



ECOLE DOCTORALE **SSBCV**



**Année 2017-2018 - Demande d'allocation doctorale  
ED Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant (SSBCV) n°549**

**1. Informations administratives :**

Nom de l'encadrant responsable de la thèse : DUITTOZ Anne  
Unité : UMR PRC 7247 - INRA Centre Val de Loire  
Equipe (*si unité multi-équipes*): MiDynNet et NMR  
Filière de rattachement : D  
Email de l'encadrant : [anne.duittoz@inra.fr](mailto:anne.duittoz@inra.fr)

Co-encadrant éventuel (NB : limité à 1 seul co-encadrant(e)) : Massimiliano BELTRAMO ([massimiliano.beltramo@inra.fr](mailto:massimiliano.beltramo@inra.fr))

**2. Titre de la thèse :**

**Nouveaux paradigmes pour le contrôle de l'ovulation chez les mammifères : étude chez les équidés.**

**3. Résumé :**

L'insémination artificielle (IA) permet de maîtriser les flux de gènes en élevage et la diversité génétique en conservation des espèces et des races. La maîtrise du moment de l'ovulation permet d'optimiser l'IA et représente une étape cruciale pour la pleine expression des avantages des biotechnologies de la reproduction. Les protocoles classiques de synchronisation de l'ovulation chez les mammifères reposent sur l'utilisation séquentielle de progestagènes et de gonadotropines et/ou d'analogues de la neurohormone Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH). Ces protocoles posent plusieurs problèmes. L'utilisation de gonadotropines interspécifiques comme l'hCG (human Chorionic Gonadotropin) ou la PMSG/eCG (Pregnant Mare Serum gonadotropine/equine Chorionic Gonadotropin) induisent l'apparition d'anticorps qui réduisent voire bloquent les effets du traitement lors de répétitions. L'utilisation d'analogues de GnRH est délicate à mettre en place car si la stimulation est trop forte, cela peut conduire à un effet inverse et à un échec de fertilité. Dans ces méthodes l'étage hypothalamique de contrôle de l'ovulation est court-circuité produisant des stimulations supra-physiologiques. Par ailleurs, il y a une remise en cause sociétale de l'utilisation d'hormones. La révélation des conditions des animaux utilisés pour l'obtention de certaines hormones comme la PMSG, a entraîné un rejet massif de ces pratiques dans les pays Européens. Il est donc important de proposer de nouvelles solutions qui soient acceptables d'un point de vue éthique et qui ne présentent pas les inconvénients biotechnologiques soulignés plus haut.

Chez les mammifères, le modèle couramment accepté d'induction de l'ovulation prévoit une augmentation de la sécrétion de GnRH qui passe d'un mode de sécrétion pulsatile à un mode continu. Cela génère un pic pré-ovulatoire de GnRH, qui va entraîner un pic de sécrétion de l'hormone hypophysaire gonadotrope Luteinizing Hormone (LH) responsable de la maturation du follicule et de l'ovulation. L'initiation du pic pré-ovulatoire de GnRH est provoquée par l'action d'un neuropeptide hypothalamique, la kisspeptine (Kp). Néanmoins ce modèle ne correspond pas à ce qui est observé chez d'autres espèces de mammifères à ovulation provoquée. Chez l'alpaga et plus globalement dans

le groupe des camélidés, l'ovulation est induite lors de l'accouplement par un facteur présent dans le liquide séminal : le beta-Nerve Growth Factor ( $\beta$ -NGF) qui va stimuler la sécrétion de GnRH.

Notre hypothèse de travail est que chez les espèces à ovulation spontanée le système à Kp jouerait un rôle principal dans le contrôle de l'ovulation, mais que le système impliquant le  $\beta$ -NGF serait toujours présent et fonctionnel.

Le cas particulier de l'espèce équine offre un modèle d'étude intéressant. En effet, chez cette espèce, la Kp est bien efficace pour stimuler la sécrétion de LH et FSH (Follicle Stimulating Hormone), mais inefficace pour induire l'ovulation (Decourt et al., 2016, Duittoz et al., 2017). L'espèce équine, bien qu'étant classée dans les espèces à ovulation spontanée, présente des caractéristiques qui suggèrent qu'elle puisse avoir un statut intermédiaire. Dans ce cas les deux systèmes pourraient jouer un rôle complémentaire. Nous allons tester cette hypothèse *in vitro* et *in vivo* utilisant de combinaisons de traitements pharmacologiques agissant sur le système à Kp et sur la signalisation par le  $\beta$ -NGF.

Nous proposons deux axes pour le travail de thèse. Le premier axe aura pour objectif d'identifier les mécanismes centraux d'action du  $\beta$ -NGF permettant d'aboutir à l'ovulation car ils restent inconnus, mais nous avons des éléments qui suggèrent l'implication du microenvironnement glial des neurones à GnRH. Un deuxième objectif de cet axe sera d'étudier les interactions à niveaux cellulaires entre Kp et  $\beta$ -NGF pour établir si les deux systèmes agissent en synergie ou indépendamment.

Le deuxième axe se focalisera sur les approches *in vivo* en particulier sur l'espèce équine et aura pour objectif d'évaluer des nouvelles méthodes pour induire l'ovulation chez la jument basée sur la stimulation avec le  $\beta$ -NGF et/ou le C6, un analogue de la Kp avec un meilleur profil pharmacologique.

#### *Originalité du projet*

Les méthodes de contrôle de la reproduction disponibles sont ciblées sur la modulation de l'hypophyse (GnRH et analogues), de l'ovaire (eCG et  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) ou sur un rétrocontrôle multiple exercé par les stéroïdes sexuels. Le manque des méthodes qui ciblent spécifiquement l'étage hypothalamique est dû à l'absence, jusqu'à très récemment, de cibles bien définies. La découverte de l'action stimulatrice de la Kp sur les neurones à GnRH a permis d'identifier une cible très importante qui est maintenant bien validée au niveau scientifique. Par ailleurs, la possibilité de contrôler la reproduction par la manipulation du microenvironnement neuronal à travers l'utilisation du  $\beta$ -NGF n'a jamais été explorée jusqu'à présent. Enfin l'intégration de la réponse à ces deux systèmes qui agissent directement sur le neurone à GnRH ou indirectement sur son microenvironnement glial n'est pas connue.

L'ensemble des études proposés pourraient mettre en cause la vision actuelle du contrôle de l'ovulation chez les mammifères et mener à élaborer un nouveau paradigme.

## **4. Résumé en anglais :**

### **New paradigms for the induction of ovulation - application to the equine species**

Artificial insemination (AI) allows managing gene flux and genetic diversity in domestic animal and is important in assisting species and breed conservation. Timely induction of ovulation permits AI optimization and is an essential step to take full advantage of reproduction biotechnology. In mammals, classical protocols to synchronize ovulation imply the combined use of progestogen and gonadotrophins and/or analogs of the neuro-hormone Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH). These protocols have drawbacks. The use of interspecific gonadotrophins such as hCG (human Chorionic Gonadotropin) or the PMSG/eCG (Pregnant Mare Serum gonadotropine/equine Chorionic Gonadotropin) triggers the production of antibodies that reduce or block the effect of subsequent treatments. The administration of GnRH is difficult because an excessive stimulation could induce the opposite effect with fertility reduction. These methods shortcut the hypothalamic control triggering a supra-physiological stimulation of the system. On the other hand, the disclosure of the conditions of animals used for the production of hormones such as PMSG has induced in Europe a mass opposition to such methods. Therefore, it is important to find solutions acceptable from the ethical point of view and voided of the drawbacks mentioned above.

In mammals, the current hypothesis on ovulation induction contemplates an increase of GnRH secretion with a transition from pulse release to continuous secretion. This will lead to a GnRH surge followed by a Luteinizing Hormone (LH) surge responsible for oocyte maturation and ovulation. GnRH surge is elicited by the hypothalamic neuropeptide kisspeptin (Kp). However, this model does not fit to mammalian species characterized by induced ovulation. In the alpaca, and more generally in the camelids, ovulation is triggered during copulation by a factor present in the seminal plasma that increases GnRH secretion: the beta-Nerve Growth Factor ( $\beta$ -NGF).

Our working hypothesis is that although in species with spontaneous ovulation the Kp system plays a predominant role in ovulation control, nevertheless the  $\beta$ -NGF system is still present and functional.

The special case of the horse offers an interesting model. In this species, the Kp is capable of stimulating LH and FSH (Follicle Stimulating Hormone) secretion, but not to induce ovulation (Decourt et al., 2016, Duittoz et al., 2017). The horse, even if considered as a species with spontaneous ovulation, has features suggesting an intermediate status. In this case the two systems could play a complementary role. We will test this hypothesis *in vitro* and *in vivo* using a combination of pharmacological treatments acting on Kp and/or on  $\beta$ -NGF system.

Two lines of research will develop during the thesis. The goal of the first research line is the identification of the central mechanisms underpinning  $\beta$ -NGF induced ovulation. These mechanisms are presently unknown, but we have experimental evidence suggesting the involvement of the glial microenvironment of GnRH neurons. In addition it will be studied the cellular interactions between Kp and  $\beta$ -NGF to establish if the two systems work synergistically or independently.

The second line of research will focus on *in vivo* approaches on the horse with the aim of evaluating new methods to induce ovulation based on the stimulation with the  $\beta$ -NGF and/or the C6, a Kp analog with an improved pharmacological profile.

#### Project originality

Available methods to control reproduction target pituitary gland (GnRH and analogues), ovary (eCG and  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) or are based on multiple feedback effects of sexual steroids. The absence of method targeting the hypothalamic level is due to the absence, until very recently, of well defined targets. The discovery of Kp stimulating action on GnRH neurons allowed the identification of the first well defined, and at present well validated, target. On the other hand, the possibility of controlling reproduction by manipulating neuronal microenvironment using  $\beta$ -NGF has not been explored yet. Finally, the integration of the response of these two systems acting directly on GnRH neurons or indirectly on its glial microenvironment is completely unknown.

All together, the proposed studies may challenge the actual hypothesis of ovulation control in mammals and lead to the elaboration of a new working hypothesis.