentrations de stéroïdes et la réponse gonadique en général. Un groupe en particulier a mené un bon nombre d'études sur la progéniture de brebis gestantes ayant reçu une diète restreinte au niveau énergétique (calorique) aux premiers stades de la gestation. Ils ont observé une réduction du poids des ovaires (Rae *et al.*, 2001) et du nombre de follicules (Da Silva *et al.*, 2002) ainsi qu'un pourcentage supérieur de cellules méiotiques dans les ovaires fœtaux du groupe expérimental indiquant que le développement de ces ovaires était moins avancé (Borwick *et al.*, 1997). Chez le fœtus mâle, l'expression de la protéine de transport du cholestérol (StAR, *Steroidogenic acute regulatory protein*) est augmentée dans le tissu testiculaire entraînant une hausse conséquente de la testostérone plasmatique (Rae *et al.*, 2002). L'expression hypophysaire du gène de la sous-unité bêta de la LH est aussi diminuée chez les deux sexes (Da Silva *et al.*, 2002). Un autre groupe a par ailleurs démontré que le nombre de cellules de Sertoli chez des agneaux nouveaux-nés dont la mère souffrait de malnutrition était inférieur à celui d'un groupe témoin (Bielli *et al.*, 2002). Les indices reconnus pour déterminer l'apparition de la puberté sont la séparation balano-prépuçiale (SBP) et l'ouverture vaginale (OV). Un groupe hollandais s'est intéressé au lien entre la RCIU et la puberté. Une RCIU induite par la ligature de l'artère utérine chez la rate au début de la troisième (et dernière) semaine de la gestation retarde l'arrivée de la puberté chez la progéniture des deux sexes. Les auteurs expliquent cependant que ce retard ne dépend pas de l'atteinte d'un poids critique (Engelbregt *et al.*, 2000). Nous reviendrons sur ce concept de poids critique (section 1.3.2). Chez les femelles RCIU, la date du premier cycle oestral est retardée et après stimulation des ovaires, le nombre de follicules primordiaux et antraux est inférieur à celui des témoins (Engelbregt *et al.*, 2002). Chez des rats dont la RCIU a été induite par une restriction calorique (Carney *et al.*, 2004; Leonhardt *et al.*, 2003) ou protéique (da Silva *et al.*, 2004; Zambrano *et al.*, 2005) maternelle, un retard de puberté ainsi qu'un poids inférieur de l'utérus, des ovaires et des testicules ont été observés. De plus, une diminution de la fertilité chez les mâles RCIU a été démontrée. En effet, le nombre de spermatozoïdes à 270 jours de vie est diminué d'environ 16% chez les RCIU et le taux de fertilité est réduit lorsque ces mâles sont croisés avec des femelles dont le cycle oestral est régulier (Zambrano *et al.*, 2005). L'ensemble de ces travaux permet de constater que, peu importe la manière d'induire la RCIU, des conséquences à long terme sur l'axe reproducteur sont remarquées.

1.1.5 NOTRE MODÈLE : LA RESTRICTION SODIQUE

Notre équipe a développé un modèle d'environnement fœtal défavorable en donnant une diète faible en sodium (Na^+) à des rates pendant la dernière des trois semaines de gestation. La réduction de l'augmentation du diamètre des artères utérines et de l'expansion du volume plasmatique observée chez ces mères suggère une diminution de la perfusion placentaire (Roy-Clavel *et al.*, 1999; St Louis *et al.*, 2006). Le poids des placentas plus faible que chez le groupe témoin reflète probablement une diminution des échanges fœtaux-maternels. De plus, les ratons naissent plus petits en taille et en poids et souffrent ainsi de RCIU (Roy-Clavel *et al.*, 1999). Le modèle animal élaboré dans notre laboratoire est d'intérêt puisque la RCIU idiopathique a déjà été associée à une moindre expansion volumique chez l'humain (Rosso *et al.*, 1993; Salas *et al.*, 2006). Nous avons démontré que le poids du cœur et du cerveau des fœtus RCIU est semblable à celui des témoins, mais que leurs reins sont de poids plus faible (Battista *et al.*, 2002). Ceci suggère une redistribution du flot sanguin se faisant préférentiellement vers le cerveau et le cœur au détriment d'autres organes périphériques et est indicateur d'une RCIU asymétrique (de Bruin *et al.*, 1998; Jensen *et al.*, 1999).

Par ailleurs, l'aldostérone, l'activité rénine (Roy-Clavel *et al.*, 1999) et l'urée plasmatiques sont augmentées chez les mères ayant reçu la diète faible en sodium comparées aux témoins alors que le sodium plasmatique, l'urée rénale et la clairance de la créatinine sont diminués (Bedard *et al.*, 2005). La densité protéique des récepteurs à l'angiotensine II (AT_1 et AT_2) hypophysaires et de AT_2 du cortex surrénalien est plus faible dans le groupe avec diète spéciale. La restriction sodique induit également une diminution de la protéine AT_1 placentaire. Ces derniers résultats suggèrent un rôle dans la réponse RCIU à la faible quantité de Na^+ (Bedard *et al.*, 2005).

À partir de la 5^e semaine de vie jusqu'à l'âge adulte (12 semaines), la (PA) systolique des femelles RCIU est plus élevée que celle des animaux témoins. À l'âge adulte, celles-ci présentent également une hausse de l'activité rénine plasmatique (PRA) et de la concentration de corticostérone ainsi qu'une diminution des niveaux d'aldostérone. Le poids relatif du ventricule gauche est augmenté, suggérant une hypertrophie cardiaque. Cette hypertrophie a été confirmée par les travaux de Battista et collègues non seulement par une augmentation de l'expression génique de l'ANP (Battista *et al.*, 2002), mais également aux niveaux cellulaire, moléculaire et métabolique (Battista *et al.*, 2005). D'autre part, ces travaux ont mis en évidence des différences dans l'expression de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ pouvant être impliquées dans la baisse de contractilité des cardiomyocytes. Les

concentrations élevées d'urée et de créatinine plasmatiques mesurées chez les femelles RCIU adultes suggèrent une atteinte de la fonction glomérulaire, sans toutefois que le nombre de glomérules ni la surface occupée par ceux-ci ne soient altérés (Battista *et al.*, 2002). Des travaux concernant la pompe Na⁺/K⁺/ATPase et d'autres facteurs métaboliques importants au niveau du rein sont présentement en cours [Gagnon, en préparation].

À première vue, les mâles semblent moins souffrir de la RCIU puisque les seuls changements remarquables à l'âge adulte sont une élévation de la PRA et de l'urée plasmatique. Par contre, comme chez les femelles, la PA systolique est augmentée à partir de la 5^e semaine de vie. Aucune évidence d'hypertrophie cardiaque n'a été observée dans ce groupe (Battista *et al.*, 2002).

1.2 L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSIAIRE-GONADIQUE

1.2.1 L'HYPOTHALAMUS

1.2.1.1 Anatomie et embryologie

L'hypothalamus couronne en quelque sorte le tronc cérébral. Il fait partie du diencephale et se trouve à la base du cerveau, coincé entre l'éminence médiane et le chiasma optique (figure 1). L'hypothalamus est divisé symétriquement en moitiés gauche et droite par le troisième ventricule cérébral. Cette structure qui renferme du liquide céphalo-rachidien est située en position médiane de manière à ce que l'hypothalamus forme son plancher et ses parois latérales (Johnson MH & E.B., 2002d; Marieb EN, 1999b; Tortora GJ & G.S., 2001a).

L'hypothalamus se développe à partir de la plaque neurale. Les trois premières subdivisions de la plaque neurale sont le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. Au cours de la 5^e semaine, le prosencéphale se sépare en télencéphale et diencephale. Les lames alaires forment les parois du diencephale. Ces dernières donnent lieu à des renflements embryonnaires d'où se différenciera l'hypothalamus. Il sera complètement développé entre la 11^e et la 12^e semaine de la grossesse (Larsen W., 2003).

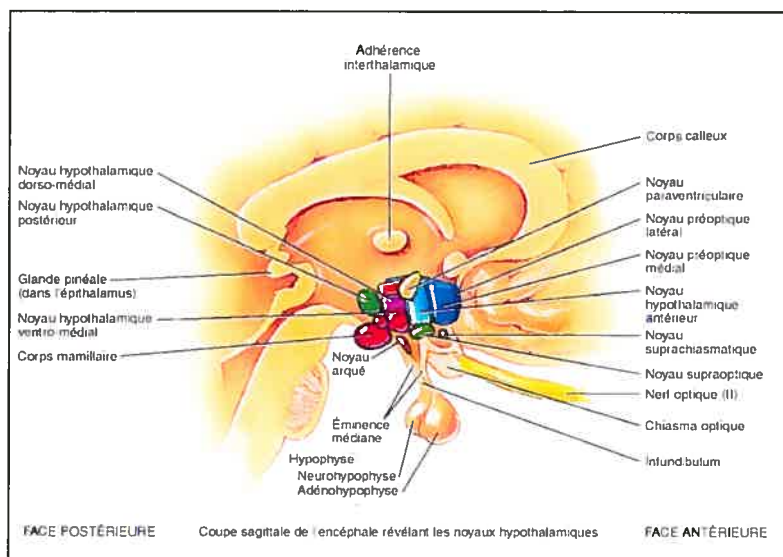


Figure 1. Coupe sagittale de l'encéphale : localisation de l'hypothalamus et de l'hypophyse.
(Tortora GJ. 2001)

Chez le rat, la plaque neurale se forme autour des jours 8 et 9 de la gestation. Ses trois subdivisions sont présentes aux jours 10 et 11 (Beaudoin AR, 1980). On retrouve chez l'embryon de rat des composantes d'origine hypothalamique telle que la gonadolibérine à partir du 12^e jour de gestation (Huhtaniemi, 1995). Le système nerveux central du rat mature est en général très similaire à celui de l'humain le bulbe olfactif est toutefois plus volumineux (Kohn DF, 1984). Un tableau résumé de l'apparition des différentes composantes de l'axe HHG chez le rat se trouve dans la section 1.2.2.1.

1.2.1.2 Fonction endocrine

L'hypothalamus constitue le principal centre de régulation des fonctions physiologiques via la sécrétion de nombreuses hormones dont la gonadolibérine (GnRH) qui joue un rôle majeur dans la fonction reproductrice. Il remplit également de nombreux rôles aux niveaux neuroendocrinien, comportemental et autonome, chacun étant associé à divers noyaux hypothalamiques (figure 1). Les noyaux supraoptique, paraventriculaire, arqué, ventromédian et supra-chiasmatique ainsi que les zones moins bien définies des aires hypothalamiques médiane antérieure et préoptique médiane sont particulièrement impliqués dans la fonction reproductrice. Ces régions sont connectées à l'hypophyse directement par voie nerveuse ou indirectement par voie vasculaire (Johnson MH & E.B., 2002d; Marieb EN, 1999b; Tortora GJ & G.S., 2001a).

1.2.1.2.1 La gonadolibérine

Le gène de la GnRH se trouve sur le chromosome 8 chez l'humain et 15 chez le rat. L'hormone GnRH est un décapeptide, fruit du clivage de la prépro-GnRH (Cheng & Leung, 2005). Elle est produite par les cellules neurosécrétoires de l'hypothalamus (figure 1). Les terminaisons nerveuses véhiculant la GnRH sont très abondantes dans la région du réseau capillaire porte de la zone palissadique de l'éminence médiane. Cela constitue le site primaire de neurosécrétion de ce peptide dans les vaisseaux portes (Johnson MH & E.B., 2002d).

1.2.1.2.1.1 Action sur l'hypophyse

La GnRH est considérée comme le médiateur le plus important des facteurs d'intervention du SNC sur la reproduction. Elle stimule la relâche des gonadotrophines FSH et de LH par l'hypophyse. Toute anomalie en ce qui a trait au stockage, à la synthèse, à la libération ou à l'action de la GnRH aura pour résultat une perte partielle ou complète de la fonction gonadique (Johnson MH & E.B., 2002d). Une destruction des neurones producteurs de l'hormone au niveau hypothalamique empêche également l'action gonadotrope et entraîne une atrophie des gonades. En fait, la sécrétion périphérique de gonadotrophines et de GnRH dans le système porte hypophysaire s'effectuent parallèlement de façon pulsatile ; chaque pic périphérique de LH coïncide avec un *pulse* de GnRH. Le générateur de cette libération pulsatile de la GnRH est parfois appelé *horloge circulaire* et semble être situé dans l'hypothalamus (Johnson MH & E.B., 2002d). Chez l'homme adulte, la pulsation de GnRH est invariable et se produit à toutes les deux heures. Chez la femme, le patron de pulses change durant le cycle ; ils augmentent graduellement de fréquence durant la phase folliculaire et d'amplitude pendant la phase ovulatoire. Après l'ovulation, la fréquence des pulses de GnRH diminue en raison de l'effet inhibiteur des hormones produites par le corps lutéal (Marshall *et al.*, 1992). Ceci peut se comprendre en termes de régulation par la GnRH de ses propres récepteurs au niveau des cellules gonadotropes. La réponse à une première onde de GnRH correspond au largage initial des réserves de LH et de FSH qui survient après quelques minutes et se maintient de 30 minutes à une heure. Ensuite, les granules sécrétoires migrent et s'accumulent sous la membrane cellulaire où elles se compriment, leur contenu devenant mature. En conséquence de cette mobilisation de granules, une deuxième exposition à la GnRH entraîne une libération beaucoup plus importante de LH et de FSH. Suite à une exposition prolongée à des pulses réguliers de GnRH, la synthèse des gonadotrophines se trouve stimulée (Johnson MH & E.B., 2002d).

Le mécanisme pulsatile est crucial pour les sécrétions gonadotropes. Par exemple, lors de l'élimination de la GnRH endogène par destruction de l'hypothalamus médioventral, les sécrétions de LH et de FSH ne sont rétablies qu'à l'aide d'une pompe libérant de la GnRH suivant une pulsativité simulant la fréquence normale. Une perfusion continue de GnRH ne peut restaurer un cycle menstruel régulier (Johnson MH & E.B., 2002d). Suite à la liaison de la GnRH à son récepteur, ces complexes sont maintenus à la membrane où certains sont internalisés vers les lysosomes pour dégradation. Lors d'une exposition continue des cellules gonadotropes à la GnRH, les récepteurs sont maintenus occupés, aboutissant à une internalisation totale des récepteurs et donc, à une réduction de la sécrétion hypophysaire de LH et de FSH (phénomène de régulation à la baisse) (Goldfien A, 2001; Johnson MH & E.B., 2002d; Young J *et al.*, 1999).

1.2.2 L'HYPHYPHYSE

1.2.2.1 Anatomie et embryologie

L'hypophyse se trouve dans la selle turcique de l'os sphénoïde et est recouverte par un repli circulaire de la dure-mère (figure 2). Cette dernière comporte une petite ouverture centrale par laquelle passe l'infundibulum. L'hypophyse a une riche vascularisation qui provient des artères carotidiennes internes via leurs branches hypophysaires supérieure et inférieure. De courts vaisseaux émergeant de la surface glandulaires effectuent le drainage veineux (Johnson MH & E.B., 2002d; Tortora GJ & G.S., 2001a).

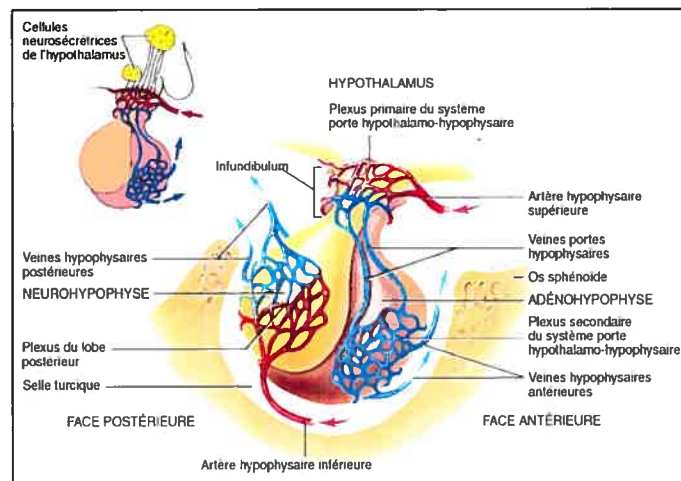


Figure 2. L'hypothalamus, l'hypophyse et leur vascularisation.
(Tortora GJ. 2001)

L'hypophyse humaine, autrefois appelée glande pituitaire, est composée de deux lobes. Le lobe inférieur nommé adénohypophyse est dérivé de la poche de Rathke, un diverticule venant de la partie dorsale du pharynx embryonnaire. L'adénohypophyse est composée de cellules hormonopoïétiques. Ce lobe s'adosse au lobe postérieur, la neurohypophyse qui est composée de pituitocytes et de neurofibres. Elle est connectée avec l'hypothalamus sus-jacent par l'intermédiaire d'un pédicule de tissu nerveux, l'infundibulum, situé près de l'éminence médiane (figures 1 et 2) (Johnson MH & E.B., 2002d; Marieb EN, 1999b).

Le canal neural embryonnaire forme les ventricules primitifs qui sont à l'origine du système ventriculaire de l'encéphale. Durant la 3^e semaine, l'infundibulum apparaît au plancher du 3^e ventricule puis s'accroît de façon ventrale. En même temps, une placode ectodermique se met en place et forme un diverticule, la poche de Rathke. Cette dernière grandit vers l'infundibulum et se différencie en adénohypophyse. La portion distale de l'infundibulum forme la neurohypophyse (Larsen W., 2003).

Le développement embryologique hypophysaire du rat est tout à fait comme celui de l'humain. La poche de Rathke apparaît vers le jour 10 de gestation et l'hypophyse primordiale se forme vers les jours 11-12 (Beaudoin AR, 1980). Dès la 2^e semaine de gestation, la GnRH est repérée dans le liquide amniotique et peu après, dans le bulbe olfactif du fœtus. Les neurones GnRH commencent leur migration depuis ce bulbe jusqu'à l'hypothalamus à partir du jour 17. Les connections des neurones GnRH hypothalamiques à l'éminence médiane se développent au jour 19. La synthèse et la sécrétion de LH débutent aux jours 16-17 et celles de FSH, vers le jour 19. La GnRH régule déjà les gonadotrophines puisque le récepteur GnRH est détecté dans l'hypophyse au jour 13 (Huhtaniemi, 1995). L'ARN messager (ARNm) des récepteurs aux gonadotrophines a été documenté par hybridation de type Northern dans le testicule et l'ovaire à partir des jours 15 et 17, respectivement. La capacité de liaison de ces récepteurs a également été validée par stimulation à la LH-choriogonadotrophine humaine (LH-hCG, *Luteinizing hormone-human chorionic gonadotrophin*) d'une part, et par la mesure de la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) suite à une stimulation à la FSH d'autre part. Finalement, la présence d'un rétrocontrôle négatif hypophysaire-gonadique est détecté à partir du jour 19 de gestation chez le mâle alors que ce n'est qu'après la naissance chez la femelle (Huhtaniemi, 1995) (Tableau 1).

Jour	Hypothalamus	Hypophyse	Testicule	Ovaire
G12 à G14	GnRH dans le liquide amniotique Système porte hypophysaire	Récepteur GnRH	Testostérone, ARNm LHR	-
G15	GnRH dans le bulbe olfactif	-	ARNm FSHR, Liaison LHR	-
G16	-	Synthèse de LH	-	-
G17	Migration des neurones GnRH	-	Liaison FSHR	ARNm LHR
G19	Axones GnRH dans l'eminence médiane	Synthèse de FSH	Rétrocontrôle négatif hypophysaire- gonadique	-
G21	-	Synthèse de prolactine	-	ARNm FSHR
P3-P8	-	-	-	Liaison FSHR, Liaison LHR, Retrocontrôle négatif hypophysaire-gonadique

G : gestation, P : post-natal, GnRH : *Gonadotrophin releasing hormone*, LHR : récepteur à la LH, FSHR : récepteur à la FSH, ARNm : ARN messenger.

Tableau 1. Maturation développementale dans le temps des fonctions de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique chez le rat. (Réf. : (Huhtaniemi, 1995)).

Dans notre modèle animal, la diète faible en Na⁺ est donnée à la mère à partir du jour 15 de gestation. La durée du traitement couvre donc une période cruciale du développement de l'axe HHG chez le rat. Il en sera question lors de la discussion.

1.2.2.2 Fonction endocrine

L'adénohypophyse contient plusieurs types cellulaires. Les cellules lactotropes renferment la prolactine et sont acidophiles. L'hormone de croissance, la thyrostimuline (TSH) et la corticotropine sont respectivement produites par les cellules somatotropes, thyrotropes et corticotropes. Du côté de la neurohypophyse, les neurones paraventriculaires sécrètent l'ocytocine et les neurones supraoptiques produisent l'arginine-vasopressine (hormone antidiurétique, ADH). Ces deux peptides importants sont transportés jusqu'aux terminaisons axonales de la neurohypophyse et y sont stockés. Ce sont les cellules gonadotropes qui contiennent les granules de FSH et de LH, hormones capitales au sein du système reproducteur (Johnson MH & E.B., 2002d; Marieb EN, 1999b).

1.2.2.2.1 Hormones glycoprotéiques

Trois hormones peptidiques sont appelées gonadotrophines parce qu'elles stimulent les gonades : la FSH et la LH produites par l'hypophyse et la hCG sécrétée par le placenta. La TSH s'apparente aux gonadotrophines, mais n'agit qu'indirectement au niveau des gonades. Les gonadotrophines sont

des protéines globulaires formées de deux polypeptides glycosylés (alpha et bêta) liés de façon non covalente. La chaîne alpha est similaire pour la FSH, la LH, la hCG et la TSH. L'unité bêta, unique pour chacune des hormones, détermine leurs propriétés spécifiques. Des modifications de cette chaîne bêta latérale hydrocarbonée entraînent une diminution dramatique de leur activité biologique (Johnson MH & E.B., 2002e). La FSH et la LH ont un poids moléculaire d'une trentaine de kDa et l'hCG, de 43kDa. Leur sous-unité fonctionnelle β possède 145 (hCG), 115 (LH) et 118 (FSH) acides aminés (Campbell *et al.*, 1991).

1.2.2.2 L'hormone folliculostimulante et son récepteur

La FSH agit sur la gamétogenèse en se liant à son récepteur, le FSHr, qui se retrouve exclusivement à la surface des cellules de Sertoli du testicule et des cellules de la granulosa de l'ovaire (Johnson MH & E.B., 2002e; Gromoll & Simoni, 2005). Chez l'humain, le gène du FSHr se trouve sur le chromosome 2 (chromosome 6 chez le rat) et fait 54kb sur dix exons. Le FSHr comporte 678 acides aminés et forme un récepteur à sept passages transmembranaires couplé à une protéine G (GPCR, *G protein coupled receptor*) dont les principaux mécanismes de transduction impliquent des protéines kinases (PK), le plus souvent PKA, mais aussi PKB et PKC (Gromoll & Simoni, 2005).

1.2.2.3 L'hormone lutéinisante et son récepteur

La sous-unité β de la LH et de la hCG est très semblable, aussi agissent-elle via le même récepteur, le LH/CGr. Il se trouve à la membrane cellulaire, plus particulièrement dans les régions donnant sur les espaces capillaires, conférant une sorte de polarisation fonctionnelle à la cellule qui capte les hormones du sang. Dans l'ovaire, ce récepteur est présent sur les cellules de la thèque, de la granulosa, lutéales et glandulaires interstitielles alors qu'au niveau des testicules, il se retrouve sur les cellules de Leydig (Rajaniemi HJ *et al.*, 1992). La liaison de LH ou de hCG sur le LH/CGr, un GPCR, amène l'activation de l'adénylate cyclase, résultant en une augmentation d'AMPc intracellulaire et par le fait-même, en une augmentation de la biosynthèse de stéroïdes (Rajaniemi HJ *et al.*, 1992). Le gène du LH/CGr est d'environ 80kb et est localisé sur le bras court du chromosome 2 chez l'humain (chromosome 6 chez le rat). La protéine engendrée a un poids moléculaire apparent d'environ 90kDa, résultant de la maturation et du transport d'un précurseur glycoprotéique d'environ 70kDa (Ascoli *et al.*, 2002; Rajaniemi HJ *et al.*, 1992).

1.2.2.2.4 Régulation par les hormones ovariennes

Chez la femme ménopausée ou ayant subi une ovariectomie bilatérale, les concentrations de LH et de FSH sont fort augmentées. Cette hausse est attribuable en grande partie à l'absence d'E2 (Buckler, 2005) puisque l'administration d'E2, même en faible quantité, entraîne une diminution des taux sériques de gonadotrophines (Goldfien A, 2001). Détectable dans l'heure suivante, cet effet est très rapide et est maximal dans les 4 à 6 heures suivantes. On appelle rétroaction négative (ou *feedback*, *rétrocontrôle négatif*) ce contrôle de l'E2, son action réduisant les taux de LH et de FSH (Johnson MH & E.B., 2002d). Ce contrôle se situe au niveau hypothalamique et hypophysaire. Le siège hypothalamique a d'ailleurs été confirmé par la mesure de la GnRH dans le sang chez la brebis ovariectomisée et par l'administration directe d'E2 au niveau de l'hypothalamus (Young J *et al.*, 1999).

Si, au contraire, les concentrations d'E2 augmentent de façon importante et restent élevées pendant au moins 48 heures, on assistera à une stimulation de la sécrétion de gonadotrophines. C'est le cas à la fin de la phase folliculaire au moment où le pic de LH survient, caractéristique du début de la phase préovulatoire. Cette hausse de LH stimule à son tour une légère, mais suffisante augmentation de progestérone qui stimule davantage la sécrétion de LH. Couplée à l'E2, la progestérone initie le pic de FSH retrouvé au milieu du cycle (Goldfien A, 2001). On parle alors de rétroaction positive : les hauts taux prolongés d'E2 entraînent une stimulation de la relâche de gonadotrophines qui, par conséquent, accroissent les concentrations d'E2 (Johnson MH & E.B., 2002d).

La progestérone assume également deux fonctions au niveau de la régulation des gonadotrophines, qui aboutissent au même résultat. À de hautes concentrations, la progestérone (1) intensifie la rétroaction négative de l'E2 et (2) bloque le rétrocontrôle positif de l'E2 afin de maintenir les sécrétions gonadotropes très basses (Johnson MH & E.B., 2002a). Par ailleurs, il a été observé chez le rat qu'une injection de progestérone tardivement dans le cycle devance le pic de LH ovulatoire alors qu'une injection tôt dans le cycle inhibe l'élévation attendue du taux de LH (Zanisi & Messi, 1991).

Deux autres molécules, l'inhibine et l'activine, exercent une action endocrine sur la FSH. Des données expérimentales chez le rat (Rivier *et al.*, 1991) et le singe rhésus (Tilbrook & Clarke, 2001)

ont démontré que l'inhibine diminue la sécrétion de FSH. Elle intervient dans le mécanisme de rétroaction qui régule la sécrétion de FSH en abaissant les concentrations hypophysaires et plasmatiques de cette dernière. La régulation de la FSH est toutefois davantage liée à l'E2 qu'à l'inhibine (Young J *et al.*, 1999). Par ailleurs, les interactions paracrine au niveau hypophysaire chez le rat de la FSH et de l'inhibine pourraient contrôler la sécrétion de LH indépendamment de la GnRH. Ces propriétés ne sont toutefois pas encore bien caractérisées (Johnson MH & E.B., 2002d). De plus, il a été établi que l'activine, dont les actions ovariennes sont surtout paracrine et autocrine, provoque une forte stimulation de la relâche de FSH chez certaines espèces (Young J *et al.*, 1999; Johnson MH & E.B., 2002a). Des injections d'activine recombinante chez le rat raccourcissent le cycle oestral et amènent une hausse du nombre de follicules atreétiques et antraux et une ovulation prématurée (Erickson *et al.*, 1995).

En fait, les hormones ovariennes ont le pouvoir de réguler la sécrétion de LH et de FSH par deux mécanismes : (1) l'action de ces hormones sur les cellules gonadotropes hypophysaires diminue (rétroaction négative) ou augmente (rétroaction positive) leur sensibilité aux ondes de GnRH via une abondance de récepteurs à l'E2, à la progestérone et à l'inhibine et (2) les hormones ovariennes peuvent affecter le signal GnRH de façon directe en agissant sur les neurones qui le produisent ou indirecte en changeant l'activité d'autres systèmes neurologiques modulant la relâche de GnRH au niveau de l'éminence médiane. Tout comme l'hypophyse, l'hypothalamus contient plusieurs régions très riches en récepteurs aux estrogènes et aux progestagènes. Cependant, l'inhibine ne semble pas avoir de site d'action hypothalamique (Johnson MH & E.B., 2002d).

Les profils de relâche pulsatile de la LH et de la FSH varient au cours du cycle menstruel. Pendant la phase folliculaire, la sécrétion de LH suit une série de pulses à haute fréquence, mais de faible amplitude, survenant environ aux heures. La phase lutéale est quant à elle caractérisée par des ondes irrégulières, de basse fréquence et de haute amplitude, séparées par des intervalles très longs allant jusqu'à 6 heures. Les fluctuations remarquées dans la relâche des gonadotrophines reflètent les événements de sécrétion de la GnRH (Johnson MH & E.B., 2002a). Il existe une parfaite concordance entre les sécrétions pulsatiles de LH dosées dans la veine jugulaire et celles de GnRH mesurées dans le système porte hypothalamo-hypophysaire (Young J *et al.*, 1999). Les patrons de sécrétions gonadotropes durant le cycle chez le rat sont similaires.

1.2.2.2.5 Régulation par les hormones testiculaires

Les mécanismes neuroendocriniens gouvernant la fonction testiculaire sont sensiblement les mêmes que pour l'ovaire. Ainsi, la sécrétion gonadotrope est soumise au contrôle rétroactif du testicule via des produits hormonaux différemment impliqués dans la régulation de la LH et de la FSH. La différence majeure entre l'homme et la femme au niveau du contrôle de l'activité gonadique est qu'à partir de la puberté, la production de gamètes et les sécrétions endocrines apparentées se font de façon continue, et non cyclique (Johnson MH & E.B., 2002d).

La rétroaction négative de la sécrétion de LH chez le bélier et le singe rhésus est contrôlée directement par la testostérone ou indirectement par des produits de sa conversion comme la dihydrotestostérone (DHT) ou l'E2 via l'inhibition des neurones GnRH ; cela demeure toutefois encore obscur (Tilbrook & Clarke, 2001). Cette rétroaction s'effectue en grande partie par une décroissance de la fréquence des pics épisodiques de LH modulée dans l'hypothalamus. Elle peut également inhiber la FSH en moindre proportion. L'inhibine joue un rôle capital dans le rétrocontrôle négatif de la FSH. En effet, l'injection d'une dose d'inhibine humaine recombinante à des béliers castrés (dose dont la concentration est équivalente au taux plasmatique d'inhibine des béliers intacts) diminue leur FSH plasmatique à des niveaux comparables aux animaux témoins (Tilbrook *et al.*, 1993; Tilbrook & Clarke, 2001). Chez les rongeurs, la DHT exerce un effet sur la sécrétion de LH lorsqu'elle est administrée par voie systémique ou implantée directement dans l'hypothalamus (Johnson MH & E.B., 2002d).

1.2.3 DÉVELOPPEMENT DES GONADES ET EMBRYOLOGIE

1.2.3.1 Différenciation sexuelle

La genèse des deux sexes chez le mammifère repose sur une base génétique. Le sexe féminin forme le sexe homogamétique parce que leurs chromosomes sexuels sont deux X. Ainsi, tous les ovules sont semblables, chacun possédant un X. On appelle hétérogamétique le sexe mâle puisque sa paire de chromosomes sexuels consiste en un X et un Y, ce qui génère deux groupes de spermatozoïdes différents (Johnson MH & E.B., 2002f).

Malgré les différences des chromosomes des deux sexes, le développement précoce des gonades est le même chez le mâle et la femelle. Leur précurseur commun est formé de deux tissus distincts : le mésenchyme somatique et les cellules germinales primordiales (CGP). Le premier forme la matrice de la gonade alors que les CGP migrent dans cette matrice pour la coloniser et former les gamètes. Lorsque les CGP finissent leur migration, elles stimulent la prolifération de l'épithélium coelomique et du rein primitif (mésonephros) afin de constituer les cordons sexuels primitifs. Ceux-ci sont responsables du développement des crêtes génitales primaires chez l'embryon humain autour de la 4^e semaine. Ils vont également envahir les CGP pour donner naissance aux tissus qui assurent le bon développement des cellules sexuelles. Les crêtes génitales sont des renflements mésenchymateux recouverts d'un épithélium coelomique monostratifié et se situent en position dorsale par rapport à l'ébauche du mésonephros : ce sont les gonades primordiales (Johnson MH & E.B., 2002f; Larsen W., 2003)

Les CGP de tous les mammifères, quant à elles, viennent de l'ectoderme primaire de l'embryon. Chez l'humain, elles naissent donc en dehors de la région de la crête génitale. On peut les reconnaître vers la 3^e semaine. Pendant la migration, on les voit grâce à leur cytoplasme pâle et à leur forme ovoïde. Lorsque la migration des CGP est achevée, vers 6 semaines, la détermination du sexe par le chromosome Y (gène SRY, *sex determining region Y gene*) devient visible dans l'embryon. À ce moment et uniquement chez le mâle, les cordons sexuels primitifs prolifèrent vers la région médullaire de la gonade et établissent un contact avec les cordons médullaires de tissu mésonephritique pour ainsi former les cordons testiculaires définitifs (fig. 3). Ces cordons contiendront la majorité des CGP et sont délimités par la formation d'une membrane basale externe. Ils deviendront les cordons séminifères puis, à l'âge adulte, les tubules séminifères. Les deux populations cellulaires des cordons séminifères sont les CGP qui se transforment en spermatozoïdes et les cellules mésodermiques qui deviennent les cellules de Sertoli. Entre les cordons, certaines cellules du mésenchyme lâche se condensent en amas d'unités endocriniennes : ce sont les cellules de Leydig (ou cellules/glandes interstitielles) (Johnson MH & E.B., 2002f; Larsen W., 2003).

Tandis que la gonade mâle subit les transformations induites par SRY, bien peu de changements morphologiques se produisent chez la femelle puisqu'elle n'exprime pas ce gène. Contrairement à ce qui se passe dans le testicule primitif, la croissance des cellules épithéliales coelomiques et mésonephritiques se termine par leur condensation dans la région corticale de la gonade femelle. Autour du 3^e mois, de petites concentrations cellulaires entourent les CGP devenues ovogonies pour

donner naissance aux follicules primordiaux. Les cellules mésenchymateuses de ces follicules forment les cellules de la *granulosa*, alors que les ovogonies deviennent les ovocytes (Johnson MH & E.B., 2002f). Chez la femelle souris, ces changements s'opèrent tout près du moment de la naissance (Ross & Capel, 2005).

Contrairement à l'ovaire, le testicule fœtal est essentiel à la différenciation sexuelle par la sécrétion de deux hormones : les androgènes et l'hormone antimüllérienne (AMH). L'absence de ces hormones mènera l'embryon vers le sexe féminin. L'évolution d'un individu dans le sens féminin est donc plutôt passive (Johnson MH & E.B., 2002f).

Chez le mâle, les canaux de Wolff ou mésonéphriques représentent l'ébauche des organes génitaux. Chez la femelle, les canaux de Müller (fig. 3) ou paramésonéphriques jouent ce rôle. Lorsque l'embryon est de sexe féminin, les canaux de Wolff régressent (fig. 4) et les canaux de Müller croissent pour former les trompes utérines, l'utérus et la partie supérieure du vagin. Chez le mâle, la sécrétion des androgènes et de l'AMH empêche le développement spontané du système reproducteur femelle. En effet, les androgènes sécrétés en grande quantité par le testicule primitif permettent le maintien des canaux de Wolff ; ceux-ci deviendront les épидидymes, les canaux déférents et les vésicules séminales. Les androgènes n'ont pas d'effet sur les canaux de Müller ; c'est la présence de l'AMH qui les fait régresser (Johnson MH & E.B., 2002f; Larsen W., 2003).

Chez le rat, le processus de développement du fœtus est assez semblable. Le mésoderme intermédiaire, précurseur de tout le système uro-génital, se forme autour du jour 8 de la gestation. De façon générale, le développement embryologique du mésonéphros se produit entre les jours 12 et 17 (Moritz & Wintour, 1999). Les CGP sont identifiables autour du jour 9-10, commencent leur migration au jour 11 et sont arrivées dans la gonade indifférenciée autour du jour 12-13. Les premiers tubules mésonéphrotiques et les crêtes génitales apparaissent vers les jours 11-12. Vers le jour 13-14, les gonades commencent leur différenciation sexuelle et elles sont identifiables en tant qu'ovaires et testicules au jour 15. La descente testiculaire s'amorce autour 16^e jour et se termine après la naissance (Beaudoin AR, 1980).

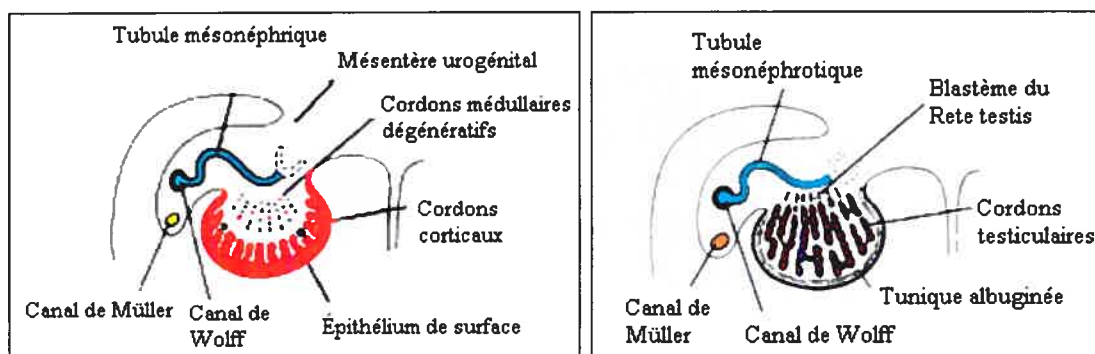


Figure 3. Développement gonadique à la 8^e semaine de grossesse.
À gauche : femelle, à droite : mâle. (Adapté de (Johnson MH & E.B., 2002f))

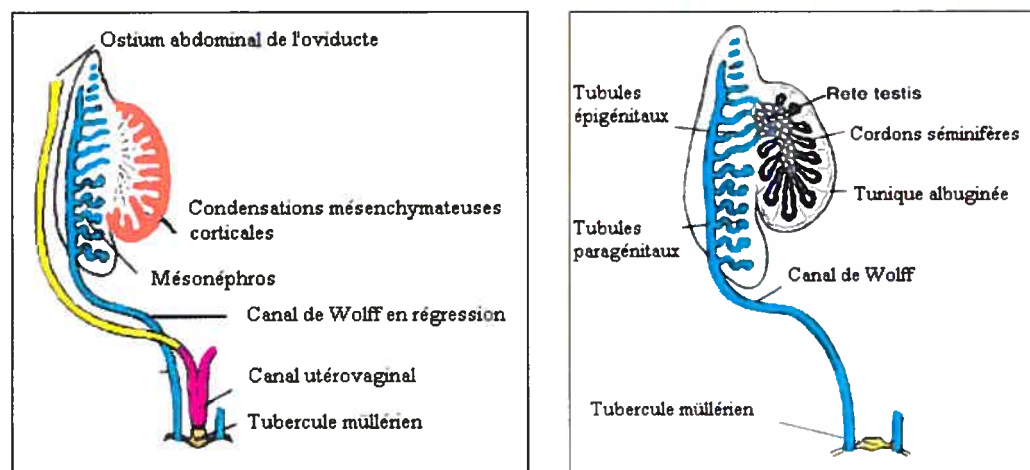


Figure 4. Différenciation des organes génitaux internes féminins et masculins au 4^e mois de grossesse. (Adapté de (Johnson MH & E.B., 2002f))

1.2.3.2 Croissance pré- et postnatale des gonades

Chez l'homme comme chez le rat, le développement des caractéristiques phénotypiques chez les deux sexes se continue de la même façon jusqu'à la puberté, c'est-à-dire de façon active par la sécrétion d'hormones chez les mâles et par l'absence de ce phénomène chez la femelle. Toutefois, cela s'effectue de façon très lente : les organes sexuels restent immatures et ne grandissent qu'en proportion de la croissance corporelle générale (Johnson MH & E.B., 2002f).

Au cours de la vie fœtale, environ deux mois avant la naissance, les gonades migrent vers le bas au niveau de la dixième vertèbre thoracique. Les nerfs et vaisseaux sanguins les desservant sont entraînés avec eux dans la descente. C'est le gubernaculum, un cordon ligamenteux, qui est responsable de cette progression vers le bas pour les deux sexes. Les ovaires migrent seulement

jusqu'au niveau du détroit supérieur où leur migration est arrêtée par le ligament large. Chez le mâle, ce phénomène est beaucoup plus marqué puisqu'à l'âge adulte, les testicules se trouvent dans le scrotum, sous la ceinture pelvienne. Une chose qui prouve bien ce phénomène est que l'innervation et la vascularisation des testicules sont d'origine lombaire. Chez certaines espèces, les testicules restent dans la région lombaire ou migrent autre part dans l'abdomen. Les testicules du rat descendent aussi vers le canal inguinal, mais après la naissance, vers 3-4 semaines. Le canal inguinal reste ouvert durant toute la vie (Kohn DF, 1984), c'est pourquoi leurs testicules sont rétractiles et restent donc mobiles dans le canal (Johnson MH & E.B., 2002f; Larsen W., 2003; Marieb EN, 1999a). Cette descente trans-abdominale ne dépend toutefois pas des androgènes. L'AMH y jouerait un rôle en agissant sur le *gubernaculum testis* en l'empêchant de s'allonger comme cela se produit chez la femelle. Ainsi, la position relative du testicule devient de plus en plus caudale. On nomme cryptorchidie la descente incomplète du testicule qui est souvent causé par des résidus mullériens. La fonction endocrine d'un adulte dont les testicules n'ont pas complètement migré vers le bas n'est pas affectée. Toutefois, sa spermatogenèse est bloquée et son métabolisme, perturbé. Le risque de développement de tumeur testiculaire devient accru, tout comme lors d'un réchauffement prolongé des testicules. Ces derniers doivent être de 3 à 6°C sous la température corporelle puisqu'ils ne produisent pas de spermatozoïdes viables au-delà de 36°C. La température du testicule est plus basse grâce à la présence de nombreuses glandes sudoripares ainsi qu'à l'appareil vasculaire du scrotum lui-même. Le fait que le testicule ne fonctionne bien qu'à une température inférieure pourrait n'être qu'une conséquence secondaire à sa localisation, plutôt que la cause évolutive première de sa migration. La raison de cette progression des gonades dans l'abdomen chez plusieurs espèces dont l'humain reste plutôt inexplicée puisque certains animaux possédant des testicules internes prospèrent et se reproduisent tout aussi bien (Johnson MH & E.B., 2002f; Marieb EN, 1999a). Les cellules de Leydig de l'embryon sécrètent de la testostérone à partir de la 8-10^e semaine de vie à des taux sériques atteignant un maximum de 2ng/ml autour de la 13-15^e semaine. Cette hormone stimule le maintien du conduit mésonéphrotique. Le taux diminue ensuite jusqu'à environ 0,8ng/ml vers 5 à 6 mois. Chez le rat par contre, ce pic transitoire de testostérone ne se produit qu'à la mise bas et chute après la naissance (Johnson MH & E.B., 2002f; Larsen W., 2003). L'acquisition définitive du phénotype et du comportement mâle ne se fait qu'à la puberté et c'est pour cette raison que la production d'androgènes (environ 9ng/ml chez l'homme) ne reprend qu'à cette période de la vie. Les cellules de Sertoli sécrètent continuellement de l'AMH pendant toute la vie intrautérine et ce n'est qu'à l'âge pubère que les taux décroissent. C'est aussi essentiellement

pendant cette période que se fait la croissance du testicule ainsi que le début de la production de spermatozoïdes ; la maturité sexuelle et la fertilité seront alors atteintes (Johnson MH & E.B., 2002f).

Tel que mentionné plus haut, les ovaires ne se déplacent que légèrement pour occuper leur position pelvienne et ce, pour la plupart des espèces. Comme le testicule, sa croissance ne se fait que très lentement avant la puberté. Par contre, les cellules germinales femelles subissent un changement majeur : toutes les ovogonies cessent de se diviser avant la naissance (après la naissance chez la rate) pour entamer la première division méiotique et évoluer en ovocytes primaires. La femme dispose de tous ses ovules dès sa venue au monde ; c'est la principale conséquence de cet arrêt précoce de la mitose. Qui plus est, ces ovocytes ne seront jamais remplacés au cours de la vie (Johnson MH & E.B., 2002f). Les cellules germinales femelles entrées en méiose forment les follicules primordiaux par la condensation de cellules mésenchymateuses ovariennes provenant des cordons mésonéphrotiques. Au même moment, les ovocytes se bloquent au stade diplotène de la première prophase méiotique, leurs chromosomes demeurant ainsi dans le noyau nommé vésicule germinale. Le follicule primordial peut rester dans cet état pendant des dizaines d'années en attente d'une activation et cela permet le stockage d'ovocytes en prophase prolongée. Les raisons de ce phénomène demeurent toutefois inconnues. Le recrutement de ceux-ci à l'état de follicule primordial ne surviendra qu'à la puberté, moment auquel les ovocytes reprennent individuellement la gamétogenèse chaque mois en réponse aux gonadotrophines. Contrairement au testicule, l'ovaire n'est pas indispensable au développement sexuel pré-pubertaire ; la production de stéroïdes par l'ovaire étant minime pendant cette période (Johnson MH & E.B., 2002f; Larsen W., 2003).

Chez le rat, le système génito-urinaire en général est similaire à celui de l'humain et des autres mammifères. Certains aspects sont toutefois plus uniques au rat : le mâle possède une large vésicule séminale, une glande bulbo-urétrale et une prostate particulièrement développées alors que la femelle a un utérus à deux cornes et la lumière de ces cornes est complètement séparée par les deux cols utérins (Kohn DF, 1984).

1.2.4 OVAIRES

1.2.4.1 Anatomie et structure de l'ovaire

Les ovaires sont placés dans le corps verticalement selon leur grand axe, juste sous les trompes de Fallope. Ils sont attachés par les ligaments ovariens à deux endroits : sur le myomètre utérin et près des franges de la trompe (figure 5) (Marieb EN, 1999c; Tortora GJ & G.S., 2001b). L'ovaire est constitué de ces différentes structures (figure 5) (Tortora GJ & G.S., 2001b) :

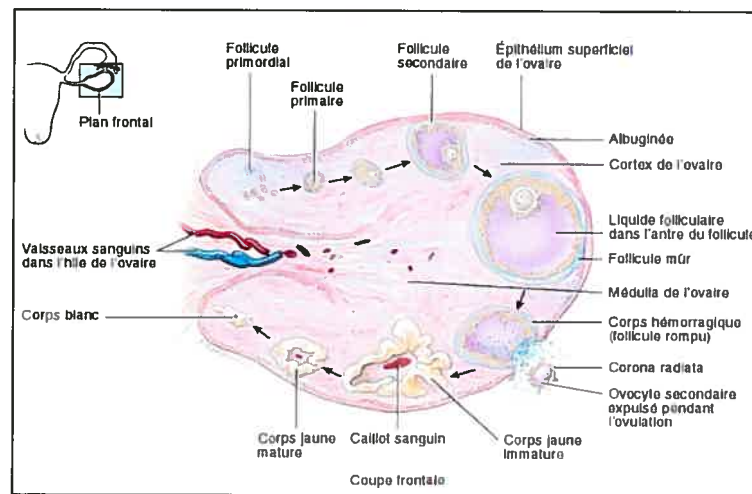


Figure 5. Histologie de l'ovaire.
(Tortora GJ. 2001)

- L'épithélium superficiel de l'ovaire est une couche de cellules épithéliales simples recouvrant l'ovaire.
- L'albuginée est une capsule blanchâtre de tissu conjonctif dense et irrégulier située juste au dessous de l'épithélium superficiel.
- Le cortex de l'ovaire est fait de tissu conjonctif dense et renferme les follicules. Il est un peu plus épais que l'albuginée.
- La médullaire ovarienne est profonde ; elle est composée de tissu conjonctif lâche et contient les nerfs et les vaisseaux sanguins et lymphatiques.
- Les follicules ovariens sont enfouis dans la partie corticale et se composent d'ovocytes en voie de développement entourés de cellules. Lorsque ces dernières ne forment qu'une couche, elles sont appelées cellules folliculaires. Lorsque les couches se multiplient au cours du développement, elles deviennent les cellules granuleuses (ou cellules de la granulosa). Cette enveloppe nourrit l'ovocyte mature et sécrète des estrogènes au cours du mûrissement du follicule.

- Le follicule de De Graaf est un gros follicule mûr rempli de liquide. L'ovulation survient lorsqu'il se rompt et que se produit l'expulsion d'un ovocyte secondaire.
- Le corps jaune (*corpus luteum*) contient les restes du follicule de De Graaf après l'ovulation. Il produit différentes hormones telles la progestérone, l'inhibine, la relaxine et l'E2, puis il dégénère en un tissu fibreux appelé corps blanc (*corpus albican*) (Johnson MH & E.B., 2002a; Tortora GJ & G.S., 2001b).

1.2.4.1.1 Récepteur aux estrogènes

Le récepteur aux estrogènes (ER, *estrogen receptor*) fait partie de la grande famille des récepteurs nucléaires et des modulateurs transcriptionnels. Deux molécules ER ont été identifiées, soit les formes alpha et bêta. ER α est trouvé dans tous les tissus du système reproducteur. ER β est le produit d'un gène différent et comporte quelques similarités avec son homologue. Tous deux lient l'E2 et interagissent avec l'élément de réponse aux estrogènes de l'ADN (Hewitt & Korach, 2003). ER β est exprimé de façon prédominante dans l'ovaire et la prostate alors que les plus hauts niveaux d'expression pour ER α sont observés dans l'épididyme, le testicule, l'ovaire et l'utérus (Drummond & Findlay, 1999). Localisé sur le chromosome 6 chez l'humain (chromosome 1 chez le rat), le gène de ER α a environ 300kb de longueur et code pour un récepteur de 66-68kDa. La protéine ER β , quant à elle, a un poids d'environ 56kDa. Deux formes ont été identifiées ; une forme tronquée de 485 acides aminés et une autre de 530 résidus. Son gène a une longueur d'environ 40kb et est situé sur le chromosome 14 chez l'humain (chromosome 6 chez le rat) (Gennari *et al.*, 2005; Pinzone *et al.*, 2004; Vaillant *et al.*, 2002; Warner *et al.*, 1999).

Par ailleurs, on a rapporté la présence d'un nouveau récepteur situé dans la membrane plasmique, ER-X (Jacob *et al.*, 2006). Ce dernier est fonctionnellement distinct d'ER α et d'ER β , mais tout comme l'isoforme alpha, il est réexprimé dans le cerveau adulte après un épisode d'ischémie-reperfusion. À des concentrations physiologiques, le 17 β -E2 entraîne des modulations de sécrétion d'insuline et de glucagon par des changements dans les fréquences d'oscillation de calcium intracellulaire induites par le glucose. Ceci est un bon exemple d'actions non-génomiques de ces récepteurs ER-X non classiques. De plus, ces effets ne sont pas bloqués par des composés tels que l'anti-estrogène ICI 162,780 (Jacob *et al.*, 2006).

1.2.4.2 Ovogenèse et développement folliculaire

Au début du développement fœtal, les CGP migrent jusqu'aux ovaires où elles se différencient en ovogonies, cellules diploïdes ($2n$) qui se divisent par mitose afin de produire des millions de cellules germinales. La majorité de ces cellules meurent par atrophie avant même la naissance. Celles qui parviennent à croître, les ovocytes primaires, entreront en méiose en période fœtale, mais ne termineront cette phase qu'à la puberté. Au moment de la naissance, chaque ovaire contient des centaines de milliers d'ovogonies et d'ovocytes primaires. À la puberté, on en compte plus que 40000, mais seulement 400 d'entre eux deviennent matures et arriveront à l'ovulation durant la période de procréation de la femme. Tous les autres meurent par atrophie (Tortora GJ & G.S., 2001b). L'ensemble formé par l'ovocyte primaire entouré d'une couche de cellules folliculaires est nommé follicule primordial ($<25\mu\text{m}$) (figure 5). Ces cellules cuboïdes deviendront les cellules granuleuses lorsqu'elles s'étaleront sur 6-7 couches autour de l'ovocyte. Lorsque le follicule primaire croît, il devient follicule primaire ou préantral ($80-100\mu\text{m}$), puis follicule secondaire ou antral ou de De Graaf. Il aboutira ensuite comme follicule préovulatoire. Juste avant l'ovulation, le follicule atteindra la taille d'environ 2cm . À mesure que l'ovocyte croît, une couche claire de glycoprotéines se forme entre l'ovocyte primaire et les cellules granuleuses, c'est la zone pellucide. La couche la plus externe de cellules granuleuses repose sur une lame basale qui les sépare du stroma ; cette région externe est la thèque folliculaire. Celle-ci se sépare en deux couches tandis que le follicule poursuit sa croissance. La thèque interne se compose de cellules sécrétrices de liquide folliculaire et la thèque externe est constituée de tissu conjonctif (Goldfien A, 2001; Tortora GJ & G.S., 2001b).

Après la puberté, les gonadotrophines sécrétées par l'hypophyse stimulent mensuellement le cycle de l'ovogenèse. La méiose I reprend dans plusieurs follicules secondaires, mais un seul deviendra mature pour l'ovulation (fig. 6). L'ovocyte primaire diploïde termine sa méiose I et deux cellules $1n$ sont produites : le globule polaire primaire et l'ovocyte secondaire. Le premier constitue en quelque sorte un déchet de matière nucléaire alors que l'ovocyte entreprendra la méiose II. Ensuite le follicule mûr se rompt et l'ovulation se produit (figure 5). En bref, le développement folliculaire suit de façon logique le cycle de la reproduction chez la femme, lui-même régi par des hormones hypothalamiques et hypophysaires (Tortora GJ & G.S., 2001b).

L'E2 a un rôle connu dans la prolifération des follicules. L'administration d'E2 à des rates hypophysectomisées stimule la prolifération des cellules de la granulosa dans les follicules

préantraux. Par ailleurs, les souris nulles pour le récepteur ER α sont acycliques et infertiles. Leur folliculogénèse stagne au stade antral; leurs follicules deviennent kystiques et hémorragiques (Drummond, 2006).

Par ailleurs, les jonctions cellulaires forment un aspect important lorsque l'on parle du développement gonadique. Elles sont définies comme des agrégats de canaux intercellulaires et sont présentes dans plusieurs organes comme le cœur, le testicule et l'ovaire. Ces canaux contiennent des protéines nommées connexines. La connexine 43 (Cx43), notamment, a été associée avec la fonction ovarienne et la régulation de l'activation de la folliculogénèse (Melton *et al.*, 2001; Juneja *et al.*, 1999).

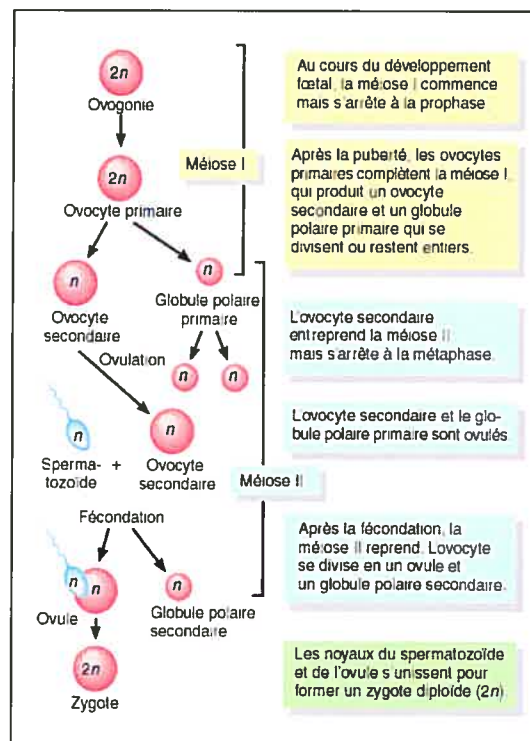


Figure 6. Ovogenèse.
(Tortora GJ. 2001)

1.2.4.3 Stéroïdogénèse ovarienne

La production de stéroïdes et la croissance du follicule sont étroitement liées. À mesure qu'ils croissent sous l'action de LH et de FSH, les follicules produisent et libèrent des quantités croissantes de stéroïdes, principalement 17 β -E2 et estrone. Les follicules en phase antrale sont également responsables d'environ 30 à 70 % de la sécrétion des androgènes circulants, dont la testostérone et l'androstènedione retrouvés chez la femme. La balance des androgènes féminins est produite par les surrénales. Ces différents stéroïdes sexuels sont produits dans des compartiments folliculaires spécifiques. *In vitro*, les cellules de la thèque ne produisent que très peu d'œstrogènes, mais peuvent produire des androgènes à partir de cholestérol. Cette dernière conversion peut être hautement stimulée par la LH. Les cellules de la granulosa font à peu près le contraire, c'est-à-dire qu'elles sont incapables de synthétiser des androgènes. Si on leur fournit des androgènes exogènes, elles peuvent toutefois, sous l'action de la FSH, les aromatiser en estrogènes grâce à l'enzyme aromatase (Goldfien A, 2001; Johnson MH & E.B., 2002a). À la figure 7 se trouve un schéma détaillé de la formation des stéroïdes à partir du cholestérol dans les compartiments ovariens. Le précurseur de

tout stéroïde est le cholestérol. Cette molécule est acquise via les lipoprotéines de faible densité (LDL, *Low density lipoprotein*) de la circulation ou synthétisée *de novo* à partir de l'acétate. Le cholestérol doit être mobilisé jusqu'à la membrane externe mitochondriale et ensuite transféré de la membrane externe à la membrane interne de la mitochondrie. L'espace aqueux entre les deux membranes constitue une barrière pour le cholestérol qui est une molécule hydrophobe; c'est pourquoi des protéines de transport telles que la StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory protein*) et le SAP (*Steroidogenesis Activator Peptide*) s'avèrent essentielles (Albrecht ED & Pepe GJ, 1998). Le cholestérol est métabolisé via plusieurs enzymes pour former les minéralocorticoïdes, les glucocorticoïdes et les hormones sexuelles. La majorité de ces enzymes appartiennent à la famille des cytochromes P450 oxydases.

La première étape de la stéroïdogénèse est le clivage du cholestérol par l'enzyme P450_{sc} (cytochrome P450 *side chain cleavage*) pour former la pregnénolone. Cette enzyme ne peut fonctionner que dans

l'environnement mitochondrial et opère la scission de la chaîne latérale du cholestérol entre les carbones 20 (C20) et 22 en impliquant l'hydroxylation du cholestérol aux positions 20 α et 22. À l'intérieur de la mitochondrie, les électrons sont transférés du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) à la P450_{sc} par une flavoprotéine, l'adrenodoxine-ferrédoxine réductase et par une protéine fer-soufre, l'adrenodoxine-ferrédoxine. La P450_{sc} joue alors un rôle terminal d'oxydase (Albrecht ED & Pepe GJ, 1998). La Δ^5 -3 β -hydroxystéroïde déhydrogénase

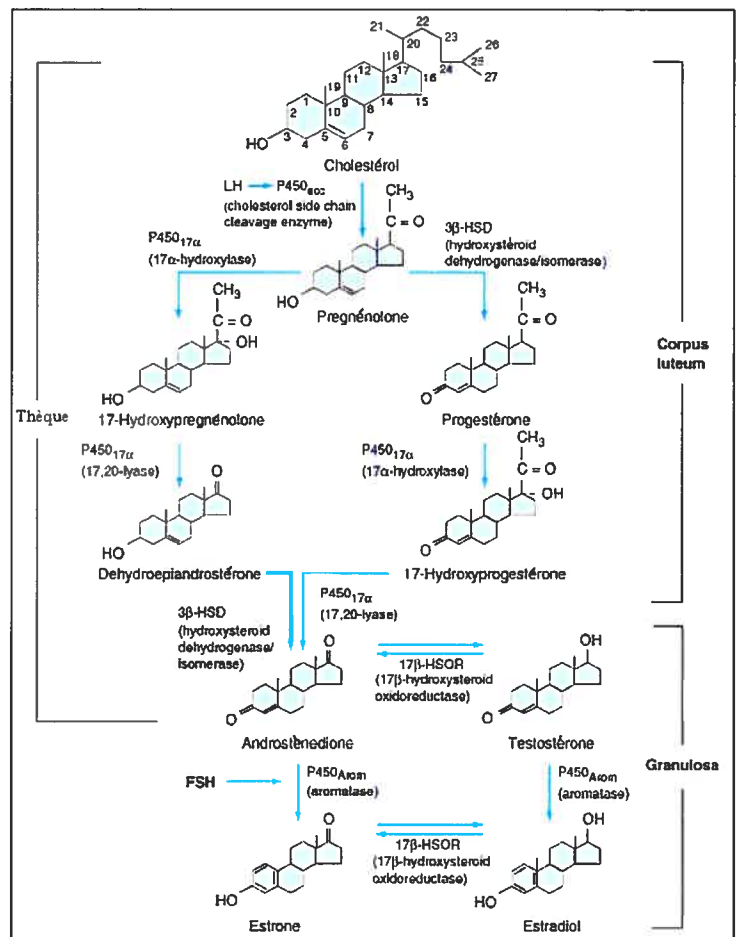


Figure 7. Stéroïdogénèse ovarienne.

(Adapté de (Fondation Genevoise pour la Formation et la Recherche Médicales, 2003))

(HSD)/ Δ^5 -4 isomérase convertit la pregnénolone en progestérone. Cette enzyme catalyse la déhydrogénation du C3 et l'isomérisation de la liaison double du cycle B au cycle A de la molécule. La conversion de la progestérone en 17-hydroxyprogestérone se fait par la l'enzyme P450c17 (17 α -hydroxylase/17-20 lyase) via la 17 α -hydroxylation. La scission des C17 et C20 pour former l'androstènedione est assurée par la fonction lyase de la même enzyme. L'aromatation des stéroïdes C₁₉ (androstènedione et testostérone) se fait par la P450 aromatase (P450arom). Elle catalyse la double hydroxylation du groupe méthyle en C19 et l'hydroxylation du C2 résultant en la suppression du C19 et la finition du cycle aromatique A. Dans ce processus, trois paires d'électrons sont transférées de trois molécules de NADPH jusqu'à la P450arom par la P450 réductase. Enfin, une 17 β -HSD est médiatrice de l'hydroxylation/oxydation du C17 résultant en l'interconversion de l'androstènedione et de la testostérone ainsi que de l'estrone et l'E2 (fig 7). Quatre isoformes de la 17 β -HSD existent et utilisent les cofacteurs de NAD(H) ou NADP(H) (Albrecht ED & Pepe GJ, 1998).

Chez le rat, la P450c17 est inexistante dans les cellules de la granulosa. Ainsi, les androgènes et les estrogènes ne peuvent pas être synthétisés directement de précurseurs à 21 carbones comme la progestérone ou la pregnénolone. La production d'E2 par la granulosa est dépendante de la disponibilité de précurseurs à 19 carbones comme la testostérone et l'androstènedione qui seront aromatisés par la P450arom (Goldfien A, 2001).

1.2.4.4 Cycle de la reproduction chez la femme

Le cycle ovarien possède deux grandes phases : la période précédant l'ovulation est la phase folliculaire à dominance oestrogénique et la phase post-ovulatoire, aussi qualifiée de lutéale, est gouvernée par le *corpus luteum* qui sécrète la progestérone. Le cycle ovarien représente donc la série d'événements qui se déroulent dans les ovaires pendant et suite à la maturation d'un ovocyte. Le cycle menstruel, lui, est la série de changements se déroulant parallèlement dans l'endomètre utérin en vue de l'accueil d'un ovule fécondé. Si la fécondation n'a pas lieu, la couche fonctionnelle de l'utérus se desquame et les menstruations ont lieu. Le cycle débute avec la menstruation et cette période dure environ cinq jours (Tortora GJ & G.S., 2001b). La figure 8 ci-dessous résume bien la régulation hormonale du cycle menstruel. Les cycles ovarien et menstruel sont régulés par l'hormone hypothalamique GnRH qui stimule la libération de LH et de FSH. De plus, tel que décrit préalablement, l'inhibine y joue un rôle important (Tortora GJ & G.S., 2001b).

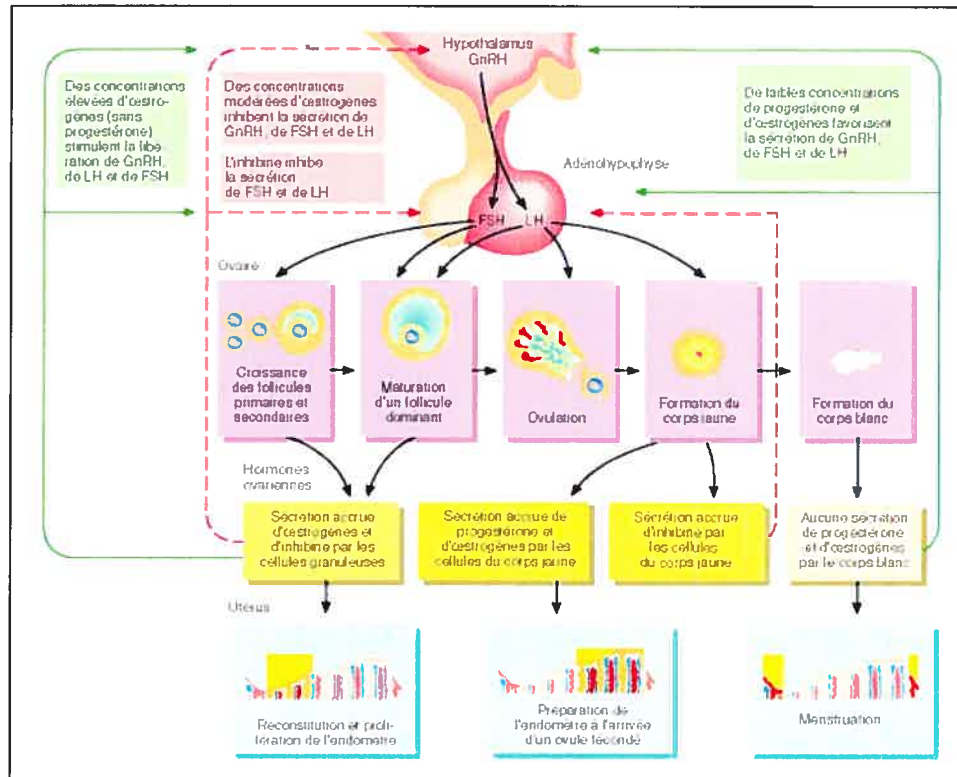


Figure 8. Résumé des interactions hormonales dans les cycles menstruel et ovarien. (Tortora GJ, 2001)

1.2.4.5 Cycle de la reproduction chez la rate

Les mammifères vertébrés non primates ont un cycle de reproduction appelé *cycle oestral*. Tout comme le cycle menstruel chez l'humain, il implique une panoplie de changements physiologiques sur une période de temps définie. Le rat est qualifié de *polyestrous mammal*, c'est-à-dire que l'estrus se produit plusieurs fois par an chez ce mammifère contrairement aux loups, aux chiens et aux ours par exemple qui n'ont qu'une ovulation annuelle. D'autres mammifères ont une ovulation de type saisonnière, tel que les chevaux, les ovins et les chèvres (Hill M., 2005).

Ainsi, le cycle de la rate dure de 4 à 5 jours, similairement à celui de la souris, et sa gestation est de l'ordre de trois semaines. La phase folliculaire du cycle s'étend sur deux jours alors que la phase lutéale dure de deux à trois jours. Le cycle des rongeurs présente toutefois une particularité spéciale : la durée du cycle change selon que la femelle s'accouple ou non. Si aucun rapprochement sexuel n'a lieu, la phase lutéale durera normalement 2-3 jours. En fait, le corps jaune sécrète de la progestérone pour environ 2 jours, mais il ne devient pas complètement fonctionnel. Par ailleurs, si la femelle subit un coït infertile au moment de l'ovulation, sa phase lutéale sera de 11-12 jours. En fait,

le stimulus créé lors de la sollicitation mécanique du col utérin est relayé vers le système nerveux central de façon à activer la production de PRL hypophysaire, hormone importante pour le maintien du corps jaune et de la grossesse elle-même. C'est en quelque sorte la création d'une pseudo-gestation. Ce cycle atypique permet d'assurer un grand nombre d'opportunités d'accouplement, sans quoi les espèces ne seraient fertiles que tous les 13-14 jours au lieu de l'être tous les 4-5 jours (Hill M., 2005; Johnson MH & E.B., 2002a).

Si la rate est gestante, comme chez l'humain, il y a production de relaxine par le corps jaune et éventuellement, par le placenta. Chez l'humain, ce facteur détend l'utérus pour faciliter l'implantation de l'ovocyte fécondé. À la fin de la grossesse, cette hormone joue également un rôle important dans l'assouplissement de la symphyse pubienne et rend plus facile le passage du poupon en assurant la dilatation du col de l'utérus pendant l'accouchement (Tortora GJ & G.S., 2001b). La relaxine, comme les estrogènes et la progestérone, diminue en période de ménopause (Ivell, 2002). Chez la rate, elle inhibe en plus les contractions utérines spontanées et induites par l'ocytocine. Il y a environ cent fois moins de relaxine chez l'humain que chez le rat et le porc (Ivell, 2002).

Le cycle de la rate a quatre phases principales : *metestrus*, *diestrus*, *proestrus* et *estrus*. L'estrus correspond à l'ovulation et dure environ 25 heures. La durée du metestrus (première phase du cycle) est de 6-8 heures, celle du diestrus est d'un peu plus de deux jours et le proestrus dure de 12-14 heures. Pendant le cycle oestral, trois ou plusieurs générations de corps jaunes peuvent être présentes dans l'ovaire. En diestrus, les corps jaunes nouvellement formés atteignent la taille maximale et sont maintenus jusqu'au metestrus du cycle suivant. Ces corps jaunes régressent rapidement pendant le diestrus suivant et cela est accompagné d'apoptose, d'un affaiblissement de l'apport sanguin, d'une infiltration leucocytaire et d'une activité augmentée de l'enzyme 20 α -HSD. Cette enzyme métabolise la progestérone dans le corps jaune en métabolite inactif, la 20 α -hydroxyprogestérone, qui ne peut maintenir ni l'épaississement de la décidue utérine ni la grossesse. La sécrétion de ce métabolite cesse peu à peu en diestrus. Ainsi une nouvelle ovulation pourra prendre place. Le cycle oestral peut parfois s'interrompre (quiescence). Dans ce cas, la rate est en période d'anestrus (Bazer FW *et al.*, 1998). On peut facilement reconnaître la phase du cycle et en déterminer la durée en observant la morphologie des cellules des sécrétions vaginales fixées et colorées (figure 9).

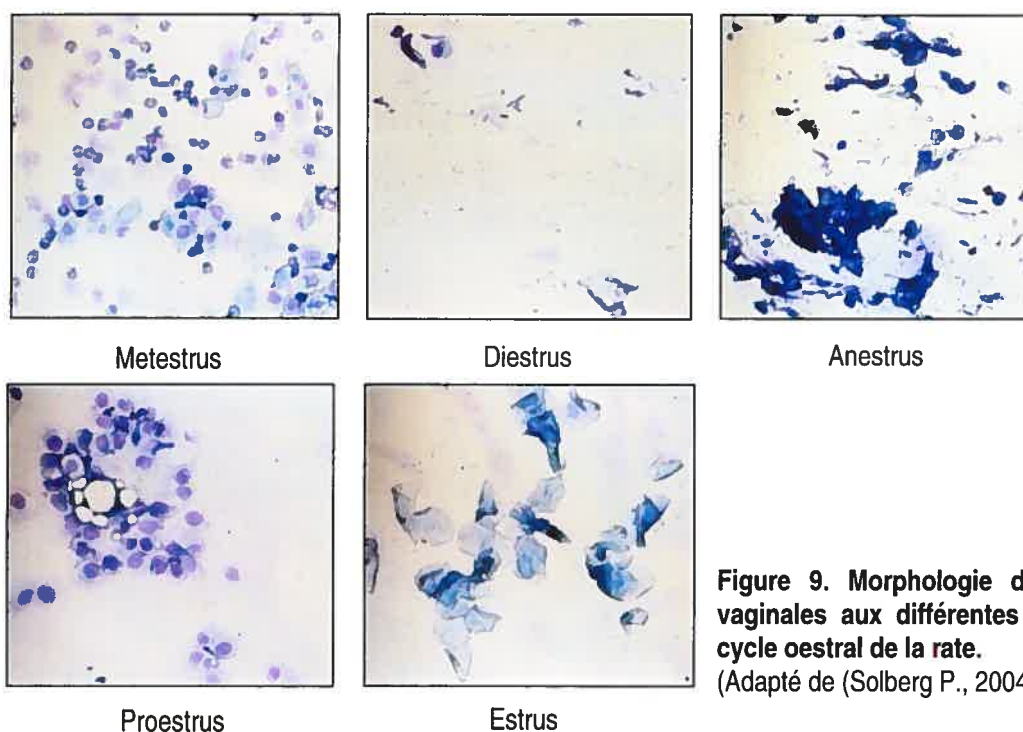


Figure 9. Morphologie des cellules vaginales aux différentes phases du cycle oestral de la rate.
(Adapté de (Solberg P., 2004))

1.2.5 TESTICULES

1.2.5.1 Anatomie et structure du testicule

Les testicules humains sont des organes compartimentés mesurant environ 5cm de long et 2,5cm de diamètre et pesant entre 10-15g. Chaque testicule contient 200m de tubules séminifères et cela constitue environ 85% de la masse de l'organe. Les testicules du rat sont rétractiles et pèsent environ 1,5-2g à l'âge adulte (Braunstein GD, 2001; Tortora GJ & G.S., 2001b). Toutes proportions gardées, la physiologie testiculaire du rat se rapproche de celle de l'humain.

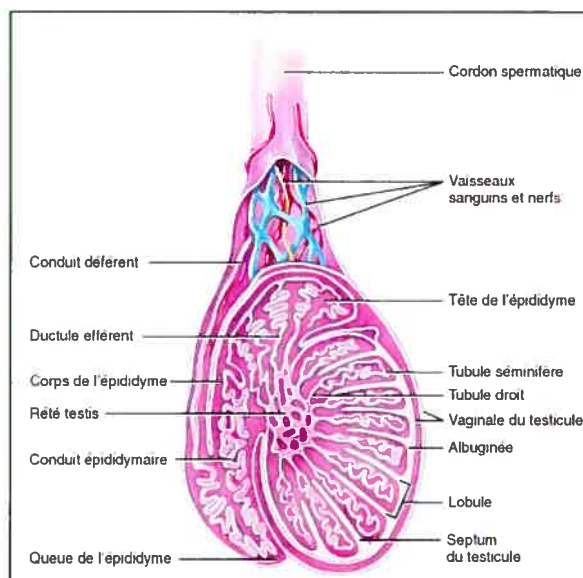


Figure 10. Anatomie interne du testicule.
(Tortora GJ, 2001)

Deux produits viennent du testicule : les spermatozoïdes qui transmettent les gènes du mâle à l'embryon et les hormones requises pour le

maintien des fonctions de reproduction. Il fournit des estrogènes, de l'inhibine, de l'activine et le facteur similaire à la relaxine (RLF, *relaxin-like factor*), mais surtout des androgènes. Les spermatozoïdes se développent dans les tubules séminifères en association avec les cellules de Sertoli ; celles-ci s'étendent de la membrane basale à la lumière et sont séparées par des jonctions serrées formant la barrière hémato-testiculaire. Les androgènes sont synthétisés entre les tubules par les cellules interstitielles (de Leydig). Ces deux compartiments sont distincts au plan structurel et séparés physiologiquement par des barrières cellulaires se développant à la puberté et limitant les échanges. Pour qu'une substance puisse atteindre les gamètes en développement, elle doit d'abord traverser ces barrières qui agissent également au niveau immunitaire afin d'empêcher la reconnaissance d'antigènes se trouvant à la surface des cellules spermatogéniques (Johnson MH & E.B., 2002b). Tout comme pour l'ovaire, les connexines jouent un rôle prédominant dans ces communications intercellulaires du testicule, notamment dans le développement de l'épididyme. Des altérations de la spermatogenèse ont été montrées chez l'humain et la souris en rapport avec une diminution d'expression de Cx43 dans les cellules de Sertoli (Dufresne *et al.*, 2003;Perez-Armendariz *et al.*, 2001).

Les cellules de Sertoli jouent un rôle très important : elles soutiennent les cellules spermatogéniques en voie de formation en plus de les nourrir et de les protéger. Elles phagocytent le cytoplasme évacué par les spermatides pendant la spermatogenèse ; elles assurent le bon mouvement des cellules spermatogéniques ainsi que la libération des spermatozoïdes dans la lumière des tubules séminifères et sécrètent un liquide y permettant leur transport ; elles produisent une protéine porteuse d'androgènes et de l'inhibine et assurent la médiation des effets d'autres hormones. La principale fonction rattachée aux cellules de Leydig est de sécréter le principal androgène : la testostérone (Johnson MH & E.B., 2002b;Tortora GJ & G.S., 2001b).

1.2.5.1.1 Récepteur aux androgènes

Le gène AR se trouve sur le chromosome X autant chez le rat que chez l'homme. Le gène a environ 90kb de longueur et la protéine traduite est longue de 919 acides aminés (Gao *et al.*, 2005). Tout comme les autres récepteurs des stéroïdes, le récepteur des androgènes (AR, *androgen receptor*) est nucléaire et soluble et fonctionne comme un facteur transcriptionnel intracellulaire. Il peut être activé par les deux androgènes endogènes, soit la testostérone et la DHT. En réponse aux nombreuses transformations occasionnées au sein de la cellule, les androgènes produisent de

multiples effets. Physiologiquement, le AR est responsable de la différenciation sexuelle *in utero* et des changements associés à la puberté chez le mâle (caractères sexuels secondaires). Chez l'adulte, les androgènes maintiennent la libido, la spermatogenèse, la force et la masse musculaires, la vitesse du métabolisme basal et de l'anabolisme, la densité minérale osseuse et l'érythropoïèse. Le AR est surtout exprimé dans les tissus cibles des androgènes tels que la prostate, le muscle squelettique, le foie et le système nerveux central (hypothalamus et hypophyse) avec une expression prédominante dans la prostate, les glandes surrénales et l'épididyme (Gao *et al.*, 2005).

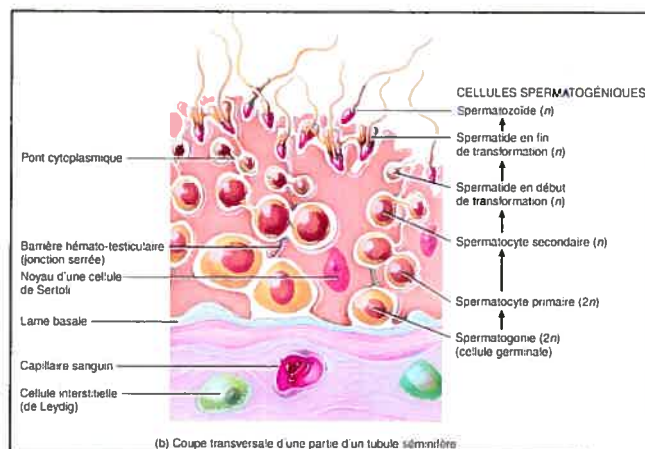
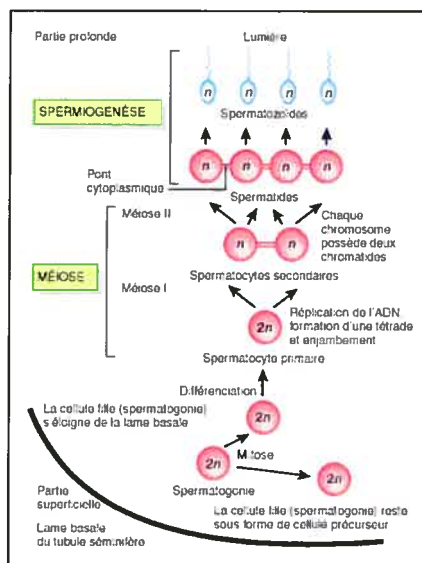
1.2.5.2 Spermatogenèse

Le processus par lequel sont produits les spermatozoïdes haploïdes par les tubules du testicule est appelé spermatogenèse (figure 11). Sa durée est d'environ 70 jours chez l'homme et 50 jours chez le rat (Roger T, 2006). La spermatogenèse débute dans les cellules germinales appelées spermatogonies qui après leur mitose se différencient en spermatocytes primaires. L'autre partie des cellules filles spermatogonies reste sous forme de cellules précurseurs. Le spermatocyte primaire croît et se divise deux fois : méiose I et II. Après la première division, deux spermatocytes secondaires $1n$ sont obtenus. Chaque spermatocyte secondaire subit ensuite une deuxième division et donne naissance à deux spermatides ; cette étape ne comporte toutefois aucune réplication d'ADN. Ainsi, un spermatocyte primaire produit quatre spermatides au terme des deux divisions cellulaires (Tortora GJ & G.S., 2001b).

L'étape finale de la spermatogenèse s'appelle spermiogenèse et constitue la transformation des spermatides en spermatozoïdes. Le ratio de transformation est de un car aucune division cellulaire n'a lieu durant ce phénomène. Brièvement, la spermiogenèse implique la formation et le développement de l'acrosome et du flagelle, la condensation de la chromatine, la restructuration du noyau et la suppression du cytoplasme avant le largage du spermatozoïde mature (O'Donnell *et al.*, 2001).

Le processus d'élongation de la spermatide requiert une synthèse protéique accrue. Les spermatides rondes immatures produisent donc de très grandes quantités d'ARNm car après le début de l'élongation de la spermatide, le noyau est tellement condensé que la transcription de l'ADN y est impossible (O'Donnell *et al.*, 2001). On nomme spermiation l'étape de relargage des spermatozoïdes, c'est la séparation du spermatozoïde de la cellule de Sertoli à laquelle il est rattaché. Il entre ensuite

dans la lumière du tubule séminifère et se dirige vers les conduits des testicules (Tortora GJ & G.S., 2001b).



Figures 11. Spermatogénèse et développement des cellules spermatogéniques.
(Tortora GJ, 2001)

Quatre cent millions de spermatozoïdes sont produits chaque jour chez l'homme. L'éjaculat humain contient 200 à 280 millions de spermatozoïdes (50-60 millions pour le rat) et la survie de ceux-ci dans les voies vaginales est rarement supérieure à 48 heures. Chez le rat, leur survie est de moins de 15 heures (Lindemann CB, 2006). La fonction principale du spermatozoïde lui-même étant de pénétrer l'ovocyte, il possède des caractéristiques très spéciales pour lui permettre d'y arriver. La tête du spermatozoïde contient l'ADN et l'acrosome. Ce dernier renferme des enzymes facilitant la pénétration dans l'ovule telle l'hyaluronidase et des protéinases. La pièce intermédiaire du spermatozoïde contient une foule de mitochondries qui permettent les activités métaboliques et l'apport d'ATP requis pour la locomotion. Le flagelle fait office de queue et le propulse sur sa trajectoire (Marieb EN, 1999c; Tortora GJ & G.S., 2001b).

1.2.5.2.1 Régulation hormonale de la spermatogénèse

Tel que mentionné plus haut, ce n'est qu'à la puberté que l'adénohypophyse, régie par la GnRH, sécrète des quantités significatives de gonadotrophines. La LH stimule les cellules de Leydig qui sécrètent de la testostérone, principal androgène produit à partir du cholestérol des testicules (figure 12). Liposoluble, la testostérone diffuse des cellules de Leydig vers le liquide interstitiel pour rejoindre

la circulation sanguine. Dans certaines cellules spécifiques de la prostate et des vésicules séminales notamment, la testostérone est convertie par la 5 α -réductase en DHT. Cet androgène est le plus actif et a sensiblement les mêmes rôles que la testostérone (Tortora GJ & G.S., 2001b). En effet, la DHT a une affinité 9 fois supérieure à la testostérone pour le récepteur aux androgènes (Colombel M, 1998).

La FSH agit de façon directe pour stimuler la spermatogenèse (McLachlan *et al.*, 1996). Aussi, en synergie avec la testostérone, elle pousse les cellules de Sertoli à stimuler la sécrétion d'une protéine liant les androgènes (*ABP*, *androgen binding protein*) dans la lumière des tubules et dans le liquide interstitiel (figure 12). Cette protéine se lie à la testostérone et permet le maintien d'une concentration élevée près des tubules. C'est la testostérone qui déclenche les étapes finales de la spermatogenèse (Meachem *et al.*, 2005; Tortora GJ & G.S., 2001b). On observe de sévères défauts de spermatogenèse dans des modèles humains et murins de déficiences combinées en FSH et en testostérone (Meachem *et al.*, 2005).

Un mécanisme de rétro-inhibition régit la production de testostérone. Lorsque la concentration sanguine de celle-ci augmente jusqu'à un certain niveau, il y a inhibition de la sécrétion de la GnRH par l'hypothalamus. Ainsi, il y a une diminution de la libération de LH entraînant une réduction de la libération de testostérone par les cellules interstitielles pour rétablir l'homéostasie. Lorsque la concentration de testostérone diminue trop, le phénomène inverse se produit (Tortora GJ & G.S., 2001b). Quand la spermatogenèse est assez avancée pour bien pourvoir aux fonctions sexuelles masculines, les cellules de Sertoli commencent à libérer de l'inhibine. Cette dernière bloque la sécrétion de FSH par l'adénohypophyse et ralentit la spermatogenèse. Lorsque cette dernière est trop ralentie, la libération d'inhibine diminue et l'accroissement de libération de FSH qui en résulte permet l'accélération de la production de spermatozoïdes (Tortora GJ & G.S., 2001b).

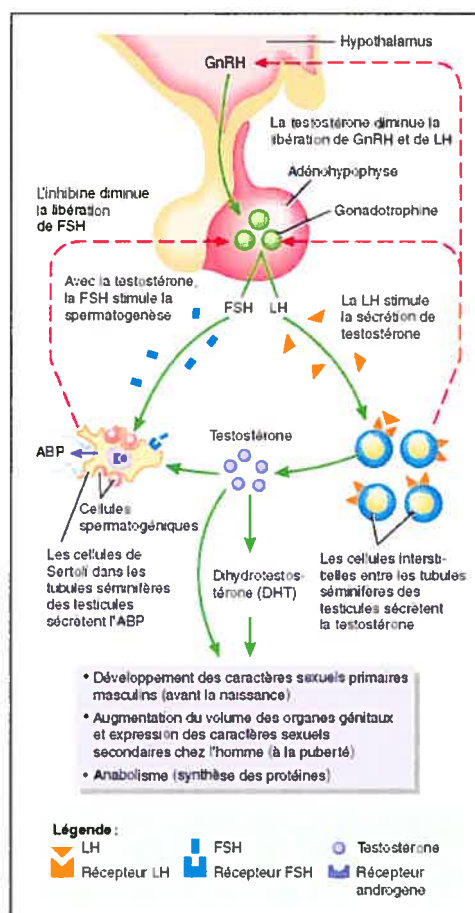


Figure 12. Régulation hormonale des fonctions testiculaires.
 (Tortora GJ, 2001)

1.2.5.3 Stéroïdogénèse testiculaire

Les hormones les plus importantes produites par le testicule sont les androgènes et ceux-ci sont dotés de caractéristiques fonctionnelles et caractéristiques distinctes. La testostérone, principal androgène, est produite par les cellules de Leydig à raison de 4-10mg par jour à partir du cholestérol ou *de novo* à partir de l'acétate par le processus de stéroïdogénèse. En effet, l'enzyme 3β -HSD responsable des premières conversions des dérivés de cholestérol est localisée dans ces cellules (Johnson MH & E.B., 2002b).

Dans le sang, environ 38% de la testostérone est liée à l'albumine. Une autre protéine liante importante au niveau des stéroïdes sexuels est la « globuline liant les hormones sexuelles » (*sex hormone binding globuline*, SHBG), qui lie 60% de la testostérone circulante (Braunstein GD, 2001). Toute la testostérone ne passe pas dans le sang ou la lymphe ; elle traverse aussi les barrières séparant les compartiments testiculaires pour pénétrer dans les tubules séminifères. Là, elle est presque totalement convertie en DHT par l'enzyme microsomal 5α -réductase-2 des cellules de Sertoli (Braunstein GD, 2001; Johnson MH & E.B., 2002b). Les enzymes importants pour la synthèse de testostérone depuis le cholestérol ainsi que leur rôle sont les mêmes que pour la stéroïdogénèse ovarienne (détails en 1.2.4.3).

1.3 PUBERTÉ ET MATURATION DE L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSAIRE

1.3.1 PUBERTÉ

La maturation sexuelle débute au moins quelques années avant l'apparition des premiers signes définitifs qui sont la ménarche chez la jeune fille et la première éjaculation chez le garçon. Ces derniers signes n'impliquent nullement la fertilité de l'individu puisque le premier éjaculat ne contient pas de spermatozoïdes et que l'ovaire n'a pas encore produit d'ovule à la première menstruation (Johnson MH & E.B., 2002c).

À l'adolescence, une importante poussée de croissance survient chez les deux sexes et celle-ci est suivie de la fusion des épiphyses. La poussée du garçon se produit environ deux ans après celle des filles ; c'est pourquoi ils sont généralement de plus grande taille (en moyenne de 10cm). En même temps que la croissance se produisent des changements corporels considérables à la puberté. Avant

cette période, les masses grasse et maigre sont sensiblement égales chez les deux sexes. À l'âge adulte par contre, les hommes ont une masse maigre valant environ 1,5 fois celle des femmes et celles-ci ont une masse grasse 2 fois plus importante que celle des hommes. Le squelette des hommes est également plus massif d'environ 1,5 fois. D'autres changements du corps s'opèrent tels que l'augmentation de la pilosité, la croissance des organes génitaux, la mue de la voix, etc. Chez la jeune femme, les estrogènes ovariens règlent la croissance des seins et des organes génitaux alors que les androgènes d'origine ovarienne et surrénalienne régulent la pilosité pubienne et axillaire. Les androgènes testiculaires des jeunes hommes sont responsables de la plupart des modifications : développement des organes génitaux, pilosité et mue de la voix (Johnson MH & E.B., 2002c).

Chez le rat, il se produit des modifications pubertaires à peu près équivalentes à ce qu'il vient d'être décrit pour l'humain. Toutefois, les processus se déclenchent relativement plus tôt : les rats sont pubères autour du 50^e jour de vie. Il existe cependant une variation de quelques jours selon les souches de rats. Nous utilisons au laboratoire la souche de rats Sprague-Dawley dont la puberté s'effectue autour de la 4^e semaine de vie pour la femelle, et autour de la 6^e semaine chez le mâle. Les deux principaux signes de l'apparition de la puberté chez le rat sont l'ouverture vaginale (ouverture de la fente vaginale après maturation du canal vaginal) chez la femelle, et la séparation balano-prépuce (séparation du prépuce et du gland du pénis) pour le mâle. La descente des testicules est aussi un signe du commencement de la puberté. Toutefois, elle est un moins bon indice et est moins utilisée puisque cela se produit 2-3 semaines avant la séparation balano-prépuce (Conseil Canadien de Protection des Animaux, 2005).

1.3.2 DÉCLENCHEMENT DE LA PUBERTÉ

Les transformations physiques survenant à l'adolescence sont largement contrôlées par les stéroïdes gonadiques et surrénaliens, mais aussi par une intervention directe des hormones hypophysaires. En fait, les taux plasmatiques de FSH et de LH restent bas durant toute l'enfance, mais augmentent autour de l'âge de la puberté jusqu'à atteindre les niveaux adultes. À cause des taux croissants d'estrogènes qui stimulent la sécrétion prolactinique, les concentrations de PRL s'élevaient chez la fille, mais non chez le garçon chez lequel le niveau est déjà comparable à celui d'un homme (Johnson MH & E.B., 2002c). La PRL agit en synergie avec les stéroïdes sexuels gonadiques et les gonadotrophines en général (Johnson MH & E.B., 2002d). Elle a de multiples fonctions autres que la lactation durant la grossesse. Elle a par exemple un contrôle sur le rein et l'activité

adrénocorticotrope, sur l'homéostasie du métabolisme et sur la sécrétion d'insuline (Ben-Jonathan *et al.*, 2006; Johnson MH & E.B., 2002d). Dans le tissu adipeux, la PRL inhibe le stockage des lipides (Ben-Jonathan *et al.*, 2006). Par ailleurs, le stress, l'exercice, le sommeil et la stimulation du mamelon sont des facteurs qui élèvent la sécrétion prolactinique (Aron DC *et al.*, 2001). Cependant, même si la PRL est connue pour jouer un rôle dans le développement du sein pour la préparation à l'allaitement, elle ne joue pas de rôle dans le développement normal du sein à l'adolescence. De plus, même si l'hyperprolactinémie chez l'humain mène à un hypogonadisme, la PRL n'a pas de rôle physiologique connu dans la régulation de la fonction gonadique (Aron DC *et al.*, 2001).

Il est devenu évident récemment que la puberté débute lorsque la relâche pulsatile de GnRH s'accroît dans la période de l'adolescence (Terasawa & Fernandez, 2001). En effet, entre le début et le milieu de la période pubertaire, l'amplitude et la fréquence des pics de LH augmentent de façon importante, reflétant une élévation de la sécrétion de cette hormone pendant le sommeil. À la fin de l'adolescence, les pics diurnes de LH s'intensifient, mais jamais autant que durant la nuit. Le profil adulte des variations de la LH ne montre pas de différences au niveau circadien comme chez l'individu d'âge pubère. Au moment où s'élèvent les taux de LH au début de la puberté, les concentrations nocturnes de testostérone croissent également chez les garçons. Chez les filles, des accroissements moindres, mais tout de même significatifs de testostérone, sont observés. Les taux d'œstrogènes de la fille s'élèveront peu à peu afin d'atteindre les concentrations observées chez une femme fertile (Johnson MH & E.B., 2002c). L'apparition de la ménarche résulte de cette élévation d'estrogènes ovariens (Terasawa & Fernandez, 2001).

L'adrénarche est un autre stade de la maturation au niveau endocrinien. Cette phase consiste en un accroissement progressif des taux d'androgènes surrénaliens, surtout de la déhydroépiandrostérone (DHEA) et de son dérivé sulfate (DHEAS) qui survient à l'âge de 6-7 ans chez la jeune fille et vers 7-8 ans chez le garçon. Ce phénomène se poursuit jusque vers l'âge de 13-15 ans. La signification de cet accroissement de sécrétion à l'égard de l'activation hypothalamo-hypophysio-gonadique est encore obscure, toutefois on leur connaît un rôle dans la croissance pilaire pubienne et axillaire (Johnson MH & E.B., 2002c; Styne D, 2001).

Chez la rate, le processus développemental menant à la puberté est basé sur une série d'événements complexes. Les gonadotrophines jouent un rôle décisif à tous les niveaux du développement sexuel. Il y a trois périodes importantes d'activation de la sécrétion gonadotrophique

durant le développement postnatal. La première est le début de la sécrétion de FSH au cours des premiers jours de vie avec une élévation sporadique des niveaux de LH. Durant la seconde semaine de vie, le développement ovarien s'amorce sous l'influence de ces hormones (Ojeda SR & Urbanski HF, 1988). La seconde période est la première manifestation de la mise en place de la puberté et est indépendante des gonades. Elle consiste en une augmentation diurne des taux basaux de LH et de sa relâche pulsatile. Cela stimule l'ovaire à produire plus d'E2 qui entraîne à son tour de petites relâches de LH. Cette boucle de rétrocontrôle positif induit une stimulation de la stéroïdogénèse et le développement de l'ovaire. La troisième étape survient plus abruptement et se caractérise par une hausse de production de stéroïdes ovariens, plus particulièrement d'E2. Cette période correspond à la décharge préovulatoire de GnRH qui entraîne le premier pic de gonadotrophines et reflète l'expression du rétrocontrôle positif engendré par l'E2. Ce dernier se développe à la fin de la période infantile, mais l'ovaire à ce moment est encore incapable de produire assez d'E2 pour entraîner un pic de LH. Il est donc essentiel que les ovaires croissent et ce, sous l'influence des gonadotrophines hypophysaires, lesquelles sont sous le contrôle de la GnRH du lait maternel. Par après, ce contrôle est facilité par l'hormone de croissance et la PRL (Ojeda SR & Urbanski HF, 1988).

Le rythme du développement folliculaire étant accéléré par l'augmentation du nombre de LHr, l'apparition du premier cycle oestral approche. Le jour de la première ovulation, la stimulation œstrogénique de l'épithélium vaginal provoque la canalisation du vagin et son ouverture. Ce dernier phénomène est la première manifestation somatique de la fertilité de l'animal (Ojeda SR & Urbanski HF, 1988). Chez le mâle, on en connaît moins à propos des mécanismes sous-tendant la mise en place de la puberté. Contrairement à la femelle, les interrelations entre l'unité hypothalamo-hypophysaire et les gonades sont déjà en fonction avant la naissance. Les toutes premières semaines de vie du raton servent ainsi de période de synchronisation de tous ces processus. Comme pour la femelle, on croit que le déclenchement de la puberté origine du SNC. Cela altère le patron de sécrétion de GnRH et provoque les changements de sécrétions de gonadotrophines qui se produisent durant la maturation prépubère et induisent le développement et la maturation des testicules. Des changements dans la stéroïdogénèse sont la conséquence du développement gonadique, et suite à cela, la testostérone devient l'androgène majeur dans le testicule. L'élévation des taux de FSH rend l'organe peu à peu plus sensible aux gonadotrophines et il y a stimulation de la production de testostérone. Ensuite, la spermatogenèse s'initie. À ce stade, la production de spermatozoïdes est très lente (plusieurs semaines) et on peut mieux comprendre pourquoi il a été plus difficile d'étudier la puberté du mâle. L'augmentation de production de testostérone induit la

maturation et le maintien des organes sexuels et le phénomène de rétrocontrôle négatif de la testostérone (avec l'inhibine) se met en place (Ojeda SR & Urbanski HF, 1988).

1.3.2.1 Hypothèse du gonadostat

L'hypothèse du gonadostat relève d'études menées chez le rat en 1932 par Hohlweg et Dohrn (Ojeda SR & Urbanski HF, 1988). L'étude portait sur deux groupes de rats castrés : des rats immatures et des rats adultes. Il se trouve qu'une plus petite dose d'estrogènes pouvait supprimer les changements de sécrétions gonadotropes induits par la castration chez les rats immatures (Terasawa & Fernandez, 2001). Ainsi, ce modèle suggère que la régulation des sécrétions de FSH et de LH est très sensible à des taux très bas de stéroïdes avant la puberté via un effet de rétrocontrôle négatif. Lors de la puberté, cette sensibilité diminuerait, menant à des niveaux circulants croissants de gonadotrophines et de stéroïdes. En fait, des variations de la sensibilité de l'hypophyse aux stéroïdes et à la GnRH se produisent effectivement à la puberté, il n'y a toutefois pas de preuve qu'elles en sont l'événement déclencheur (Johnson MH & E.B., 2002c). Pour ce qui est de la rétroaction positive, la capacité d'induire un pic de gonadotrophines semble se développer assez tardivement au cours de la puberté. De plus, l'induction reste plus ou moins efficace si l'on tient compte que, chez l'humain, plus de la moitié des cycles de la période post-pubertaire sont anovulatoires et qu'au bout de cinq ans après la première menstruation, un cycle sur cinq l'est encore. La raison de l'arrivée tardive de la capacité de rétrocontrôle positif n'est pas encore complètement comprise. On l'explique par le fait que les concentrations d'œstrogènes permettant la relâche de gonadotrophines par l'hypophyse ne seraient pas assez importantes avant un stade avancé de la puberté (Johnson MH & E.B., 2002c).

1.3.2.2 Hypothèse de la maturation du SNC

L'hypothèse selon laquelle le déclenchement de la puberté ne nécessite qu'un débit augmenté de GnRH hypothalamique met l'accent sur le SNC et ses différentes voies de communication plutôt que sur des changements progressifs de la sensibilité des systèmes de rétrocontrôle. Lors des premiers mois de vie de l'enfant, ses sécrétions gonadotropes se situent autour des valeurs adultes. Par la suite, ces taux s'effondrent jusqu'à devenir indétectables ; cette période est nommée hiatus juvénile de la sécrétion gonadotrope. Ce n'est qu'à l'adolescence que les sécrétions pulsatiles de FSH et de LH reviennent et leur concentration s'élève à nouveau jusqu'à des taux semblables à ceux des

adultes : ceci annonce le début de la puberté. La sécrétion gonadotrope pulsatile est commandée par les sécrétions de GnRH, elles aussi pulsatiles ; l'investigation des mécanismes pubertaires devrait donc se focaliser sur les raisons pour lesquelles le générateur de pulses de la GnRH reste quiescent pendant l'hiatus juvénile et reprend son rôle à une période précise de l'adolescence (Terasawa & Fernandez, 2001; Johnson MH & E.B., 2002c).

Cette seconde hypothèse est basée sur les observations faites chez des singes gonadectomisés et des êtres humains avec dysgénésie gonadique. Les sécrétions gonadotropes chez ces sujets sont élevées en période néonatale et cessent ensuite jusqu'à la phase pubertaire. Par exemple, l'ovariectomie chez les guenons immatures n'a pas suffi à stimuler la relâche de GnRH. Cependant, l'opération faite chez les mêmes animaux en période pubertaire a induit la sécrétion pulsatile de GnRH. La GnRH a directement été mesurée dans l'éminence médiane par une méthode de perfusion par pompe (Chongthammakun *et al.*, 1993; Terasawa & Fernandez, 2001).

C'est ainsi dire que l'activation du mécanisme par lequel des pulses de GnRH hypothalamique sont envoyés à l'hypophyse constitue un événement important dans le déclenchement de la puberté et que celle-ci ne peut se produire que suite à une maturation du SNC. Dès la mise en place des sécrétions pulsatiles de GnRH, les ovaires et l'hypophyse sont aptes à répondre et exercent leurs rétroactions négative et positive sur le SNC. L'unité hypophysaire-gonadique ne requiert donc rien d'autre qu'une sécrétion de GnRH par pulses réguliers (Johnson MH & E.B., 2002c).

En résumé, il semble que la maturation du SNC explique bien l'origine de la puberté et que l'on ne doit pas chercher nos réponses au niveau des interactions gonades/axe hypothalamo-hypophysaire. Quel serait donc le ou les facteur(s) déclenchant(s) et comment la relâche de GnRH est-elle activée ?

1.3.2.3 Facteurs déclenchants

Lors de la recherche des éléments responsables de la maturation sexuelle, les facteurs environnementaux ont eu un rôle très déterminant. Un phénomène assez particulier qui a aidé à démystifier les origines de la puberté s'opère depuis les deux derniers siècles : l'arrivée de la puberté des filles et des garçons est de plus en plus précoce dans plusieurs pays industrialisés de l'Europe et aux États-Unis (Frisch, 1972). Des études cliniques ont permis d'identifier plus clairement deux

critères impliqués dans la tendance vers la puberté plus précoce et dans les mécanismes qui sous-tendent ce processus. Ce sont la photopériode et la nutrition (Johnson MH & E.B., 2002c).

Depuis l'avènement de l'électricité, la période journalière d'obscurité est réduite à 7-8heures, comme si nous vivions la photopériode estivale tout au long de l'année. De telles modifications de la durée du jour peuvent avoir un impact majeur sur l'état reproductif des individus. En ce qui a trait à l'humain, l'intensité de la lumière domestique n'est probablement pas suffisante pour influencer les mécanismes neuronaux photosensibles susceptibles de réguler la relâche de GnRH et on manque également de preuves concrètes en ce sens (Johnson MH & E.B., 2002c).

D'autre part, on a tenté de démontrer des liens entre l'apport nutritionnel et la maturation sexuelle. On a constaté que le phénomène de précocité de la puberté n'est pas observé chez des populations nomades n'ayant pas bénéficié au même degré des améliorations du niveau de vie et de la nutrition (Johnson MH & E.B., 2002c; Styne D, 2001). Également, les études expérimentales prouvant l'importance d'une alimentation équilibrée pour la reproduction adulte sont nombreuses (Terasawa & Fernandez, 2001). Chez l'humain et l'animal, un amaigrissement dû à une carence protéique (l'anorexie nerveuse, par exemple) rend irrégulier le cycle ovulatoire et provoque une aménorrhée. Il y a là un lien fort important entre le poids corporel, reflet de l'alimentation, et la capacité reproductrice (Johnson MH & E.B., 2002c; Styne D, 2001).

Au milieu du vingtième siècle, des travaux chez des jeunes filles ont suggéré qu'un poids corporel critique devait être atteint avant que l'axe hypothalamo-hypophysaire-ovarien soit activé et que la poussée de croissance puisse avoir lieu. Suivant ce point de vue, le poids corporel pourrait bel et bien être un élément programmant le début de la puberté. Un peu plus tard, on émit une hypothèse semblable pour le garçon. La précocité actuelle de la maturation sexuelle par rapport à la situation d'il y a un siècle ou deux pourrait ainsi s'expliquer par l'acquisition plus rapide d'un poids critique grâce à l'amélioration de la qualité de vie, de la nutrition et des soins de santé (Styne D, 2001). Toutes les données portant sur la ménarche précoce des jeunes filles obèses, l'aménorrhée primaire des jeunes ballerines dont la masse adipeuse est très faible ou encore des jeunes filles anorexiques vont également dans le sens de l'hypothèse de l'atteinte d'un poids critique pour la mise en place de la puberté (Johnson MH & E.B., 2002c; Styne D, 2001). À croire que les états importants de la reproduction, telles que la puberté et la grossesse, ont des exigences et ne peuvent pas être acquis dans n'importe quelles conditions de poids et de santé.

Plusieurs études plus récentes mettant en lien le pourcentage de gras, le poids corporel et les taux de leptine avec l'apparition de la puberté chez l'animal vont dans tous les sens à propos de l'hypothèse du poids critique. Pour sûr, l'administration de leptine devance l'arrivée de la puberté chez la souris (Ahima *et al.*, 1997) et prévient le retard dans la mise en place de la puberté chez des rates souffrant de malnutrition sévère (Gruaz *et al.*, 1998). Des rats dont la mère a subi une restriction calorique à la fin de la gestation et/ou pendant la lactation démontrent également des taux de leptine plus bas et une puberté retardée comparativement à un groupe témoin (Leonhardt *et al.*, 2003). Une étude comparant deux groupes de rats, un RCIU et l'autre ayant subi une sous-nutrition postnatale (FR), démontre un taux de leptine plus bas et un pourcentage de gras corporel plus faible chez les deux sexes FR. De plus, un retard de puberté est observé chez les mâles des deux groupes et les femelles RCIU (Engelbregt *et al.*, 2001). Toutefois, un bon nombre de travaux montrent que les taux de leptine ne changent pas selon la puberté chez les humains et les singes et que l'arrivée de la puberté n'est pas altérée avec des patients déficients en leptine à qui on administre de la leptine recombinante (Terasawa & Fernandez, 2001). Tout compte fait, la leptine n'est peut-être pas un facteur critique pour la survenue de la puberté, du moins pas dans toutes les espèces.

D'autre part, des découvertes récentes ont été faites concernant les estrogènes contenus dans l'alimentation, les phytoestrogènes. En effet, ces isoflavones oestrogéniques sont souvent présents dans les préparations contenant de la protéine de soya, autant dans les diètes animales que dans l'alimentation de l'humain. À long terme, ceux-ci peuvent être la cause de changements dans l'arrivée de la puberté et la maturation sexuelle. Un groupe de chercheurs (Casanova *et al.*, 1999) a étudié les différences induites au niveau de la maturation sexuelle dans des groupes de rats auxquels on a donné des diètes contenant 0,02% et 0,1% de génistéine (un phytoestrogène). Les concentrations de génistéine contenues dans les diètes étaient suffisantes pour stimuler l'action oestrogénique chez des rats immatures ovariectomisés. Ils ont observé que la puberté était devancée chez les femelles ayant reçu la diète contenant les isoflavones. Par ailleurs, on a également fait ressortir une forte corrélation entre la saison de reproduction d'une espèce de singes et la disponibilité de fleurs d'acacia, ces dernières contenant des flavonoïdes ayant des propriétés oestrogéniques (Bronson FH, 1988). Somme toute, il demeure toutefois plutôt difficile de bien discerner les effets de l'alimentation de ceux des estrogènes endogènes et plusieurs approfondissements restent à faire à ce sujet.

1.4 HYPOTHÈSE DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

Plusieurs états pathologiques de l'âge adulte sont généralement attribués à la combinaison de prédispositions génétiques et du mode de vie. Depuis le début des années 1990, des équipes ont mis en évidence le rôle de l'environnement fœtal sur le développement de ces maladies, autant chez l'humain que dans des modèles animaux.

Il est maintenant clair que l'environnement fœtal a un impact sur le devenir des individus. Tel que vu précédemment, le développement des gonades et de l'axe HHG se fait en majorité en fin de gestation chez le rat. Nous avons un modèle de RCIU où des rates gestantes reçoivent une diète faible en sodium pour les 7 derniers jours de gestation et cela a des conséquences à long terme sur la progéniture au niveau des systèmes rénal et cardiovasculaire. Nous croyons que ce modèle nous permettra de mieux comprendre l'influence de l'environnement fœtal sur l'axe reproducteur. De plus, des travaux ont déjà bien montré l'association entre l'environnement intra-utérin et/ou le faible poids de naissance et des désordres à long terme au niveau de l'axe reproducteur autant chez l'humain que dans des modèles animaux de programmation fœtale (Ibanez *et al.*, 2000b; Ibanez *et al.*, 1998; Engelbregt *et al.*, 2000; Engelbregt *et al.*, 2002). À partir de ces informations, l'hypothèse de ce mémoire est que l'altération de l'environnement intra-utérin par la restriction sodique maternelle entraîne des conséquences fonctionnelles à long terme sur le développement des gonades et de l'axe hypophysaire-gonadique (HG) du fœtus RCIU.

Les objectifs spécifiques sont, à l'aide du modèle animal (contrôles et expérimentaux), de déterminer :

- 1) l'apparition de l'ouverture vaginale (femelles) ou de la séparation balano-prépuçiale (mâles) comme indice de la puberté ;
et puis, chez des rats de 12 semaines (jeunes adultes),
- 2) l'expression génique et protéique de composantes de l'axe HG ;
- 3) la concentration de stéroïdes sexuels sériques et tissulaires gonadiques ;
- 4) l'histologie des gonades.

ARTICLE

**LOW-SODIUM INDUCED INTRAUTERINE GROWTH RESTRICTION IN RAT :
IMPACT ON ONSET OF PUBERTY AND GONADAL STEROIDS LEVELS IN ADULTHOOD**

Auteurs

Rébecca Gaudet, Alain Bélanger, Louise R. Simard et Michèle Brochu.

Cet article sera soumis à l'hiver 2006 dans la revue Endocrinology.

ABSTRACT

Epidemiological studies have revealed that an unfavorable intrauterine environment during fetal life may lead to adverse outcomes in adulthood. We have previously demonstrated that a low-sodium (Na^+) diet fed to Sprague-Dawley pregnant rats during the last week of gestation results in growth restricted fetuses. We were interested by the outcome of these pups at the level of reproductive organs, thus we studied males and females as adults. To determine the effect of intrauterine growth restriction (IUGR) in our experimental rats, balanopreputial separation and vaginal opening were observed as an index of the onset of puberty, circulatory and gonadal steroids were measured by gas chromatography and negative chemical ionization mass spectrometry (GC/NCIMS), mRNA expression of main components of the gonadal steroidogenic pathway and receptors linked to the pituitary-gonadal axis was determined by real-time quantitative RT-PCR. Gonadal histology was also carried out. IUGR males show a delayed onset of puberty. Lower body weight was also observed at puberty. At 12 weeks of age, elevation of testicular testosterone concentration was noted. In the adult IUGR female group, decreased relative ovarian weight, augmentation in p450_{scc} gene expression and elevation of ovarian estradiol concentration were observed. A delayed timing of puberty in males and an increase of the gonadal steroid biosynthesis favoring the accumulation of the main steroid in gonads for both IUGR males and females support the notion that low- Na^+ induced unfavorable uterine environment has long term consequences on the pituitary-gonadal axis.

INTRODUCTION

Epidemiological studies have shown that impaired fetal growth is associated with increased risk of cardiovascular diseases, hypertension and diabetes mellitus (for review, (1)). This led to the hypothesis of fetal programming (2) that was supported by animal models in which the intra-uterine environment was manipulated through maternal nutrition, high glucocorticoid exposure or uterine artery ligation (for review, see (3;4)). A vast majority of investigations in this area were related to mechanisms underlying the programming of cardiovascular disease, diabetes and obesity.

More recently, the impact of prenatal and early postnatal factors in the programming of the reproductive axis have been explored (for review, see refs (5;6)). Studying a cohort of 145 women aged between 24 and 36 years, a positive relationship between ponderal index at birth and levels of estradiol in menstrual cycle have been established (7). It was then suggested that intrauterine environment may have long term effect on steroid secretion. It has also been observed that girls born with low birth weight had smaller uterus and reduced ovarian volume compared to their age-matched controls (8). However, there are still limited data in humans to corroborate the fetal programming of reproductive axis.

More findings have been done in animal models. Using adolescent model of sheep, Da Silva and colleagues demonstrated that overnutrition of the sheep during pregnancy induced restricted placental growth and lower plasma progesterone concentration in the foetus. Moreover, ovaries from these foetuses have less primordial follicles than their controls (9;10). Maternal undernutrition at different times during ewe gestation induced no observable effects on the gross anatomy of fetal testis but the expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) mRNA was increased (11). A decrease of ovulation rate in the progeny from mother on restricted diet was noted (12). It was also demonstrated that the number of Sertoli cells per testis was smaller in newborn lamb from mother on low

metabolizable energy diet (13). Lactation seems to be crucial for the normal development of reproductive system. In fact, it was shown that food restriction during rat lactation induces a delay in the onset of puberty in female (14) and male (15;16) pups. Moreover, a reduction of graafian follicles and an increase in plasma FSH were found in females as well as a retardation of testicle growth in males (16). The effects observed by malnutrition during rat pregnancy depend on the period of food restriction. A delay in the onset of puberty is observed in males and females when the dams were food restricted for the last two weeks of pregnancy (17). However, this was not the case if the restriction occurs during the last week of gestation (16). A recent report on males born from mothers on protein restriction during the 3 weeks of pregnancy demonstrated in the male pups, an increase in the ano-genital distance, a delay in testicular descent, and a decrease in sperm count at 270 days postnatal age. However, no difference with their controls was observed in the days of balanopreputial separation (18). When the malnutrition is induced by uterine artery ligation, intrauterine growth retardation occurs. Delays were observed in onset puberty in male and female pups as well as an uncoupling with the first estrous cycle and a decreased number of follicles in females (15;19).

We developed a model of intrauterine growth restriction (IUGR) induced by a low-Na⁺ diet fed to pregnant rats over the last (third) week of gestation (20). The offspring of IUGR model rats exhibit higher systolic blood pressure, changes in the renin-angiotensin-aldosterone system and renal dysfunction as adults (21). Female offspring of our IUGR rat model exhibit changes as adults that are consistent with the onset of cardiac remodelling (22). We hypothesize that altered fetal environment could lead to the programming of gonads and that alteration could occur at puberty and in the adult life. The aim of this paper is to determine if the reproductive axis is altered in this IUGR model. To do so, the onset of puberty as indicated by vaginal opening in females and preputial separation in males will be evaluated. To better characterize the long-term effects in the offspring, morphological studies

of the gonads, gene expression of the principal regulators of the pituitary-gonadal axis and steroidogenesis were investigated in the young adult (12 weeks of age).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Female Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, QC, Canada) weighing 225-250 g were mated with male rats. Day 1 of pregnancy was determined by the presence of spermatozoa in vaginal smears. The animals were housed under controlled light (12:12-h light-dark cycle) and temperature ($21 \pm 3^{\circ}\text{C}$), with free access to food and water. The dams were randomly assigned to one of two diets for the last 7 days of pregnancy. One group was fed a normal diet containing 0.23% Na^+ (basal diet 5755; PMI Feed, Ren's Feed and Supplies, Oakville, ON, Canada) and tap water. They gave birth to the control offspring group. The second group received a 0.03% Na^+ diet (low- Na^+ diet 5881; PMI Feed) and demineralised water. Their offspring composed the IUGR group (20). At parturition, all dams received regular rat chow (0.23% of Na^+ , Tecklab global 18% protein rodent diet 2018, Harlan Tecklad, Montreal, QC, Canada) and tap water. All offspring were weaned at 4 wk of age, were separated into male and female subgroups and all received a regular diet and tap water. This study received approval from the local animal care committee, which is accredited by the Canadian Council on Animal Care.

Marker of onset of puberty

From day 28 onwards, the females were inspected twice a day for vaginal opening (VO). In males, inspection was done from day 35 for balanopreputial separation (BPS). Onset of puberty was defined as the age (in days) in which VO or BPS occurred. Body weight was recorded that day. Five litters per group were followed.

Serum and intratissular steroid measurements

For females, cells in vaginal smears were observed daily in twelfth week, to determine the estrous cycle and only females in estrus were kept. At 12 weeks (adult), body weight was recorded and the animals were sacrificed by decapitation (0800-0930 AM). Blood sample was collected in plain Vacutainer tube (Becton Dickinson), coagulated on ice, centrifuged at 4°C, 3000 rpm and stored at -80°C until use. Pituitaries, testes and ovaries were removed, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Gonads were weighted. Serum, testis and ovaries concentrations of androstenedione, testosterone, progesterone, estrone (E1), and estradiol (E2) were determined by gas chromatography and negative chemical ionization mass spectrometry (GC/NCIMS). For each serum steroid analysis, calibration curve standards were prepared using charcoal-adsorbed human serum. Briefly, 250 µL of serum aliquots, including calibration curve standards and samples, was used to which 1.0 mL of a 0.5 M Na⁺ acetate solution was added. A methanolic solution (50 µL) of corresponding deuterated steroids was then added to each tube. The remaining procedures for serum extraction and GC-MS analysis were performed as previously reported (23). For steroid gonad analyses, tissues were homogenized using Polytron in a mixture of phosphosaline buffer (pH 7; 1 mL) and of ethanol/acetone (1/1,v/v) (2 mL). Calibration curve standards were prepared for each steroid as described above. A methanolic solution (50 µL) of corresponding deuterated steroids was then added to each tube. Centrifugation for 10 min at 3000 rpm was performed and the supernatant was removed. Steroids were further extracted with chlorobutane and the remaining procedures for steroid analyses were performed as described previously (Labrie et al, 2006). The lower limits of quantification (LLOQs) for steroid assays are indicated in Table 1. Intra- and interassay precision (percent CV) did not exceed 10%.

Quantitative real-time RT-PCR

Total cellular RNA from frozen pituitaries, testis and ovaries was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON, Canada). Total RNA was washed with RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Mississauga, ON), and treated with DNase I using RNase-Free DNase Set (QIAGEN, Canada) following manufacturer's instructions. Total RNA (0.5 µg) was converted to cDNA by reverse transcription (SuperScript™ II RNase H- Reverse Transcriptase, Invitrogen) using Oligo (dT)12-18 primer (Invitrogen). Real-time PCR using SYBR green fluorescence was performed. Each reaction consisted of 2.5 µl cDNA, 12.5 µl 2x QT SYBR Green PCR master mix (QIAGEN), 2.5 µl QT Primer Assay (QIAGEN), 7.0 µl RNase-free water and 0.5 µl (0.5 unit) uracil-DNA-glycosylase (UDG) (Invitrogen). This UDG was used to eliminate carry over contamination. Real-time-PCR was performed on an ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) for 40 cycles (94°C for 15 s, 55°C for 30s and 72°C for 30 s) after a 2 minutes incubation at 50°C to destroy the excess of UDG and an initial step at 95°C for 15 min. The certified primers (QuantiTect (QT) Primer Assays, QIAGEN) used are listed in Table 2. The procedure was carried out on triplicates from individual animals as well (6 animals per group). Results were reported using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as internal control.

Western Blot analyses

Whole female ovaries (P450aromatase), pituitaries (ER α), and a section of rat uterus (as positive control for ER α) were homogenized in extraction buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, and protease inhibitors cocktail (Roche, Indianapolis, IN)], and centrifuged at either 850g x 15 min (for ovaries) or 18500g x 10 min (for pituitaries and uterus). Supernatants collected were then resuspended in Laemmli buffer. For comparative purposes, equal amounts of proteins (10 µg/lane) were separated by SDS polyacrylamide (8% for ER α or 10% for P450arom) gel electrophoresis and then transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes

(Fisher Scientific, Nepean, ON). Membranes were blocked for 1 h at room temperature in 5% skim milk in PBS/0.1% Tween 20 (PBST) and then incubated with either rabbit anti-ER α 1:1000 or goat anti-Cyp19 (P450arom) 1:2000 (both from Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) overnight at 4°C.). Membranes were washed and then incubated with horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG (1:6000 in PBS; Amersham, Buckinghamshire, UK) or donkey anti-goat IgG (1:5000; Santa Cruz Biotechnology Inc.) for 1 h at room temperature. Equal protein loading was determined using mouse anti- β -actin primary antibodies (Novus Biologicals Inc., Littleton, ON) at 1:10 000 (ER α) and 1:40 000 (P450arom). Immunoreactive bands were visualized with the enhanced ECL chemoluminescence detection system (GE Healthcare Biosciences Inc., Montreal, QC). Bands were quantified using Alpha Imager software (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA). Results are expressed as densitometric units relative to GAPDH.

Histology

For contrast microscopy, ovaries were immersed after removal in Bouin's fixative for 3 hours and in 70% ethanol overnight and testis were immersed in 4% formaldehyde for 24h. Tissues were embedded in paraffin, cut into 5- μ m sections, dehydrated through xylene and graded alcohol series for standard hematoxylin-eosin staining. For ovaries, one section per 18 were count for primordial, primary, small preantral, large preantral, small antral, large antral and atretic follicles and corpus luteum, for a total of approximately 20 sections counted per ovary. For each testis, two microscopic fields were chosen randomly and counted for seminiferous tubules. Observations were made on ovaries and testis from 3 animals of different litter per group.

Statistical analysis

The IUGR group was compared with age-matched controls. Statistical analysis of puberty onset, steroids measurements as well as gene expression was performed by Student's t-test. If variances

were different, data were transformed with logarithms. Results are expressed as means \pm SEM with $P < 0.05$ considered to be significant.

RESULTS

Body and gonad weight at 12 weeks of age

As shown in table 3, body weight of IUGR adult male was lower than the controls rats. Testis weight was not different between the two groups. In female, there was no difference in the body weight. However, the ovary weight tends to be smaller in the IUGR group. This leads to the ovary weight-to-total body weight ratio smaller in IUGR rats than in the controls.

Onset of puberty

Timing of preputial separation was significantly delayed in IUGR males (fig.1A). At the onset of puberty, the body weight of IUGR male rats was higher than the control (fig. 1B). In female, the altered foetal environment did not affect the onset of puberty as shown by the absence of difference in the day of vaginal opening in the two groups (fig. 2A). In contrast to the males, the body weight at the onset of puberty was smaller in the IUGR group (fig. 2B).

Serum and intratissular steroid measurements

As shown in table 4, testosterone and progesterone serum levels were not different between control and IUGR male rats. For androstenedione levels, the increase in IUGR was not statistically significant with a $p=0.07$ and this is due to one male in the control group that has higher levels, 1.47 pmol/ml. Androstenedione to progesterone serum levels ratio and testosterone to androstenedione ratio were used, respectively, as index of P450c17 or 17 β HSD activities. In IUGR males, peripheral 17 β HSD activity was decreased. In testis, steroids levels were increased but this reach statistical significance only with testosterone levels. As in plasma, ratios of steroids levels were done to estimate enzyme

activities (estradiol to testosterone ratio as index of aromatase). No difference was observed between the two groups.

In females in estrous cycle, only progesterone levels were detected in the serum. No difference was observed between the two groups (Table 4). In the ovaries, an increase in estradiol content was observed in IUGR group. Enzyme activity of aromatase was estimated by estrone to androstenedione ratio since testosterone was not detectable. There is an increase that did not reach statistical significance.

Quantitative Real-Time RT-PCR transcript assay

To determine if gene expression in the steroid biosynthesis pathway was altered in gonads, StAR, P450scc, 17 β HSD3, 5 α -reductase 2 and P450aromatase mRNA were measured in tissues from 6 animals from different litters. In testis, no difference between the 2 groups was observed as shown in table 5. In ovaries, expression of P450scc was increased by 76% in IUGR group compared to controls. Since estradiol and testosterone content were increased respectively in gonads from IUGR females and males, we were interested to measure the implication of pituitary-gonadal axis. Therefore, Lhcgr and Fshr were measured in gonads and β -subunits of FSH and LH mRNA were evaluated in pituitary. No difference between the control and IUGR groups were observed. In females, ER α and β mRNA were measured to assess the retrocontrol by estradiol. No statistical difference was observed. Since connexin 43 is involved in gonads development (Juneja SH, 2003) and in spermatogenesis (Roscoe WA et al, 2001), mRNA were measured. However, the IUGR has no impact on their expression.

Western Blot analyses

The results obtained for the gene expression of P450aromatase in ovaries and of ER α in pituitaries showed a tendency to increase but the variability did not allow a clear statement. So, we decided to measure the protein by western blot. As shown in figure 3, for P450aromatase (A) in the ovary or for ER α (B) in pituitary, no significant difference was observed.

Histological analyses

No obvious differences were observed in tissue sections for morphology, spermatogenesis, follicles, and cell appearance between the IUGR and controls in both males and females. The number of seminiferous tubules was similar in the two groups as was the follicle count (figure 4).

DISCUSSION

In the present study, we have further characterized our IUGR model (20). We demonstrate that adverse foetal conditions can induce long-term changes in the reproductive system. We have shown in IUGR rats, a significant delay of onset of puberty in male only. In IUGR 12 weeks adult rat, we have shown 1) reduced ovarian relative weight 2) increased testicular testosterone and ovarian estradiol levels 3) reduced peripheral 17 β HSD activity in males 4) increased p450scc gene expression in ovaries.

The influence of fetal or postnatal environment on the onset of puberty is quite controversial in animal models. We report a delay in males only. However, in models where unfavourable perinatal environment was induced by uterine artery ligation (15;24) or maternal malnutrition during lactation (14), delayed puberty was found in both sexes. If dams received a 50% protein restricted diet during all gestation time, the male offspring balanopreputial separation is not delayed (18). This suggests

that the type, the period and the duration of the insult could affect the onset of puberty. Contrary to the fetal testis which actively produces androgens and antimüllerian hormone (AMH), the fetal ovary is endocrinologically quiescent (25). Moreover it is known that the pituitary-gonadal negative feedback and the gonadal responsiveness to LH and FSH occur after birth in female (postnatal day 1 to 8), while this happens between day 15 and 20 of gestation in males (25). In our model, the insult caused by decreased Na⁺ in the maternal diet occurs over the last 7 days of gestation. This could explain the gender difference that we observed in the onset of puberty.

We have observed that, compared with their controls, males have higher body weight at BPS while the weight is decreased in females at VO. This is in accordance to other experiments in IUGR rat (14;15) showing that the timing of puberty does not need the attainment of a critical weight in rats.

Histological assessment of the gonads in the 12-weeks offspring showed no difference between IUGR and controls for both males and females. However, relative ovarian weight is diminished by 18% in our IUGR females. Similar findings are observed in human. It was shown that post-menarcheal girls born small for gestational age exhibits reduced ovarian size (8). However, many authors could not find smaller ovaries neither testes in growth-restricted human or animals (9;19;26). Again, the timing and the nature of insult could explain this discrepancy. More investigations must be done.

In male sheep fetuses from undernourished pregnant ewes compared with controls, elevated testicular mRNA expression of the rate-limiting cholesterol transporter steroidogenic acute regulatory protein (StAR) was found (11). In these animals, plasma testosterone concentrations were increased, consistent with their steroidogenic pattern. We found that testosterone levels are higher in testis from 12-weeks IUGR rats when compared with their controls. This is not reflected in serum. To our

knowledge, this is the first study done in adult rats. To further understand this augmentation, we investigated the mRNA expression of StAR and several enzymes of the steroidogenic pathway in adult male rats. There were no differences between the two groups. Since lack of gap junction protein Cx43 is linked with gonadal and spermatogenesis disorders in mice (27;28), we hypothesized that its increase should explain an elevation of testosterone. However, testicular mRNA expression of Cx43 is not different in IUGR. This remains to be elucidated. In serum, the ratio testosterone/androstenedione is significantly diminished. This could suggest a peripheral higher activity of the enzyme 17β -HSD favouring the androstenedione.

As observed in males, main steroid levels are increased in gonads of 12-weeks females (testosterone in testis and estradiol in ovaries). However, in females, this could be explained by an increase in mRNA expression of steroidogenic enzymes. The expression of p450scc was higher and aromatase have a tendency to increase in IUGR ovaries when compared with controls. As in males, we determined the gonadal Cx43 expression in our two groups of females and no difference was observed.

Low Na^+ diet given to dams leads to a diminished maternal plasma volume expansion (20). In human, it has been shown that reduced plasma volume expansion is a cause of idiopathic IUGR (30). In summary, we thought that we have an appropriate model to study the impact of IUGR on reproductive system. Although maternal Na^+ restriction during last week of gestation has no observable effects on the gross anatomy and morphology of gonads by microscopy, it leads to reduced ovarian relative weight, increased estradiol secretion and higher p450scc expression in female ovaries. In male, delayed timing of puberty and increased gonadal testosterone concentration are observed. This shows a possibility of sexual dimorphism in response to adverse intrauterine environment. The hormonal imbalances found in our model certainly revealed that low- Na^+ induced

IUGR has long term effects on onset of puberty and steroid biosynthesis. Whether these changes have any long-term consequences on fertility and sexual behaviour remains to be determined.

ACKNOWLEDGEMENTS

A special thank goes to Dr Maja Krajinovic for the lent of Applied Biosystems PRISM real-time PCR apparatus, and to Dr Euridice Carmona for microscopy and expert advice in follicle counting. This study was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. R.G. received personal support from Canadian Institute of Health Research and from Fondation du Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine. A. Beauséjour, M.-C. Bélanger, R. Bérubé and K. Dumaresq-Doiron are acknowledged for their technical assistance.

TABLE 1. Lower limits of quantification (LLOQ) for the determination of serum and intratissular concentrations of conjugated and non-conjugated steroids by GC/NCIMS. Limits are based on a 50 mg tissue weight and could vary with the weight of each sample assayed.

Steroids	LLOQs
Serum steroid	
Androstenedione (ng/mL)	0.15
Testosterone (ng/mL)	0.15
Oestradiol (pg/mL)	6.00
Oestrone (pg/mL)	24.00
Progesterone (ng/mL)	1.50
Intratissular steroid	
Androstenedione (ng/g)	0.75
Testosterone (ng/g)	0.75
Oestradiol (pg/g)	30
Oestrone (pg/g)	120
Progesterone (ng/g)	7.5

TABLE 2. QIAGEN Primers Sets for Real-Time quantitative RT-PCR analysis.

Gene (GeneBank Accession no.)	QIAGEN QT Primer Assay
Gapdh (NM_017008)	QT00199633
StAR (NM_031558)	QT00185101
Lhcgr (NM_012978)	QT00179928
Fshr (NM_199237)	QT00459760
5α-reductase2 (NM_022711)	QT00177653
17β-HSD3 (NM_054007)	QT00185521
Aromatase (NM_017085)	QT00186942
P450scc (NM_017286)	QT00174741
Connexin43 (NM_012567)	QT00177737

TABLE 3. Total body, testis and ovary weights of 12 week adult controls and IUGR rats.

	Male		Female	
	Controls (15)	IUGR (14)	Controls (23)	IUGR (18)
Body weight (g)	449.3 ± 7.4	419.7 ± 9.4*	263.6 ± 3.9	274.7 ± 6.1
Gonad weight	1.48 ± 0.03	1.43 ± 0.04	0.057 ± 0.002	0.052 ± 0.002
Gonad: body weight ratio (x10 ⁻²)	0.32 ± 0.01	0.35 ± 0.02	0.022 ± 0.001	0.018 ± 0.001***

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. controls; number of rats used shown in parentheses.

TABLE 4. Steroid measurements in serum and gonadal tissues of 12 week adult controls and IUGR rats.

	Males		Females	
	Controls (15)	IUGR (14)	Controls (23)	IUGR (18)
Serum steroids (pmol/ml)				
Testosterone (T)	10.28 ± 1.47	11.41 ± 1.35	N/D	N/D
Estradiol (E2)	N/D	N/D	N/D	N/D
Estrone (E1)	-	-	N/D	N/D
Progesterone (P)	2.55 ± 0.42	3.85 ± 0.63	33.3 ± 3.8	40.4 ± 4.2
Androstenedione (A)	0.63 ± 0.08	0.91 ± 0.13	N/D	N/D
<i>Estimated enzyme activity (arbitrary units)</i>				
P450c17 (A/P)	0.30 ± 0.06	0.37 ± 0.07	-	-
17βHSD (T / A)	16.4 ± 1.0	13.3 ± 0.9*	-	-
	Testes		Ovaries	
	Controls (15)	IUGR (14)	Controls (23)	IUGR (18)
Intratissular steroids				
Testosterone (pmol/g)	94.7 ± 9.2	127.0 ± 10.0*	N/D	N/D
Estradiol (pmol/g)	88.8 ± 3.5	94.7 ± 3.8	2.19 ± 0.16	2.97 ± 0.22**
Estrone (pmol/g)	-	-	0.55 ± 0.04	0.67 ± 0.05
Progesterone (nmol/g)	30.6 ± 4.0	37.6 ± 6.1	13.5 ± 1.1	12.7 ± 0.8
Androstenedione (pmol/g)	38.9 ± 6.0	53.7 ± 14.1	23.4 ± 2.9	18.7 ± 2.4
<i>Estimated enzyme activity (arbitrary units)</i>				
P450c17 (A/P)	1.30 ± 0.10	1.13 ± 0.11	1.74 ± 0.16	1.43 ± 0.16
17βHSD (T / A)	2.57 ± 0.30	3.44 ± 0.43	-	-
P450aromatase (E2/T)	0.99 ± 0.10	0.79 ± 0.05	-	-
17βHSD (E1/ E2)	-	-	4.06 ± 0.21	4.36 ± 0.19
P450aromatase (E1/ A)	-	-	0.028 ± 0.004	0.041 ± 0.007

* $P < 0.05$, N/D : non detectable. Number of animals analyzed in parentheses.

TABLE 5. Gene expression by Real-Time quantitative RT-PCR in tissues of 12 week adult controls and IUGR rats.

Gene	Mean relative mRNA expression			
	Males		Females	
	Testis		Ovary	
	Controls	IUGR	Controls	IUGR
<u><i>Steroid biosynthesis</i></u>				
StAR	1.62 ± 0.24	1.97 ± 0.29	1.10 ± 0.10	0.86 ± 0.18
P450scc	1.04 ± 0.21	1.13 ± 0.11	1.24 ± 0.15	2.19 ± 0.38*
17β-HSD3	2.75 ± 0.34	2.82 ± 0.32	N/D	N/D
5α-reductase2	1.37 ± 0.27	1.20 ± 0.08	-	-
Aromatase	1.43 ± 0.29	1.32 ± 0.17	0.83 ± 0.06	1.14 ± 0.15
<u><i>Pituitary-gonadal axis</i></u>				
Lhcgr	1.69 ± 0.15	1.91 ± 0.06	0.46 ± 0.14	0.43 ± 0.03
Fshr	0.62 ± 0.13	0.58 ± 0.06	1.07 ± 0.15	0.89 ± 0.20
<u><i>Gonadal development and function</i></u>				
Connexin43	0.79 ± 0.07	0.90 ± 0.15	0.96 ± 0.09	1.21 ± 0.38
	Pituitary			
	Controls	IUGR	Controls	IUGR
FSH- β	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.02	1.12 ± 0.07	1.20 ± 0.27
LH- β	0.13 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.79 ± 0.09	0.68 ± 0.08
ER- α	-	-	0.67 ± 0.05	0.99 ± 0.14
ER- β	-	-	4.76 ± 1.74	2.72 ± 0.47

* $P < 0.05$, N/D : non detectable, For each experiment, 6 rats from different litters were used.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1.

Effects of IUGR on (A) the age at puberty onset in males as determined by balano-preputial separation (BPS) and body weight at the day of BPS (B). Results are expressed as means \pm SE, from 6 litters, n=28 for controls and n=34 for IUGR. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, IUGR vs control.

Figure 2.

Effects of IUGR on (A) the age at puberty onset in females as determined by the vaginal opening (VO) and body weight at the day of VO (B). Results are expressed as means \pm SE, from 6 litters, n=38 for controls and n=36 for females. * $P < 0.05$ IUGR vs control.

Figure 3.

Effects of IUGR on P450aromatase (A) in ovaries and on ER α (B) in pituitaries of 12 weeks adult females. Representative immunoblot and corresponding densitometric analyses. Rat uterus serves as positive control for ER α . Results are expressed as means \pm SE, from 6 litters, n=6 for each group.

Figure 4.

Representative light microscopic images of testis (A-B) and ovary (C-D) sections from control (A and C) and IUGR (B and D) rat. Bar, 0,5 mm.

Figure 1.

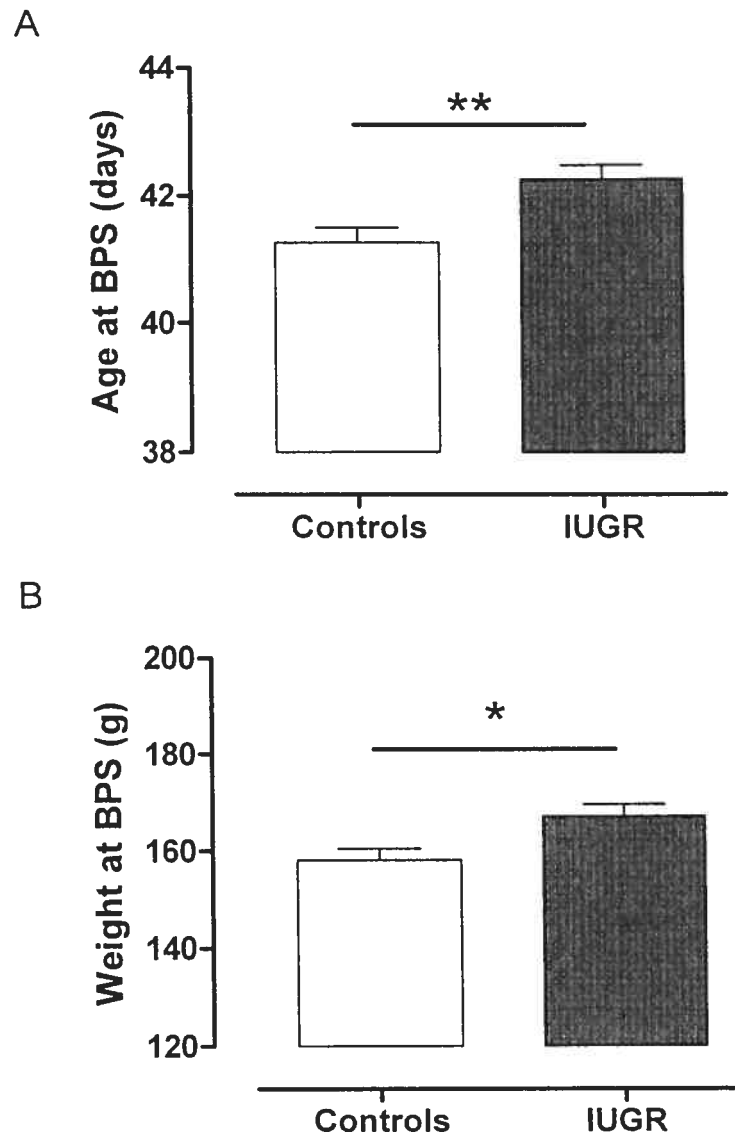


Figure 2.

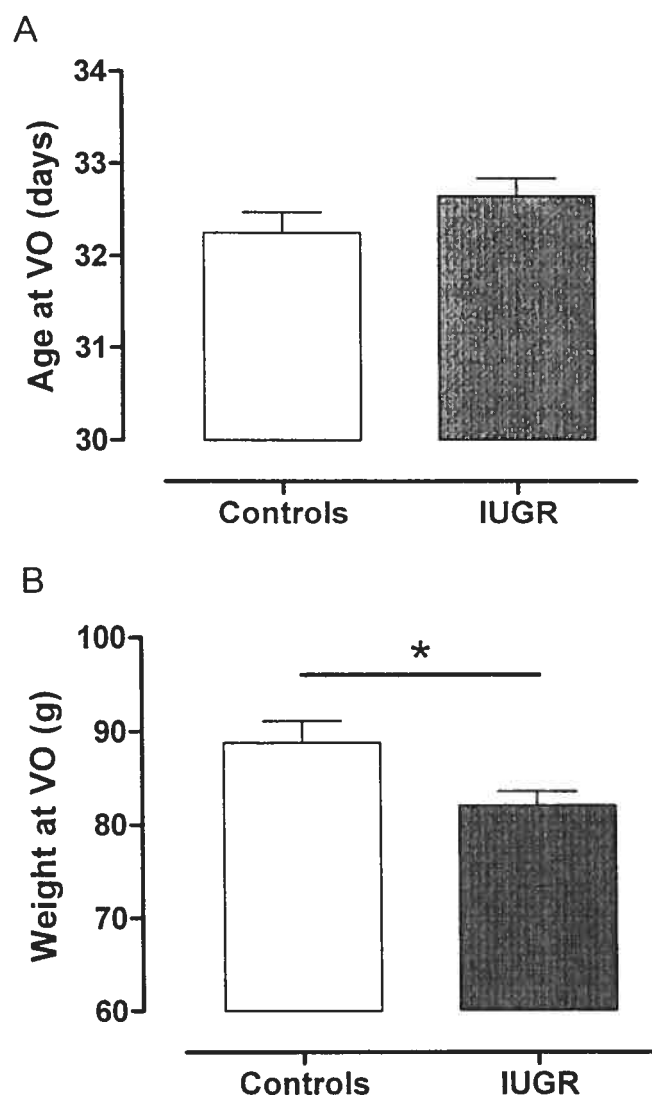


Figure 3.

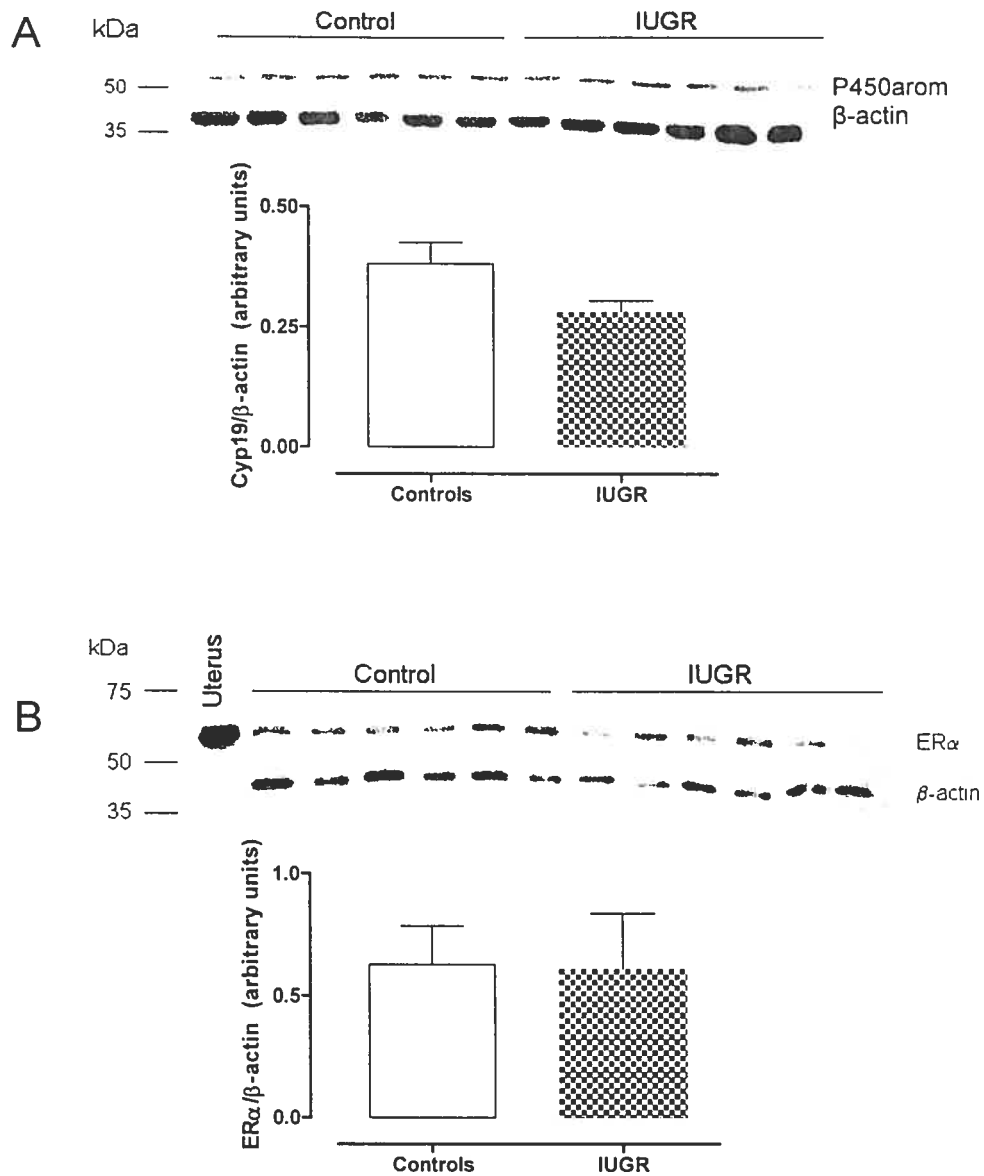
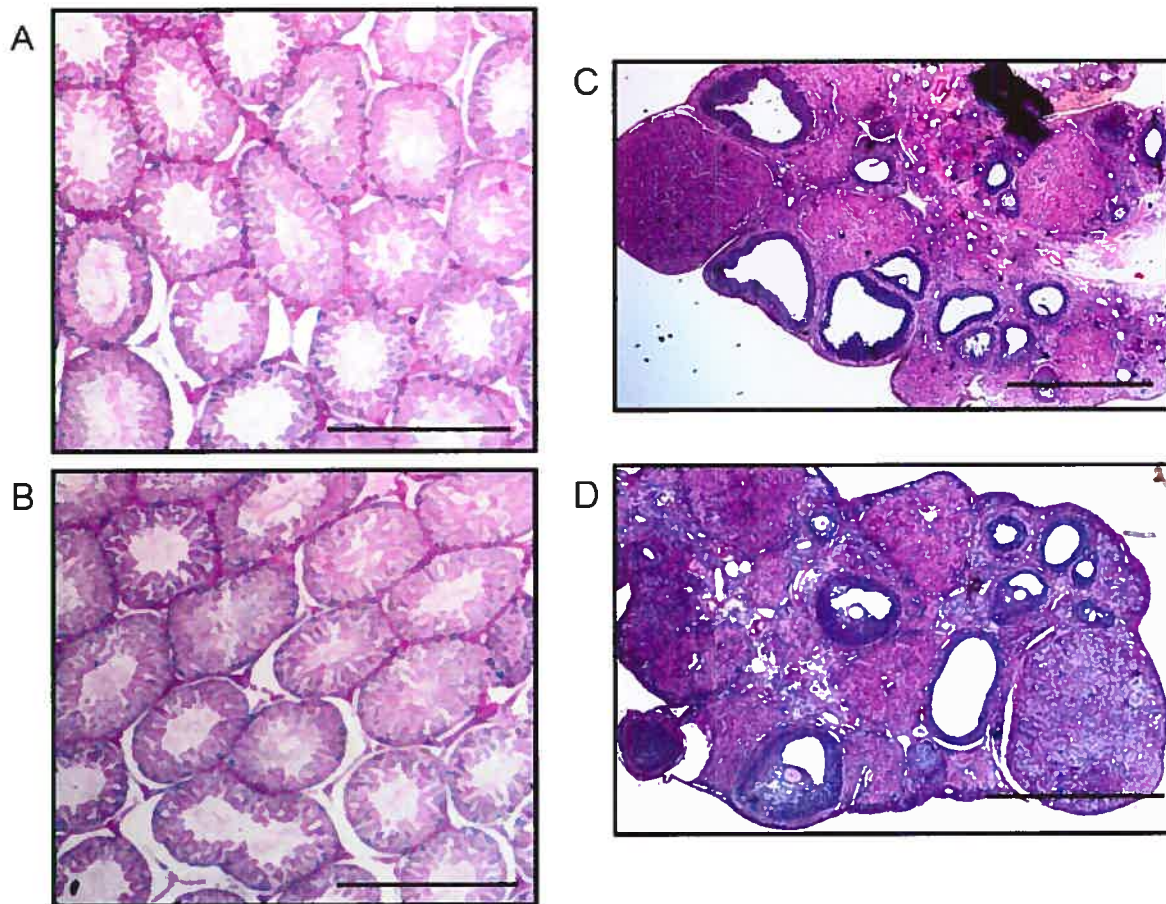


Figure 4.



REFERENCES

1. **Lau C, Rogers JM** 2004 Embryonic and fetal programming of physiological disorders in adulthood. *Birth Defects Res C Embryo Today* 72:300-312
2. **Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS** 1993 Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 341:938-941
3. **Hanson MA, Gluckman PD** 2005 Developmental processes and the induction of cardiovascular function: conceptual aspects. *J Physiol* 565:27-34
4. **Ozanne SE** 2001 Metabolic programming in animals. *Br Med Bull* 60:143-152
5. **Davies MJ, Norman RJ** 2002 Programming and reproductive functioning. *Trends Endocrinol Metab* 13:386-392
6. **Rhind SM, Rae MT, Brooks AN** 2001 Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction* 122:205-214
7. **Jasienska G, Ziomkiewicz A, Lipson SF, Thune I, Ellison PT** 2006 High ponderal index at birth predicts high estradiol levels in adult women. *Am J Hum Biol* 18:133-140
8. **Ibanez L, Potau N, Enriquez G, de ZF** 2000 Reduced uterine and ovarian size in adolescent girls born small for gestational age. *Pediatr Res* 47:575-577
9. **Da Silva P, Aitken RP, Rhind SM, Racey PA, Wallace JM** 2003 Effect of maternal overnutrition during pregnancy on pituitary gonadotrophin gene expression and gonadal morphology in female and male foetal sheep at day 103 of gestation. *Placenta* 24:248-257
10. **Da Silva P, Aitken RP, Rhind SM, Racey PA, Wallace JM** 2002 Impact of maternal nutrition during pregnancy on pituitary gonadotrophin gene expression and ovarian development in growth-restricted and normally grown late gestation sheep fetuses. *Reproduction* 123:769-777
11. **Rae MT, Rhind SM, Fowler PA, Miller DW, Kyle CE, Brooks AN** 2002 Effect of maternal undernutrition on fetal testicular steroidogenesis during the CNS androgen-responsive period in male sheep fetuses. *Reproduction* 124:33-39
12. **Rae MT, Kyle CE, Miller DW, Hammond AJ, Brooks AN, Rhind SM** 2002 The effects of undernutrition, in utero, on reproductive function in adult male and female sheep. *Anim Reprod Sci* 72:63-71
13. **Bielli A, Perez R, Pedrana G, Milton JT, Lopez A, Blackberry MA, Duncombe G, Rodriguez-Martinez H, Martin GB** 2002 Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reprod Fertil Dev* 14:333-337
14. **da Silva FT, da Fonte RC, Sampaio FJ** 2004 Puberty onset in the female offspring of rats submitted to protein or energy restricted diet during lactation. *J Nutr Biochem* 15:123-127
15. **Engelbregt MJ, Houdijk ME, Popp-Snijders C, Delemarre-van de Waal HA** 2000 The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. *Pediatr Res* 48:803-807

16. **Leonhardt M, Lesage J, Croix D, Dutriez-Casteloot I, Beauvillain JC, Dupouy JP** 2003 Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty. *Biol Reprod* 68:390-400
17. **Carney EW, Zablony CL, Marty MS, Crissman JW, Anderson P, Woolhiser M, Holsapple M** 2004 The effects of feed restriction during in utero and postnatal development in rats. *Toxicol Sci* 82:237-249
18. **Zambrano E, Rodriguez-Gonzalez GL, Guzman C, Garcia-Becerra R, Boeck L, Diaz L, Menjivar M, Larrea F, Nathanielsz PW** 2005 A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol* 563:275-284
19. **Engelbregt MJ, van Weissenbruch MM, Popp-Snijders C, Delemarre-van de Waal HA** 2002 Delayed first cycle in intrauterine growth-retarded and postnatally undernourished female rats: follicular growth and ovulation after stimulation with pregnant mare serum gonadotropin at first cycle. *J Endocrinol* 173:297-304
20. **Roy-Clavel E, Picard S, St Louis J, Brochu M** 1999 Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 180:608-613
21. **Battista MC, Oligny LL, St Louis J, Brochu M** 2002 Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E124-E131
22. **Battista MC, Calvo E, Chorvatova A, Comte B, Corbeil J, Brochu M** 2005 Intra-uterine growth restriction and the programming of left ventricular remodelling in female rats. *J Physiol* 565:197-205
23. **Labrie F, Belanger A, Belanger P, Berube R, Martel C, Cusan L, Gomez J, Candas B, Castiel I, Chaussade V, Deloche C, Leclaire J** 2006 Androgen glucuronides, instead of testosterone, as the new markers of androgenic activity in women. *J Steroid Biochem Mol Biol* 99:182-188
24. **Engelbregt MJ, van Weissenbruch MM, Lips P, van Lingen A, Roos JC, Delemarre-van de Waal HA** 2004 Body composition and bone measurements in intra-uterine growth retarded and early postnatally undernourished male and female rats at the age of 6 months: comparison with puberty. *Bone* 34:180-186
25. **Huhtaniemi I** 1995 Molecular aspects of the ontogeny of the pituitary-gonadal axis. *Reprod Fertil Dev* 7:1025-1035
26. **de Bruin JP, Nikkels PG, Bruinse HW, van Haften M, Looman CW, te Velde ER** 2001 Morphometry of human ovaries in normal and growth-restricted fetuses. *Early Hum Dev* 60:179-192
27. **Juneja SC, Barr KJ, Enders GC, Kidder GM** 1999 Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol Reprod* 60:1263-1270
28. **Roscoe WA, Barr KJ, Mhawi AA, Pomerantz DK, Kidder GM** 2001 Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin43. *Biol Reprod* 65:829-838
29. **Drummond AE, Findlay JK** 1999 The role of estrogen in folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 151:57-64
30. **Salas SP, Rosso P, Espinoza R, Robert JA, Valdes G, Donoso E** 1993 Maternal plasma volume expansion and hormonal changes in women with idiopathic fetal growth retardation. *Obstet Gynecol* 81:1029-1033

DISCUSSION

L'objectif principal de cette étude était de documenter les conséquences à long terme d'une modification de l'environnement intra-utérin sur l'axe reproducteur dans un modèle de programmation fœtale. Tel que démontré auparavant (Battista *et al.*, 2002), un EFD induit par une diète faible en Na⁺ durant la troisième et dernière semaine de gestation chez la rate entraîne chez sa progéniture adulte une augmentation de la PA systolique, une atteinte rénale ainsi qu'une altération de l'activité du SRAA. À partir de ce modèle, différentes composantes de l'axe HG ont été évaluées en vue de cerner l'impact à long terme de l'environnement intra-utérin sur les gonades, plus particulièrement. Nos travaux chez les animaux RCIU démontrent (1) un retard de la puberté chez les mâles seulement; (2) une augmentation de l'ARNm de l'enzyme limitante p450scc dans les ovaires et une diminution du poids relatif de ceux-ci et (3) une élévation du stéroïde principal dans les gonades chez les deux sexes, soit la testostérone chez le mâle et l'estradiol chez la femelle. Tous ces résultats ont déjà été discutés dans l'article, cependant je propose ici une synthèse des résultats et des réflexions qui permettent d'avoir une idée d'ensemble du projet de recherche.

En premier lieu, l'axe HG chez le rat se développe à partir du jour 12 de la gestation jusqu'à la fin de celle-ci, et ce tel que décrit dans l'introduction à la section 1.2.2.1. Comme la diète faible en Na⁺ est donnée à partir du jour 15, on peut s'attendre à une altération de cet axe. Le développement embryologique du mésonéphros se produit effectivement entre les jours 12 et 17 de la gestation. Les cellules mésonéphrotiques ont un rôle important dans le développement gonadique; la migration des cellules du rein primitif est à l'origine de l'épididyme (Marty *et al.*, 2003; Moritz & Wintour, 1999). Cette période est en effet particulièrement cruciale chez le mâle. L'activité endocrine testiculaire chez le rat est déjà sous le contrôle des gonadotrophines hypophysaires durant la période fœtale (vers le jour 16) alors que chez la femelle, les interactions hypophysaires-ovariennes ne prennent place qu'après la naissance (Huhtaniemi, 1995). De plus, on peut déjà détecter un feedback négatif hypophysaire-gonadique pendant les derniers jours de la vie fœtale du mâle alors que ce phénomène commence après le 7^e jour post-natal chez la femelle (Huhtaniemi, 1995). Trois preuves sont à l'appui de cette différence entre les deux sexes. Premièrement, la concentration de LH sérique chez le mâle *in utero* est de 3 à 4 fois inférieure à celle de la femelle. En effet, chez celle-ci le récepteur à la LH n'est pas fonctionnel avant la naissance contrairement au mâle (Pakarinen *et al.*, 1994). Par ailleurs, en pratiquant une gonadectomie *in utero* chez les deux sexes, il a été observé que les concentrations de LH augmentent chez le mâle, mais que cet effet ne survient qu'après la naissance vers les jours 7 à 11 chez la femelle (Pakarinen & Huhtaniemi, 1989; Pakarinen & Huhtaniemi, 1992). Aussi, l'ovaire fœtal est quiescent; il ne répond pas à une stimulation à la LH avant 7 jours de vie (Sokka &

Huhtaniemi, 1995). Au niveau de la puberté, cette particularité des mâles se reflète bien dans notre modèle. Nous avons observé un retard significatif de l'arrivée de la puberté d'environ une journée chez les mâles RCIU de notre modèle, alors que la puberté des femelles RCIU arrive en moyenne le même jour que celle des témoins.

Toutefois, l'EFD n'a pas d'impact sur l'apparence des gonades ni la morphologie telle qu'observée sur des coupes en microscopie. En effet, aucune différence évidente n'a été observée quant au nombre et à l'apparence des tubules séminifères et des différents types de follicules ovariens entre les animaux adultes témoins et ceux ayant subi la RCIU. D'ailleurs, d'autres équipes étudiant la programmation fœtale chez l'animal et l'humain ont montré des résultats similaires. Chez des agneaux de 2 jours nés de mère ayant reçu une diète contenant 70% de l'énergie métabolisable requise, il n'y a aucun changement de diamètre ou d'apparence des tubules séminifères (Bielli *et al.*, 2002). D'autre part, chez des fœtus agneaux femelles, aucune différence n'a été mesurée quant à l'histo-architecture ovarienne d'un groupe RCIU ayant reçu une diète contenant seulement 50% des nutriments recommandés comparés à des contrôles ayant reçu 100% de la quantité de nutriments nécessaires (Murdoch *et al.*, 2003). Chez des fœtus humain RCIU cette fois, on a étudié le volume ovarien, le volume des follicules du cortex ovarien, le diamètre maximal de chaque follicule et la distribution des différents types de follicules. Aucune différence entre ce groupe et les témoins n'a été observée (de Bruin *et al.*, 2001).

1) Mâles

Nous avons mesurés les concentrations tissulaires gonadiques des stéroïdes sexuels chez nos animaux : progestérone, androstènedione, testostérone et estradiol. Le taux de testostérone testiculaire est augmenté chez les RCIU et ceci est seul changement observé chez les mâles pour cette expérience. Nous avons mesuré l'expression de l'ARNm d'enzymes de la stéroïdogénèse (P450_{scc}, aromatase, 5 α -réductase et 17 β -HSD) pour tenter d'expliquer cette augmentation. L'expression génique d'aucune de ces enzymes n'était différente entre nos deux groupes. Il serait intéressant de vérifier les activités enzymatiques; elles n'ont pas été mesurées. Un parallèle a été fait dans la glande surrénale entre les communications cellule-cellule et la fonction corticale surrénalienne. En effet, les régions qui transmettent le mieux les colorants et qui contiennent le plus de Cx43 sont celles qui produisent les androgènes et les glucocorticoïdes en réponse à l'adrénocorticotropine (ACTH) (Murray *et al.*, 2003). Également, puisque des

jonctions cellulaires apparaissent dans la *zona fasciculata* primitive juste avant la mise en place de la stéroïdogénèse chez la souris, le rat et le lapin, on a suggéré que jonctions cellulaires étaient cruciales à la capacité de synthèse stéroïdienne (Decker, 1981). À partir de ces informations, nous avons voulu observer si l'expression de la Cx43 dans nos animaux aurait pu être en lien avec l'augmentation de testostérone dans le testicule. Aucun changement d'expression n'a toutefois été observé. Il sera question de la Cx43 plus en détail un peu plus loin. En résumé, nous observons dans notre modèle une augmentation de testostérone gonadique chez les mâles RCIU sans changements d'expression des ARNm ni de la Cx43. Il serait donc important d'étudier plus en profondeur le métabolisme de la testostérone dans le testicule. De plus, il faudrait déterminer si cette augmentation de testostérone a un effet sur la maturation des spermatozoïdes et le fonctionnement des cellules de Leydig et de Sertoli (Hill *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2004).

Cette élévation de la testostérone testiculaire ne se reflète pas au niveau sérique. Par contre, nous avons observé une diminution du ratio des concentrations sériques de testostérone sur androstènedione chez les mâles RCIU, suggérant une diminution de la conversion en testostérone par la 17 β -hydroxystéroïde déhydrogénase (17 β -HSD) en périphérie. L'activité de cette enzyme se trouve en majorité dans le foie et également dans les gonades, la glande surrénale et le tissu adipeux chez les deux sexes (Martel *et al.*, 1992). Il faut donc poursuivre l'investigation afin de déterminer si l'activité en périphérie de cette enzyme est altérée dans notre modèle.

Bien que la densité des ARNm testiculaires des récepteurs à la FSH et à la LH ne soit pas différente chez les mâles RCIU, nous avons mesuré l'ARNm hypophysaire des sous-unités bêta des deux gonadotrophines. Aucun changement n'a été observé entre les deux groupes. Quant au récepteur aux androgènes hypophysaire chez le mâle, ni l'ARNm ni la protéine n'ont été mesurés. Il faut poursuivre avec ces résultats, d'autant plus que l'augmentation de testostérone testiculaire retrouvée chez les RCIU pourrait se refléter au niveau du AR.

2) Femelles

Si la testostérone testiculaire est augmentée chez les mâles RCIU; l'E2 ovarien l'est aussi chez les femelles du même groupe. Pour expliquer ce phénomène, nous avons considéré la voie de

l'enzyme de conversion ovarienne de testostérone en E2 : l'aromatase. Nous avons pris six animaux de chaque groupe pour la mesure de l'ARNm dans le but d'avoir un premier aperçu de l'expression. Cette dernière était augmentée dans le groupe RCIU, bien que non significativement ($p=0,076$). Nous avons alors regardé au niveau de la protéine par immunobuvardage de type Western pour compléter l'étude et aucun changement n'a pu être observé entre les deux groupes. L'activité enzymatique de l'aromatase gagnerait donc à être investiguée afin de bien compléter ces travaux. L'expression de l'ARNm de P450scc, l'enzyme limitante de la stéroïdogénèse, est tout de même plus élevée chez les femelles RCIU ($p<0.05$) et cela corrèle bien avec l'augmentation d'E2 tissulaire. D'ailleurs, Rae et collaborateurs (Rae *et al.*, 2002) ont suggéré une augmentation de la capacité stéroïdogénique suite à l'observation d'une élévation de l'ARNm de la protéine StAR dans les testicules fœtaux d'un groupe de mâles nés d'une mère ayant une diète avec restriction calorique. Il serait intéressant de voir le résultat de cette expérience faite à l'âge adulte afin d'en apprendre sur le devenir de leurs animaux.

Nous n'avons pas obtenu de résultat pour l'E2 sérique, car il est indétectable par la technique utilisée, car nous avons choisi les rates en estrus. Ce choix a été effectué car la cytologie des sécrétions vaginales est très facilement reconnaissable à ce stade et nous voulions que les rates soient toutes dans la même phase du cycle. Malheureusement, cette phase est celle où le pic d'E2 circulant tire à sa fin, ce qui fait que nos résultats d'E2 sont sous les seuils détectables de la méthode utilisée. Pour le futur, les niveaux hormonaux pourraient être mesurés tout au long du cycle afin de déterminer les différences. Cependant, je ne m'attendrais pas à énormément de variation. Mes observations au niveau cytologique suggèrent que la durée du cycle ne varie pas entre les deux groupes. Une étude montre que des femmes ayant un index pondéral élevé à la naissance avaient des taux augmentés d'E2 à l'âge adulte (Jasienska *et al.*, 2006). Les femmes nées avec un petit poids ne montraient pas de différence de concentration d'E2 comparativement au groupe à indice pondéral modéré. Quoiqu'il en soit, peu de littérature existe, autant chez l'homme que chez l'animal, à propos du statut endocrinien d'adultes nés avec petit poids au niveau des stéroïdes sexuels et il faut donc poursuivre nos travaux afin d'en savoir plus.

La concentration des estrogènes dans le tissu ovarien RCIU étant supérieure, nous avons pensé investiguer du côté de l'hypophyse. La densité des ARNm du récepteur ER α a donc été mesurée. Malgré l'augmentation non-significative observée ($p=0,058$), l'expression protéique du récepteur ER α reste inchangée entre les deux groupes de femelles. Nous avons également

déterminé l'expression génique de FSHR, LHR, FSH β et LH β dans l'hypophyse femelle et aucun changement n'a été observé chez les femelles RCIU.

Les résultats obtenus soulèvent la question du phénomène de rétrocontrôle négatif des stéroïdes gonadiques ainsi que de l'activine et l'inhibine. Très tôt après la naissance les cellules de la granulosa chez le rat expriment les récepteurs à l'activine et à l'inhibine (Drummond *et al.*, 1996). D'ailleurs, un rôle pour ces molécules a été suggéré dans le développement gonadique fœtal (Albano *et al.*, 1994). Dans l'ovaire comme dans le testicule, il est connu que l'activine a plusieurs rôles dont la stimulation de la synthèse de stéroïdes, de FSH et du FSHR alors que l'inhibine peut entrer en compétition avec la FSH sur ses récepteurs et promouvoir la maturation de l'oocyte (Majdic *et al.*, 1997; Robertson *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 1999). Nous n'avons pas examiné le volet de ces deux hormones puisque les mesures d'ARNm hypophysaires de FSHR, LHR, FSH β et LH β dans les gonades n'ont pas permis de montrer de changements chez les RCIU. Il a toutefois déjà été démontré dans des fœtus humains que les plus hauts taux circulants d'inhibine A et B ainsi que d'activine A se trouvaient dans le groupe RCIU lorsque comparés à des fœtus normaux (Morpurgo *et al.*, 2004). L'investigation des niveaux circulants d'inhibine et d'activine sera mise en perspective chez nos rats RCIU. Dans le but d'apporter une meilleure contribution au présent mémoire, d'autres aspects seront approfondis dans les prochains paragraphes.

Un volet intéressant touchant le développement gonadique est celui des jonctions cellulaires. Rappelons que les connexines sont un groupe de protéines d'échange responsables des transferts intercellulaires de matériel cytosolique à faible poids moléculaire (<1,2 kDa) (Melton *et al.*, 2001). Des souris déficiente (-/-) en Cx43 démontrent un défaut de développement des cellules germinales. Ces souris sont d'ailleurs un modèle animal connu d'altération développementale fœtale au niveau gonadique (Juneja *et al.*, 1999). En effet, les gonades Cx43-/- chez les deux sexes sont plus petites que chez les témoins. De plus, en absence de Cx43, les testicules fœtaux de ce modèle démontrent une expression déficiente de plusieurs autres connexines tandis que chez les femelles, on remarque une altération de la folliculogénèse; les follicules n'atteignant pas le stade de follicule primaire (Juneja, 2003; Juneja *et al.*, 1999). Nous avons été intéressés par cet aspect et en particulier à la Cx43 même si les effets de la RCIU au niveau de l'expression des connexines ne semble pas documenté à ce jour. Comme mentionné précédemment, nous avons étudié l'expression des Cx43 par transcription inverse de l'ARNm suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR) en temps réel (*Real time RT-PCR*) dans notre modèle animal et n'avons pu relever de différences chez

les RCIU. Il serait d'intérêt d'évaluer la quantité de protéines par immunobuvardage de type Western ou encore d'apprécier semi-quantitativement la protéine par immunohistochimie.

J'aborderai ensuite le sujet des différentes souches de rats de laboratoire. Tout d'abord, il existe deux grands ensembles de lignées de rats : les *inbred*, ou consanguins, ou syngéniques, et les *outbred*, ou non-consanguins. La lignée syngénique est définie comme un ensemble d'individus génétiquement identiques dont la plupart sont homozygotes, obtenus par croisements consanguins (plus de vingt générations par croisements entre frères et sœurs sont nécessaires pour obtenir 100% du génome identique). Les animaux consanguins sont histocompatibles donc ne font pas de rejet de greffe. Leur homogénéité génétique leur confère des caractéristiques médicales et phénotypiques propres et chaque paramètre présente une variabilité très faible par rapport aux non consanguins. Ces derniers sont génétiquement différents et forment donc un échantillon représentatif de la population générale. La diversité génétique est préservée grâce à des schémas d'accouplement aléatoires (Grezel, 2006). Les rats utilisés au laboratoire sont les Sprague-Dawley, une souche de lignée non consanguine.

Voici un tableau-résumé des souches de rats de recherche les plus communes :

	Consanguins (<i>Inbred</i>)	Non consanguins (<i>Outbred</i>)
Souches de rats	Brown Norway	Levin
	Buffalo	Long-Evans
	Fischer	Diet induced obesity (DIO)
	Dahl Salt Sensitive	Russell
	Spontaneous Hypertensive (SHR)	Sprague-Dawley (SD)
	Wistar Furth	Wistar
	Wistar Kyoto (WKY)	Wistar Hanover
	Zucker Diabetic Fatty (ZDF)	Zucker

Tableau 2. Classement des souches de rats de laboratoire les plus utilisées.
(Références : (Charles River Laboratories Inc., 2006))

Les souches hautement consanguines sont génétiquement très artificielles au sens où elles manquent de variabilité génétique d'un individu à l'autre à l'intérieur de cette même population. De là, toute lignée syngénique ne représente qu'un génotype parmi la multitude présente dans une population naturelle. Ainsi, ces animaux s'adaptent moins bien aux effets de l'environnement sur la physiologie, le développement et le comportement que les populations non-consanguines. Ces dernières sont donc plus indiquées pour modéliser l'humain (Hartl DL, 2001; Phelan & Austad, 1994). Si l'on prend les individus un par un, par contre, l'animal consanguin montrera plus de variabilité qu'un non consanguin. À la lumière des informations ci-haut, on s'attendrait au contraire. Cette

observation d'une plus grande variance au sein des populations consanguines est appelée « homéostasie génétique ». La base de ce phénomène n'est pas connue (Hartl DL, 2001).

Malgré le fait que notre population de rats démontre une grande variabilité inter-animal, les paramètres physiques tels que la température, l'humidité, le temps et la quantité de lumière, le type de nourriture et d'eau, l'habitat, etc. sont contrôlés, contrairement à l'être humain libre ayant un mode de vie unique (tabac, alcool, drogue, facteurs géographiques, air ambiant/pollution, facteurs psychologiques, etc.). Par contre, malgré un environnement contrôlé, il peut s'avérer que le nombre d'animaux déterminé préalablement pour nos expériences antérieures ne soit pas suffisant. Six animaux provenant de portées différentes, ce n'est donc pas suffisant pour atteindre un seuil statistique significatif pour étudier l'expression des gènes dans l'hypophyse et les gonades. Par contre, nous appuyons ces résultats par la mesure protéique (immunobuvardage Western).

En conclusion, ces travaux contribuent à l'avancement des sciences au niveau de la programmation fœtale et du système reproducteur. De plus, ce projet est unique puisque le modèle utilisé est différent des autres. Nos travaux suggèrent que la RCIU peut prédisposer à des conditions pathologiques du système reproducteur et mettent donc en lumière plusieurs avenues à investiguer afin de mieux comprendre les mécanismes sous-tendant la plasticité des systèmes *in utero* ainsi que l'augmentation du risque de développement de maladies de l'âge adulte en découlant, incluant les troubles de la reproduction. Identifier les mécanismes en cause pourrait sans doute permettre la découverte de voies thérapeutiques. N'oublions pas que 7% des couples canadiens en âge de procréer font face à des troubles de fertilité et qu'entre 2 et 10% des couples à travers le monde sont incapables d'avoir un enfant. De plus, l'infertilité idiopathique (lorsque ni la qualité du sperme ni l'intégrité de l'appareil reproducteur féminin ne sont en cause) est actuellement de l'ordre de 10% (Gouvernement du Canada, 2006; Serono S.A., 2005).

BIBLIOGRAPHIE

- Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D, & Flier JS (1997). Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest* **99**, 391-395.
- Albano RM, Arkell R, Beddington RS, & Smith JC (1994). Expression of inhibin subunits and follistatin during postimplantation mouse development: decidual expression of activin and expression of follistatin in primitive streak, somites and hindbrain. *Development* **120**, 803-813.
- Albrecht ED & Pepe GJ (1998). Secretion and Metabolism of Steroids in Primate Mammals During Pregnancy. In *Endocrinology of Pregnancy*, ed. Fuller W. Bazer, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
- Allden WG (1970). The effects of nutritional deprivation on the subsequent productivity of sheep and cattle. *Nutr Abstr Rev* **40**, 1167-1184.
- Aron DC, Findling JW, & Blake Tyrrell J (2001). Hypothalamus & Pituitary. In *Basic and Clinical Endocrinology*, eds. Greenspan FS & Gardner DG, pp. 100-162. Appleton & Lange/McGraw-Hill, Norwalk, Connecticut.
- Ascoli M, Fanelli F, & Segaloff DL (2002). The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev* **23**, 141-174.
- Barker DJ (1997a). The long-term outcome of retarded fetal growth. *Clin Obstet Gynecol* **40**, 853-863.
- Barker DJ (1997c). Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. *Nutrition* **13**, 807-813.
- Barker DJ (1997b). The fetal origins of coronary heart disease. *Eur Heart J* **18**, 883-884.
- Battista MC, Calvo E, Chorvatova A, Comte B, Corbeil J, & Brochu M (2005). Intra-uterine growth restriction and the programming of left ventricular remodelling in female rats. *J Physiol* **565**, 197-205.
- Battista MC, Oligny LL, St Louis J, & Brochu M (2002). Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**, E124-E131.
- Bazer FW, Ott TL, & Spencer TE (1998). Endocrinology of the Transition from Recurring Estrous Cycles to Establishment of Pregnancy in Subprimate Mammals. In *Endocrinology of Pregnancy*, ed. Bazer FW, pp. 1-34. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
- Beaudoin AR (1980). Embryology and Teratology. In *The Laboratory Rat*, ed. Baker HJ L JWS, pp. 76-101. Academic Press, New York.
- Bedard S, Sicotte B, St-Louis J, & Brochu M (2005). Modulation of body fluids and angiotensin II receptors in a rat model of intra-uterine growth restriction. *J Physiol* **562**, 937-950.
- Ben-Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD, & Lapensee CR (2006). Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends Endocrinol Metab* **17**, 110-116.
- Bielli A, Perez R, Pedrana G, Milton JT, Lopez A, Blackberry MA, Duncombe G, Rodriguez-Martinez H, & Martin GB (2002). Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reprod Fertil Dev* **14**, 333-337.
- Borwick SC, Rhind SM, McMillen SR, & Racey PA (1997). Effect of undernutrition of ewes from the time of mating on fetal ovarian development in mid gestation. *Reprod Fertil Dev* **9**, 711-715.
- Braunstein GD (2001). Testes. In *Basic and Clinical Endocrinology*, eds. Greenspan FS & Gardner DG, pp. 422-452. Appleton & Lange/McGraw-Hill, Norwalk, Connecticut.
- Bronson FH (1988). Seasonal Regulation of Reproduction in Mammals. In *The Physiology of Reproduction*, eds. Knobil E & Neill JD, pp. 1831-1871. Raven Press, New York.

- Buckler H (2005). The menopause transition: endocrine changes and clinical symptoms. *J Br Menopause Soc* **11**, 61-65.
- Campbell RK, an-Emig DM, & Moyle WR (1991). Conversion of human choriogonadotropin into a follitropin by protein engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 760-764.
- Carney EW, Zablony CL, Marty MS, Crissman JW, Anderson P, Woolhiser M, & Holsapple M (2004). The effects of feed restriction during in utero and postnatal development in rats. *Toxicol Sci* **82**, 237-249.
- Casanova M, You L, Gaido KW, Archibeque-Engle S, Janszen DB, & Heck HA (1999). Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro. *Toxicol Sci* **51**, 236-244.
- Charles River Laboratories Inc. Research Models and Services. Charles River Laboratories, www.criver.com . 2006. Charles River Laboratories.
- Cheng CK & Leung PC (2005). Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. *Endocr Rev* **26**, 283-306.
- Chongthammakun S, Claypool LE, & Terasawa E (1993). Ovariectomy increases in vivo luteinizing hormone-releasing hormone release in pubertal, but not prepubertal, female rhesus monkeys. *J Neuroendocrinol* **5**, 41-50.
- Colombel M MJ. Facteurs pronostiques et traitements des formes avancées du cancer prostatique. John-Libbey Eurotext, <http://www.john-libbey-eurotext.fr/en/revues/medecine/met/e-docs/00/02/BF/71/article.md> . 1998.
- Conseil Canadien de Protection des Animaux. Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation. <http://www.ccac.ca/fr> 2. 2005.
- Crowe C, Dandekar P, Fox M, Dhingra K, Bennet L, & Hanson MA (1995). The effects of anaemia on heart, placenta and body weight, and blood pressure in fetal and neonatal rats. *J Physiol* **488** (Pt 2), 515-519.
- Cui XL, Brockman D, Campos B, & Myatt L (2006). Expression of NADPH oxidase isoform 1 (Nox1) in human placenta: involvement in preeclampsia. *Placenta* **27**, 422-431.
- da Silva FT, da Fonte RC, & Sampaio FJ (2004). Puberty onset in the female offspring of rats submitted to protein or energy restricted diet during lactation. *J Nutr Biochem* **15**, 123-127.
- Da Silva P, Aitken RP, Rhind SM, Racey PA, & Wallace JM (2002). Impact of maternal nutrition during pregnancy on pituitary gonadotrophin gene expression and ovarian development in growth-restricted and normally grown late gestation sheep fetuses. *Reproduction* **123**, 769-777.
- Davies MJ & Norman RJ (2002). Programming and reproductive functioning. *Trends Endocrinol Metab* **13**, 386-392.
- de Bruin JP, Dorland M, Bruinse HW, Spliet W, Nikkels PG, & te Velde ER (1998). Fetal growth retardation as a cause of impaired ovarian development. *Early Hum Dev* **51**, 39-46.
- de Bruin JP, Nikkels PG, Bruinse HW, van Haaften M, Looman CW, & te Velde ER (2001). Morphometry of human ovaries in normal and growth-restricted fetuses. *Early Hum Dev* **60**, 179-192.
- Decker RS (1981). Gap junctions and steroidogenesis in the fetal mammalian adrenal cortex. *Dev Biol* **82**, 20-31.
- Delemarre-van de Waal HA, van Coeverden SC, & Engelbregt MT (2002). Factors affecting onset of puberty. *Horm Res* **57 Suppl 2**, 15-18.
- Drummond AE (2006). The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol* **4**, 16.
- Drummond AE, Dyson M, Mercer JE, & Findlay JK (1996). Differential responses of post-natal rat ovarian cells to FSH and activin. *Mol Cell Endocrinol* **122**, 21-32.

- Drummond AE & Findlay JK (1999). The role of estrogen in folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* **151**, 57-64.
- Dufresne-J, Finnson KW, Gregory M, & Cyr DG (2003). Expression of multiple connexins in the rat epididymis indicates a complex regulation of gap junctional communication. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, C33-C43.
- Engelbregt MJ, Houdijk ME, Popp-Snijders C, & Delemarre-van de Waal HA (2000). The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. *Pediatr Res* **48**, 803-807.
- Engelbregt MJ, van Weissenbruch MM, Popp-Snijders C, & Delemarre-van de Waal HA (2002). Delayed first cycle in intrauterine growth-retarded and postnatally undernourished female rats: follicular growth and ovulation after stimulation with pregnant mare serum gonadotropin at first cycle. *J Endocrinol* **173**, 297-304.
- Engelbregt MJ, van Weissenbruch MM, Popp-Snijders C, Lips P, & Delemarre-van de Waal HA (2001). Body mass index, body composition, and leptin at onset of puberty in male and female rats after intrauterine growth retardation and after early postnatal food restriction. *Pediatr Res* **50**, 474-478.
- Erickson GF, Kokka S, & Rivier C (1995). Activin causes premature superovulation. *Endocrinology* **136**, 4804-4813.
- Fondation Genevoise pour la Formation et la Recherche Médicales. Cycle Menstruel. Campana A. http://www.gfmer.ch/Cours/Steroid_biosynthesis_ovary.htm . 2003.
- Fowden AL, Giussani DA, & Forhead AJ (2006). Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology (Bethesda)* **21**, 29-37.
- Frisch RE (1972). Weight at menarche: similarity for well-nourished and undernourished girls at differing ages, and evidence for historical constancy. *Pediatrics* **50**, 445-450.
- Gao W, Bohl CE, & Dalton JT (2005). Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem Rev* **105**, 3352-3370.
- Gennari L, Merlotti D, De P, V, Calabro A, Becherini L, Martini G, & Nuti R (2005). Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol* **161**, 307-320.
- Godfrey KM & Barker DJ (2000). Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr* **71**, 1344S-1352S.
- Goldfien A (2001). Ovaries. In *Basic and Clinical Endocrinology*, eds. Greenspan FS & Gardner DG, pp. 453-508. Appleton & Lange/McGraw-Hill, Norwalk, Connecticut.
- Gouvernement du Canada. Les biofondations - L'infertilité. <http://www.biofondations.qc.ca/francais/View.asp?x=767#infert> . 2006.
- Grezel D. Particularités immunologiques des rongeurs. http://www.vet-lyon.fr/ens/expa/acc_immuno.htm . 2006. École Nationale Vétérinaire de Lyon.
- Gromoll J & Simoni M (2005). Genetic complexity of FSH receptor function. *Trends Endocrinol Metab* **16**, 368-373.
- Gruaz NM, Lalaoui M, Pierroz DD, Englaro P, Sizonenko PC, Blum WF, & Aubert ML (1998). Chronic administration of leptin into the lateral ventricle induces sexual maturation in severely food-restricted female rats. *J Neuroendocrinol* **10**, 627-633.
- Guillette LJ, Jr. & Gunderson MP (2001). Alterations in development of reproductive and endocrine systems of wildlife populations exposed to endocrine-disrupting contaminants. *Reproduction* **122**, 857-864.
- Hartl DL. Genetic Management of Outbred Laboratory Rodent Populations. www.criver.com . 2001. Department of Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts.
- Hewitt SC & Korach KS (2003). Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues. *Reproduction* **125**, 143-149.

- Hill M. UNSW Embryology. <http://embryology.med.unsw.edu.au/wwwhuman/MCycle/Ocycle.htm> . 2005.
- Hill CM, Anway MD, Zirkin BR, & Brown TR (2004). Intratesticular androgen levels, androgen receptor localization, and androgen receptor expression in adult rat Sertoli cells. *Biol Reprod* **71**, 1348-1358.
- Hokken-Koelega AC (2002). Timing of puberty and fetal growth. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **16**, 65-71.
- Huhtaniemi I (1995). Molecular aspects of the ontogeny of the pituitary-gonadal axis. *Reprod Fertil Dev* **7**, 1025-1035.
- Ibanez L, Potau N, & de Zegher F (2000a). Recognition of a new association: reduced fetal growth, precocious pubarche, hyperinsulinism and ovarian dysfunction. *Ann Endocrinol (Paris)* **61**, 141-142.
- Ibanez L, Potau N, Enriquez G, & de ZF (2000b). Reduced uterine and ovarian size in adolescent girls born small for gestational age. *Pediatr Res* **47**, 575-577.
- Ibanez L, Potau N, Francois I, & de Zegher F (1998). Precocious pubarche, hyperinsulinism, and ovarian hyperandrogenism in girls: relation to reduced fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 3558-3562.
- Ivell R (2002). Endocrinology. This hormone has been relaxin' too long! *Science* **295**, 637-638.
- Jacob J, Sebastian KS, Devassy S, Priyadarsini L, Farook MF, Shameem A, Mathew D, Sreeja S, & Thampan RV (2006). Membrane estrogen receptors: genomic actions and post transcriptional regulation. *Mol Cell Endocrinol* **246**, 34-41.
- Jasienska G, Ziolkiewicz A, Lipson SF, Thune I, & Ellison PT (2006). High ponderal index at birth predicts high estradiol levels in adult women. *Am J Hum Biol* **18**, 133-140.
- Jensen A, Garnier Y, & Berger R (1999). Dynamics of fetal circulatory responses to hypoxia and asphyxia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **84**, 155-172.
- Johnson MH & E.B. (2002f). Le sexe. In *Reproduction* pp. 1-16. De Boeck Université, Paris.
- Johnson MH & E.B. (2002c). La puberté et la maturation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique. In *Reproduction* pp. 119-129. De Boeck Université, Paris.
- Johnson MH & E.B. (2002a). La fonction ovarienne adulte. In *Reproduction* pp. 69-86. De Boeck Université, Paris.
- Johnson MH & E.B. (2002b). La fonction testiculaire chez l'adulte. In *Reproduction* pp. 53-68. De Boeck Université, Paris.
- Johnson MH & E.B. (2002d). La régulation de la fonction gonadique. In *Reproduction* pp. 87-116. De Boeck Université, Paris.
- Johnson MH & E.B. (2002e). Les messagers de la reproduction. In *Reproduction* pp. 33-51. De Boeck Université, Paris.
- Juneja SC (2003). mRNA expression pattern of multiple members of connexin gene family in normal and abnormal fetal gonads in mouse. *Indian J Physiol Pharmacol* **47**, 147-156.
- Juneja SC, Barr KJ, Enders GC, & Kidder GM (1999). Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol Reprod* **60**, 1263-1270.
- Kanaka-Gantenbein C, Mastorakos G, & Chrousos GP (2003). Endocrine-related causes and consequences of intrauterine growth retardation. *Ann N Y Acad Sci* **997**, 150-157.
- Kohn DF BS (1984). Biology and Diseases of Rats. In *Laboratory Animal Medicine* pp. 91-120. Academic Press Inc..
- Langley SC & Jackson AA (1994). Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci (Lond)* **86**, 217-222.
- Larsen W. (2003). *Embryologie humaine*, 2e édition, DeBoeck Université ed.

Leonhardt M, Lesage J, Croix D, Dutriez-Casteloot I, Beauvillain JC, & Dupouy JP (2003). Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty. *Biol Reprod* **68**, 390-400.

Lindemann CB. Mechanisms of Sperm Motility. Oakland University Departement of Biological Sciences, <http://www2.oakland.edu/biology/lindemann/index.htm> . 2006.

MacLennan NK, James SJ, Melnyk S, Pirooz A, Jernigan S, Hsu JL, Janke SM, Pham TD, & Lane RH (2004). Uteroplacental insufficiency alters DNA methylation, one-carbon metabolism, and histone acetylation in IUGR rats. *Physiol Genomics* **18**, 43-50.

Majdic G, McNeilly AS, Sharpe RM, Evans LR, Groome NP, & Saunders PT (1997). Testicular expression of inhibin and activin subunits and follistatin in the rat and human fetus and neonate and during postnatal development in the rat. *Endocrinology* **138**, 2136-2147.

Marieb EN (1999a). Grossesse et développement prénatal. In *Anatomie et physiologie humaines*, ed. Éditions du nouveau pédagogique inc., pp. 1086-1115. St-Laurent, Québec.

Marieb EN (1999b). Le système endocrinien. In *Anatomie et physiologie humaines*, ed. Éditions du nouveau pédagogique inc., pp. 588-627. St-Laurent, Québec.

Marieb EN (1999c). Le système génital. In *Anatomie et physiologie humaines*, ed. Éditions du nouveau pédagogique inc., pp. 1038-1085. St-Laurent, Québec.

Marshall JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, Griffin ML, & Kelech RP (1992). GnRH pulses--the regulators of human reproduction. *Trans Am Clin Climatol Assoc* **104**, 31-46.

Martel C, Rheaume E, Takahashi M, Trudel C, Couet J, Luu-The V, Simard J, & Labrie F (1992). Distribution of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene expression and activity in rat and human tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* **41**, 597-603.

Marty MS, Chapin RE, Parks LG, & Thorsrud BA (2003). Development and maturation of the male reproductive system. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* **68**, 125-136.

McLachlan RI, Wreford NG, O'Donnell L, De Kretser DM, & Robertson DM (1996). The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *J Endocrinol* **148**, 1-9.

Meachem SJ, Robertson DM, Wreford NG, McLachlan RI, & Stanton PG (2005). Oestrogen does not affect the restoration of spermatogenesis in the gonadotrophin-releasing hormone-immunised adult rat. *J Endocrinol* **185**, 529-538.

Melton CM, Zaunbrecher GM, Yoshizaki G, Patino R, Whisnant S, Rendon A, & Lee VH (2001). Expression of connexin 43 mRNA and protein in developing follicles of prepubertal porcine ovaries. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **130**, 43-55.

Moritz KM & Wintour EM (1999). Functional development of the meso- and metanephros. *Pediatr Nephrol* **13**, 171-178.

Morpurgo PS, Cetin I, Borgato S, Cortelazzi D, Nobile-Desantis MS, Vaghi I, & Beck-Peccoz P (2004). Circulating levels of inhibin A, inhibin B and activin A in normal and intrauterine growth restricted (IUGR) fetuses. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **117**, 38-44.

Murdoch WJ, Van Kirk EA, Vonnahme KA, & Ford SP (2003). Ovarian responses to undernutrition in pregnant ewes, USA. *Reprod Biol Endocrinol* **1**, 6.

Murphy VE, Smith R, Giles WB, & Clifton VL (2006). Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus. *Endocr Rev* **27**, 141-169.

Murray SA, Davis K, & Gay V (2003). ACTH and adrenocortical gap junctions. *Microsc Res Tech* **61**, 240-246.

- Myatt L (2006). Placental adaptive responses and fetal programming. *J Physiol* **572**, 25-30.
- O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, & Simpson ER (2001). Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* **22**, 289-318.
- Ojeda SR & Urbanski HF (1988). Puberty in Rat. In *The Physiology of Reproduction*, eds. Knobil E & Neill JD, pp. 1699-1737. Raven Press, New York.
- Pakarinen P & Huhtaniemi I (1989). Gonadal and sex steroid feedback regulation of gonadotrophin mRNA levels and secretion in neonatal male and female rats. *J Mol Endocrinol* **3**, 139-144.
- Pakarinen P, Proshlyakova E, & Huhtaniemi I (1994). Pituitary-gonadal interactions in perinatal rats: relationships of plasma luteinizing hormone and testosterone concentrations, and pituitary levels of LH subunit mRNAs. *Neuroendocrinology* **60**, 42-49.
- Pakarinen PA & Huhtaniemi IT (1992). Development of gonadal feedback regulation of gonadotropin gene expression and secretion in female rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* **127**, 454-458.
- Peleg D, Kennedy CM, & Hunter SK (1998). Intrauterine growth restriction: identification and management. *Am Fam Physician* **58**, 453-457.
- Perez-Armendariz EM, Lamoyi E, Mason JI, Cisneros-Armas D, Luu-The V, & Bravo Moreno JF (2001). Developmental regulation of connexin 43 expression in fetal mouse testicular cells. *Anat Rec* **264**, 237-246.
- Persson I, Ahlsson F, Ewald U, Tuvemo T, Qingyuan M, von RD, & Proos L (1999). Influence of perinatal factors on the onset of puberty in boys and girls: implications for interpretation of link with risk of long term diseases. *Am J Epidemiol* **150**, 747-755.
- Pham TD, MacLennan NK, Chiu CT, Laksana GS, Hsu JL, & Lane RH (2003). Uteroplacental insufficiency increases apoptosis and alters p53 gene methylation in the full-term IUGR rat kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**, R962-R970.
- Phelan JP & Austad SN (1994). Selecting animal models of human aging: inbred strains often exhibit less biological uniformity than F1 hybrids. *J Gerontol* **49**, B1-11.
- Pinzone JJ, Stevenson H, Strobl JS, & Berg PE (2004). Molecular and cellular determinants of estrogen receptor alpha expression. *Mol Cell Biol* **24**, 4605-4612.
- Rae MT, Palassio S, Kyle CE, Brooks AN, Lea RG, Miller DW, & Rhind SM (2001). Effect of maternal undernutrition during pregnancy on early ovarian development and subsequent follicular development in sheep fetuses. *Reproduction* **122**, 915-922.
- Rae MT, Rhind SM, Fowler PA, Miller DW, Kyle CE, & Brooks AN (2002). Effect of maternal undernutrition on fetal testicular steroidogenesis during the CNS androgen-responsive period in male sheep fetuses. *Reproduction* **124**, 33-39.
- Rajaniemi HJ, Petäjä-Repo UE, Lakkakorpi J, Pietilä E, & Aatsinki JT (1992). Molecular structure and function of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor. In *Hormones in Gynecological Endocrinology*, ed. A.R. Genazzani and F. Petraglia, pp. 241-252. The Parthenon Publishing Group, USA.
- Reinisch JM, Simon NG, Karow WG, & Gandelman R (1978). Prenatal exposure to prednisone in humans and animals retards intrauterine growth. *Science* **202**, 436-438.
- Resnik R (2002). Intrauterine growth restriction. *Obstet Gynecol* **99**, 490-496.
- Rhind SM, Rae MT, & Brooks AN (2001). Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction* **122**, 205-214.
- Rivier C, Schwall R, Mason A, Burton L, & Vale W (1991). Effect of recombinant inhibin on gonadotropin secretion during proestrus and estrus in the rat. *Endocrinology* **128**, 2223-2228.

- Robertson DM, Burger HG, & Fuller PJ (2004). Inhibin/activin and ovarian cancer. *Endocr Relat Cancer* **11**, 35-49.
- Roger T. Anatomie comparée des animaux de laboratoire. École Nationale Vétérinaire de Lyon, http://www.vet-lyon.fr/ens/expa/cours/anatcomparee/anatcomp_reinsqenit.htm . 2006.
- Ross AJ & Capel B (2005). Signaling at the crossroads of gonad development. *Trends Endocrinol Metab* **16**, 19-25.
- Rosso P, Donoso E, Braun S, Espinoza R, Fernandez C, & Salas SP (1993). Maternal hemodynamic adjustments in idiopathic fetal growth retardation. *Gynecol Obstet Invest* **35**, 162-165.
- Roy-Clavel E, Picard S, St Louis J, & Brochu M (1999). Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* **180**, 608-613.
- Salas SP, Marshall G, Gutierrez BL, & Rosso P (2006). Time course of maternal plasma volume and hormonal changes in women with preeclampsia or fetal growth restriction. *Hypertension* **47**, 203-208.
- Serono S.A. Infertilité inexpiquée. <http://www.fertility.com> . 2005.
- Sharma TP, Herkimer C, West C, Ye W, Birch R, Robinson JE, Foster DL, & Padmanabhan V (2002). Fetal programming: prenatal androgen disrupts positive feedback actions of estradiol but does not affect timing of puberty in female sheep. *Biol Reprod* **66**, 924-933.
- Silva CC, Groome NP, & Knight PG (1999). Demonstration of a suppressive effect of inhibin alpha-subunit on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *J Reprod Fertil* **115**, 381-388.
- Sokka TA & Huhtaniemi IT (1995). Functional maturation of the pituitary-gonadal axis in the neonatal female rat. *Biol Reprod* **52**, 1404-1409.
- Solberg P. Examination of vaginal smears in the rat. Laboratory animal unit, National Institute of Public Health, Oslo <http://oslovet.veths.no/teaching/rat/oestrus/> . 2004.
- St Louis J, Sicotte B, Beausejour A, & Brochu M (2006). Remodeling and angiotensin II responses of the uterine arcuate arteries of pregnant rats are altered by low- and high-sodium intake. *Reproduction* **131**, 331-339.
- Styne D (2001). Puberty. In *Basic and Clinical Endocrinology*, eds. Greenspan FS & Gardner DG, pp. 547-574. Appleton & Lange/McGraw-Hill, Norwalk, Connecticut.
- Terasawa E & Fernandez DL (2001). Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev* **22**, 111-151.
- Tilbrook AJ & Clarke IJ (2001). Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males. *Biol Reprod* **64**, 735-742.
- Tilbrook AJ, De Kretser DM, & Clarke IJ (1993). Human recombinant inhibin A suppresses plasma follicle-stimulating hormone to intact levels but has no effect on luteinizing hormone in castrated rams. *Biol Reprod* **49**, 779-788.
- Tortora GJ & G.S. (2001a). Le système endocrinien. In *Principes d'anatomie et de physiologie*, ed. John Wiley & Sons I, pp. 597-643. Les éditions du renouveau pédagogique Inc., Saint-Laurent.
- Tortora GJ & G.S. (2001b). Le système reproducteur. In *Principes d'anatomie et de physiologie*, ed. John Wiley & Sons I, pp. 1036-1085. Les éditions du renouveau pédagogique Inc., Saint-Laurent.
- Vaillant C, Chesnel F, Schausi D, Tiffoche C, & Thieulant ML (2002). Expression of estrogen receptor subtypes in rat pituitary gland during pregnancy and lactation. *Endocrinology* **143**, 4249-4258.
- Vandenbosche RC & Kirchner JT (1998). Intrauterine growth retardation. *Am Fam Physician* **58**, 1384.

Walker S, Robison OW, Whisnant CS, & Cassady JP (2004). Effect of divergent selection for testosterone production on testicular morphology and daily sperm production in boars. *J Anim Sci* **82**, 2259-2263.

Wang Y, Walsh SW, & Kay HH (1992). Placental lipid peroxides and thromboxane are increased and prostacyclin is decreased in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* **167**, 946-949.

Warner M, Nilsson S, & Gustafsson JA (1999). The estrogen receptor family. *Curr Opin Obstet Gynecol* **11**, 249-254.

Waterland RA & Jirtle RL (2004). Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition* **20**, 63-68.

Woodall SM, Johnston BM, Breier BH, & Gluckman PD (1996). Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatr Res* **40**, 438-443.

Wu G, Bazer FW, Cudd TA, Meininger CJ, & Spencer TE (2004). Maternal nutrition and fetal development. *J Nutr* **134**, 2169-2172.

Young J, Gougeon A, & Schaison G (1999). Le cycle ovarien. *Médecine/Sciences* **15**, 183-190.

Zambrano E, Rodriguez-Gonzalez GL, Guzman C, Garcia-Becerra R, Boeck L, Diaz L, Menjivar M, Larrea F, & Nathanielsz PW (2005). A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol* **563**, 275-284.

Zanisi M & Messi E (1991). Sex steroids and the control of LHRH secretion. *J Steroid Biochem Mol Biol* **40**, 155-163.

REMERCIEMENTS

Je voudrais en premier lieu remercier ma famille et mes amis pour le soutien et les encouragements reçus tout au long de mes études.

Merci à Eric pour sa présence, son attitude positive, son écoute active, ses précieux conseils et les folies qu'il su mettre dans ma vie.

Je suis très reconnaissante à ma directrice Michèle, qui m'a donné le goût de la recherche et du travail en laboratoire, mais surtout qui a cru en moi et qui me fait confiance depuis le début. Je la remercie de tout mon cœur pour sa disponibilité, sa grande compréhension et son approche humaine dont j'avais bien besoin dans les moments difficiles.

Je tiens également à remercier mes collègues de recherche qui sont devenus des amis, Annie, Karine, Véronique, Marie-Eve, Pierre-André, Benoit, Mylène, Mathieu, Pascale, Ofélie et Jean pour leur joie de vivre et leur support, ainsi que pour tous les bons moments mémorables passés avec eux.

Je voudrais souligner le travail des évaluateurs de mon mémoire, Dr Puttaswamy Manjunath, Dr Lawrence Smith, et ma directrice D^{re} Michèle Brochu qui m'ont permis de voir plus loin et d'améliorer ce manuscrit. Je voudrais de plus remercier tous les autres chercheurs et étudiants qui m'ont aidée dans mes manipulations ou qui m'ont prêté du matériel.

Rien n'aurait été possible sans les organismes subventionnaires suivants : les IRSC, la Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine, et le CRSNG.