

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Influence hormonale sur l'activité de follicules ovariens de brebis en culture

RENARD, Dominique

Award date:
1991

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Influence hormonale sur l'activité de follicules ovariens de brebis en culture.

RENARD Dominique

Résumé

Le but premier de ce mémoire était d'améliorer la technique de culture *in vitro* des follicules ovariens de brebis mise au point précédemment au laboratoire. Pour ce faire, nous avons testé trois températures de transport des ovaires (4, 20 et 38°C). L'objectif suivant était l'étude de l'effet de stimulations par les gonadotropines hypophysaires (LH, FSH) sur les sécrétions stéroïdiennes des follicules en culture. Pour chaque gonadotropine nous avons testé différentes concentrations. Nous avons aussi comparé les stimulations successives par les 2 gonadotropines.

Les expériences s'étant déroulées sur plusieurs mois, nous avons également pu mettre en évidence les conséquences de l'anoestrus sur la stéroïdogenèse.

Nous aboutissons aux conclusions suivantes:

- une température de transport des ovaires de 4°C semble influencer favorablement la survie histologique et fonctionnelle des follicules ovariens en culture.
- la FSH stimule les 3 grandes étapes de la stéroïdogenèse, mais a un effet plus marqué sur la sécrétion d'oestradiol. Une concentration de 15 ng/ml permet de bien visualiser cet effet.
- la LH stimule la production d'androstènedione. Une concentration de 10 ng/ml donne des résultats significatifs.
- une double stimulation (FSH puis LH) se traduit par une production d'oestradiol puis d'androstènedione. Aucun effet cumulé n'est observé.
- la double stimulation inverse (LH puis FSH) entraîne une production d'androstènedione, précurseur de l'oestradiol, synthétisé alors en quantité plus importante suite à l'effet de la FSH.
- l'anoestrus est caractérisé par une réduction de l'activité aromatasique, ce qui provoque une accumulation d'androstènedione et une diminution de la production d'oestradiol.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Septembre 1991

Promoteur : R. Paquay

Co-promoteur : J.-L. Bister

Au seuil de ce travail, je tiens à témoigner mon entière reconnaissance envers

mon promoteur, le Professeur R. Paquay, pour l'accueil qu'il m'a réservé au sein du département de Physiologie Animale ainsi que pour la façon avec laquelle il m'a aidée à mener à bien ce mémoire,

le Docteur Jean-Loup Bister pour l'aide qu'il m'a fournie tout au long de cette année et pour l'intérêt qu'il a porté à mes recherches,

les départements d'Histologie-Embryologie et d'Immunologie,

Bénédicte, pour son appui scientifique, sa grande disponibilité et l'ambiance agréable qu'elle a créée ,

Benoît, pour son aide à la réalisation technique de ce travail et pour son soutien moral au cours de ces années,

Catherine, pour ses conseils judicieux,

mes parents, pour leurs encouragements et leur confiance, sans lesquels je n'aurais pu mener ces années d'étude.

***TABLE
DES MATIERES***

Introduction

I^{ère} Partie : Revue Bibliographique

1. Structure histologique de l'ovaire.....	1
1.1. Description générale	1
1.2. Stades folliculaires	1
1.2.1. Développement folliculaire.....	1
1.2.1.1. Follicules primordiaux.....	1
1.2.1.2. Follicule primaire.....	2
1.2.1.3. Follicule secondaire.....	2
1.2.1.4. Follicule tertiaire.....	2
1.2.1.5. Follicule antral.....	3
1.2.2. Atrésie folliculaire.....	3
2. Ovogenèse.....	3
3. Croissance folliculaire.....	4
3.1. Folliculogenèse basale.....	4
3.2. Folliculogenèse tonique.....	5
3.2.1. Périodicité de la croissance folliculaire terminale.....	5
3.2.2. Etapes de la croissance folliculaire terminale.....	5
4. Profils hormonaux au cours du cycle.....	6
4.1. Gonadotropines.....	7
4.1.1. Structure.....	7
4.1.2. Mode d'action.....	7
4.1.3. Emission au cours du cycle.....	8
4.1.4. Contrôle de la sécrétion des gonadotropines.....	8
4.2. Hormones stéroïdiennes.....	9
4.2.1. Stéroïdogénèse.....	9
4.2.2. Mode d'action.....	10
4.2.3. Emission au cours du cycle.....	11
5. Contrôle hormonal du développement et de la différenciation du follicule a antrum	11
5.1. Folliculogenèse basale.....	11
5.2. Folliculogenèse tonique.....	12
5.2.1. Recrutement.....	12
5.2.2. Sélection et dominance.....	13
5.3. Atrésie fonctionnelle.....	17
6. Le fluide folliculaire.....	18

IIème Partie : Recherches Personnelles

Objectifs	19
Matériel et Méthodes	
1. Matériel	20
1.1. Préparation du milieu de culture	20
1.1.1. Composition	20
1.1.2. Mesure du pH	20
1.1.3. Filtration.....	20
1.1.4. Mesure de la pression osmotique.....	21
1.2. Matériel biologique.....	21
1.2.1.Récolte et transport	21
1.2.2.Dissection.....	21
2. Méthodes	22
2.1. Technique de culture in vitro.....	22
2.2. Technique histologique	22
2.2.1. Mode opératoire	22
2.2.2. Interprétation.....	24
2.3. Dosages hormonaux	24
2.3.1. Principe du dosage radioimmunologique.....	24
2.3.2. Calcul des résultats.....	25
2.3.3. Dosage de la progestérone	25
2.3.4. Dosage de l'oestradiol	26
2.3.5. Dosage de l'androstènedione	27
2.4. Analyses statistiques	27
Résultats et Discussion	
1. Rappel des objectifs.....	28
2.Préliminaire	28
3. Influence de la température de transport	28
3.1. Plan expérimental.....	28
3.2. Résultats.....	29
3.3. Discussion.....	30
3.4. Conclusion	31
4. Stimulations par les gonadotropines hypophysaires.....	31
4.1. Influence de stimulations par la FSH	32
4.1.1. Plan expérimental	32
4.1.2.Résultats	32
4.1.3. Discussion	33
4.1.4. Conclusion.....	35

4.2. Influence de stimulations par la LH.....	35
4.2.1. Plan expérimental	35
4.2.2. Résultats.....	35
4.2.3. Discussion	36
4.2.4. Conclusion.....	37
5. Influence de stimulations successives.....	37
5.1. Stimulation par FSH puis LH.....	38
5.1.1. Plan expérimental	38
5.1.2. Résultats.....	38
5.1.3. Discussion	39
5.1.4. Conclusion.....	39
5.2. Stimulation par LH puis FSH.....	39
5.2.1. Plan expérimental	39
5.2.2. Résultats	40
5.2.3. Discussion	40
5.2.4. Conclusion.....	41
6. Comparaisons des sécrétions stéroïdiennes en période d'oestrus et d'anoestrus	41
6.1. Résultats.....	41
6.2. Discussion.....	42
6.3. Conclusion.....	42
Conclusion Générale.....	43
Bibliographie	

INTRODUCTION

Les mécanismes de croissance et de maturation folliculaire sont à l'heure actuelle l'objet de nombreuses recherches scientifiques. De plus, la fécondation in vitro, technique de plus en plus répandue chez nombre d'espèces, est loin d'être au point en ce qui concerne les ovins.

Différentes méthodes sont utilisées en vue de réaliser l'étude détaillée du fonctionnement folliculaire; les plus courantes étant les techniques d'endoscopie et les cultures de cellules.

Les techniques d'endoscopie permettent une étude morphologique des follicules in vivo, mais n'autorisent pas une analyse individuelle des follicules. Ceci peut poser problème car des follicules morphologiquement identiques peuvent présenter des capacités stéroïdogéniques totalement différentes.

Les cultures séparées de cellules folliculaires, thécales ou granulosales, ne permettent pas, quant à elles, l'interaction entre ces deux types cellulaires nécessaire au bon déroulement de la stéroïdogénèse.

En vue d'une étude ultérieure de la dynamique de sécrétion de follicules, à un stade connu et fixé de leur développement, ainsi que de l'effet précis des hormones gonadotropes, une technique de culture in vitro de follicules entiers a été mise au point au laboratoire. Cette technique permet de maintenir les follicules dans un état physiologique et fonctionnel satisfaisant.

Dans un premier temps, il nous a semblé opportun d'essayer d'améliorer la technique en choisissant une température de transport des ovaires favorisant la survie des follicules in vitro.

Dans un second temps, il était nécessaire d'étudier la cinétique des sécrétions stéroïdiennes de follicules soumis à diverses stimulations gonadotropes, avant de passer à une étude plus précise suivant le stade de développement du follicule.

Ce travail est composé de deux parties ; une revue bibliographique résumant les connaissances actuelles dans le domaine étudié suivie de la description des recherches personnelles effectuées.

***REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE***

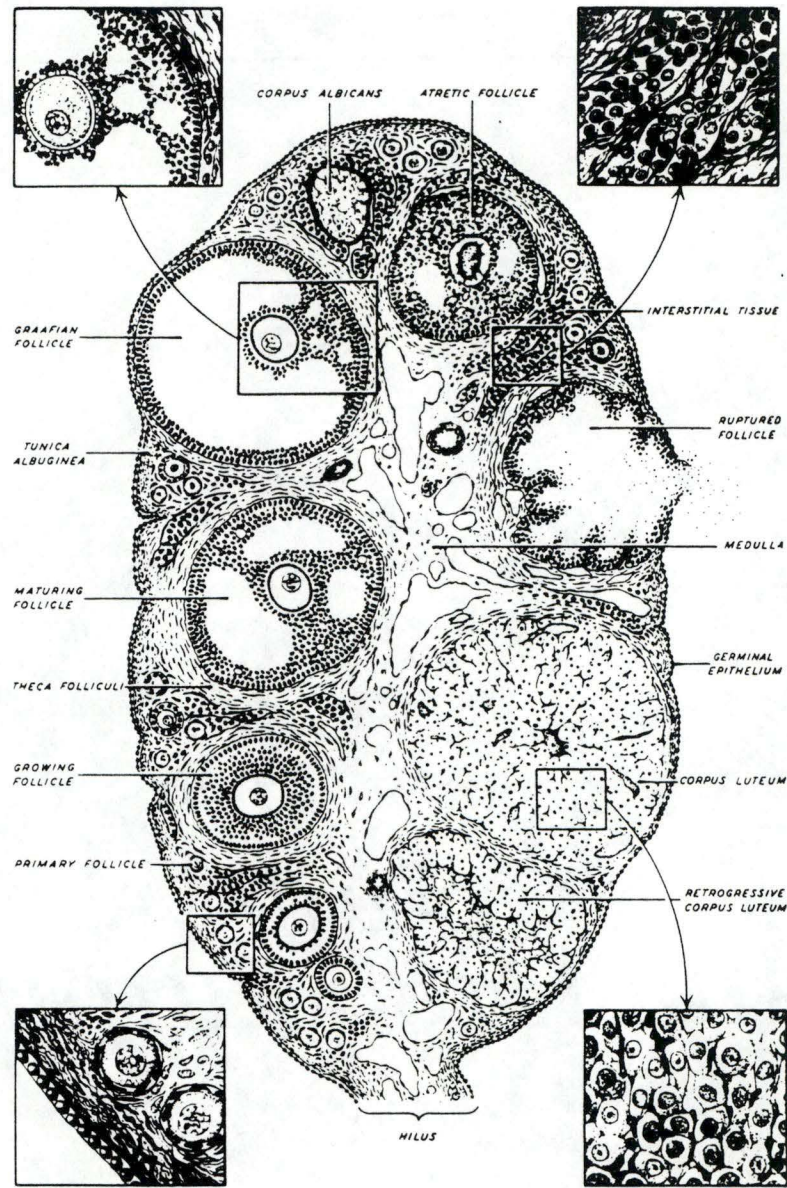


FIGURE 1 : Composition détaillée de l'ovaire de mammifère (Adler,1981).

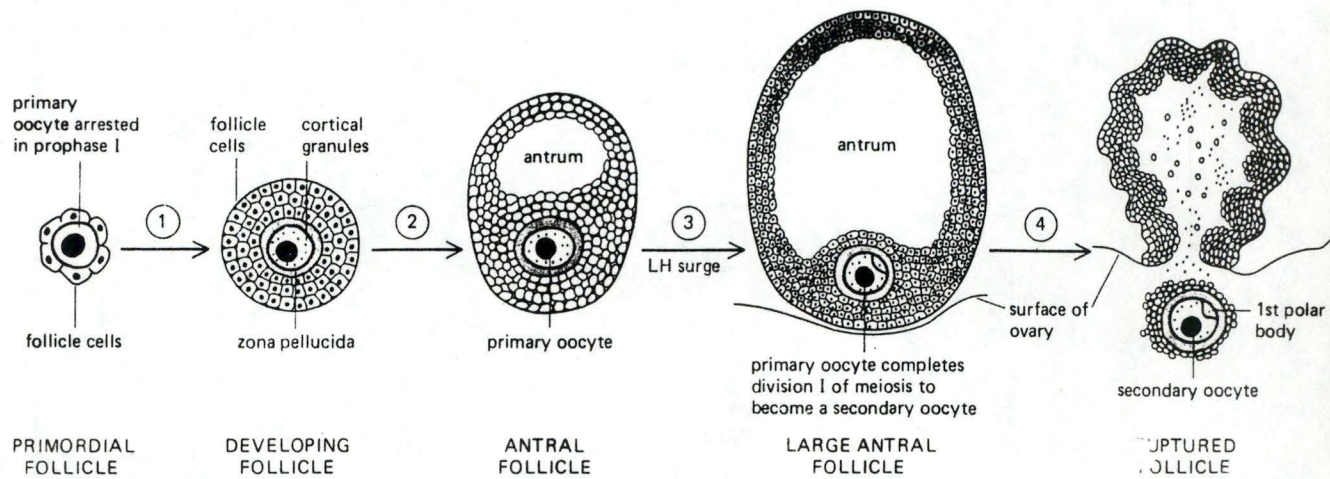


FIGURE 2 : Les différents stades de développement folliculaire (ALBERTS et al., 1990).

1. STRUCTURE HISTOLOGIQUE DE L'OVAIRE

L'ovaire est un organe de forme ovoïde mesurant 1 cm de largeur sur 3 cm de longueur pour un poids de 3 à 15 gr chez la brebis.

Cet organe présente un double rôle, la production des gamètes femelles et la sécrétion des hormones sexuelles.

1.1 DESCRIPTION GENERALE

L'ovaire est constitué de trois zones principales : la tunica albuginea, le cortex et la médulla (figure 1).

La tunica albuginea est une couche de tissu conjonctif fibreux qui entoure le cortex. Elle est recouverte par une membrane basale et un épithélium externe, cubique ou pavimenteux simple, l'épithélium péritonéal.

Le cortex constitue la périphérie de l'ovaire. C'est dans cette région que prédominent les follicules ovariens à divers stades de maturation, séparés par un stroma conjonctif riche en fibres réticuliniques.

La médulla occupe le centre de l'ovaire et est constituée d'un tissu conjonctif lâche contenant des vaisseaux sanguins et lymphatiques, des nerfs et quelques faisceaux de fibres musculaires lisses (Junqueira et al., 1986).

1.2. STADES FOLLICULAIRES

Lors de son évolution le follicule passe par différents stades : primordial, primaire, secondaire, tertiaire et antral (figure 2).

1.2.1 Développement folliculaire

1.2.1.1. Follicules primordiaux

Les follicules primordiaux apparaissent dans l'ovaire déjà au cours de la vie foetale et perdent toute capacité de multiplication dès avant la naissance. Leur constitution histologique est simple : l'ovocyte est entouré d'une assise de cellules folliculeuses aplaties.



FIGURE 3 : Structure de la zone pellucide. G : cellules granulosales; ZP : zone pellucide; O : ovocyte (Hafez, 1980).

Lorsqu'il entame son développement, le follicule primordial passe d'abord par le stade "follicule primaire" qui présente quelques caractéristiques particulières.

1.2.1.2. Follicule primaire

L'ovocyte, plus volumineux, est entouré d'une assise de cellules folliculeuses devenues cubiques. Une membrane basale, la membrane de Slaviansky, le sépare du stroma environnant (Junqueira et al., 1986).

Si le follicule poursuit son évolution, il passe ensuite par le stade "follicule secondaire"

1.2.1.3. Follicule secondaire

Entre l'ovocyte et les cellules folliculeuses apparaît la zone pellucide (couche acellulaire contenant des glycoprotéines et de l'acide hyaluronique), probablement élaborée par l'ovocyte et les cellules folliculeuses.

Par divisions mitotiques, les cellules folliculeuses forment plusieurs assises, ce qui constitue une couche granuleuse : la granulosa. De nombreuses "gap" et "tight junctions" existent entre ces cellules. L'ovocyte présente des microvilli qui pénètrent dans la zone pellucide ; les cellules de la granulosa forment des prolongements qui traversent la zone pellucide (figure 3) et entrent en contact avec l'ovocyte via des "gap junctions" (Rhodin, 1974).

Simultanément, le stroma entourant immédiatement le follicule se différencie pour former les thèques folliculaires interne et externe.

1.2.1.4. Follicule tertiaire

Au stade de développement suivant, l'ovocyte est entouré de la zone pellucide puis de la granulosa dont les cellules augmentent en nombre et en taille.

Les thèques sont différenciées. La thèque interne, vascularisée, est constituée de cellules cubiques présentant les mêmes caractéristiques ultrastructurales que les cellules productrices de stéroïdes. La thèque externe est faite principalement de tissu conjonctif et ne possède pas de fonction endocrine ; elle a surtout un rôle de protection.

Des accumulations liquidiennes riches en acide hyaluronique apparaissent entre les cellules granulosales ; ces espaces sont appelés corps de Call et Exner (Rhodin, 1974 ; Junqueira et al., 1986).

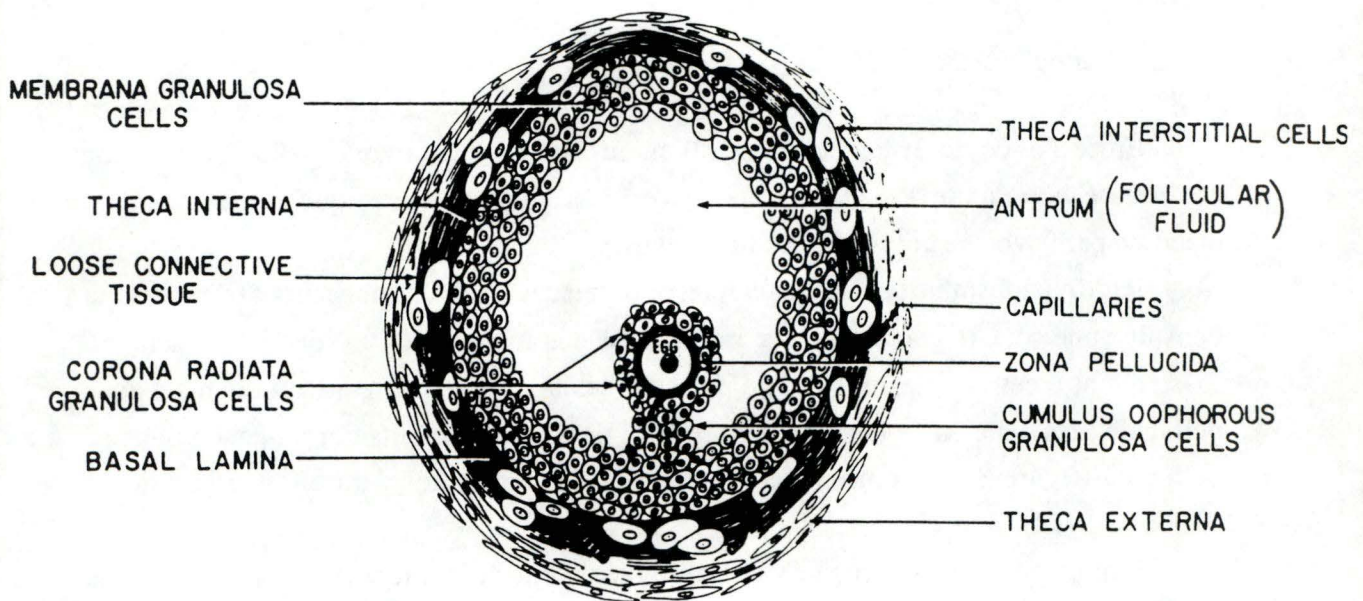


FIGURE 4 : Structure histologique d'un follicule de De Graaf (Erickson et al., 1985).

1.2.1.5. Follicule antral

Le stade final permettant au follicule d'atteindre éventuellement sa maturation et l'ovulation s'appelle "follicule antral" ou "follicule de De Graaf". Ce follicule de De Graaf (figure 4) apparaît comme une vésicule translucide faisant protrusion à la surface de l'ovaire.

Les cavités contenant le fluide folliculaire confluent pour former finalement une seule cavité appelée antrum folliculaire.

Les cellules granulosales se multiplient plus rapidement à un pôle du follicule, formant le cumulus oophorus. Autour de l'ovocyte, refoulé au niveau du cumulus oophorus, les cellules granulosales forment la corona radiata qui accompagne l'ovocyte lors de l'ovulation (Rhodin, 1974).

1.2.2. Atrésie folliculaire

Parmi tous les follicules entamant leur développement, très peu atteignent l'ovulation ; la plupart (plus de 99%) subissent un processus involutif, l'atrésie, qui peut se produire à n'importe quel stade du développement (Bister, 1989).

L'atrésie débute par la mort de l'ovocyte, suivie de la dégénérescence des cellules granulosales (pycnose du noyau, arrêt des divisions mitotiques puis dégénérescence). La granulosa se détache de la membrane basale, les cellules se dissocient et envahissent le centre du follicule et la thèque interne s'hypertrophie (Webb et Gauld, 1984 ; Erickson et al., 1985).

2. OVOGENESE

L'ovogenèse débute très tôt au cours du développement embryonnaire (du 35^{ème} au 90^{ème} jour chez la brebis) et constitue le stock de follicules primordiaux présent dès la naissance. Ces follicules primordiaux proviennent de l'épithélium germinatif de la zone corticale et sont caractérisés par une seule couche de cellules granulosales autour d'un ovocyte de I^{er} ordre (Derivaux et Ectors, 1986). Cet ovocyte dérive de la division réductionnelle de l'ovogonie. Sa division reste bloquée en fin de prophase, au stade diplotène, qui constitue le stade de stockage (Hafez, 1980).

Les gonadotropines ne sont impliquées ni dans la multiplication ovogoniale ni dans la prophase méiotique. En effet, l'hypophysectomie d'un foetus de brebis ne provoque aucun changement qualitatif de l'ovogenèse (Mauléon, 1973).

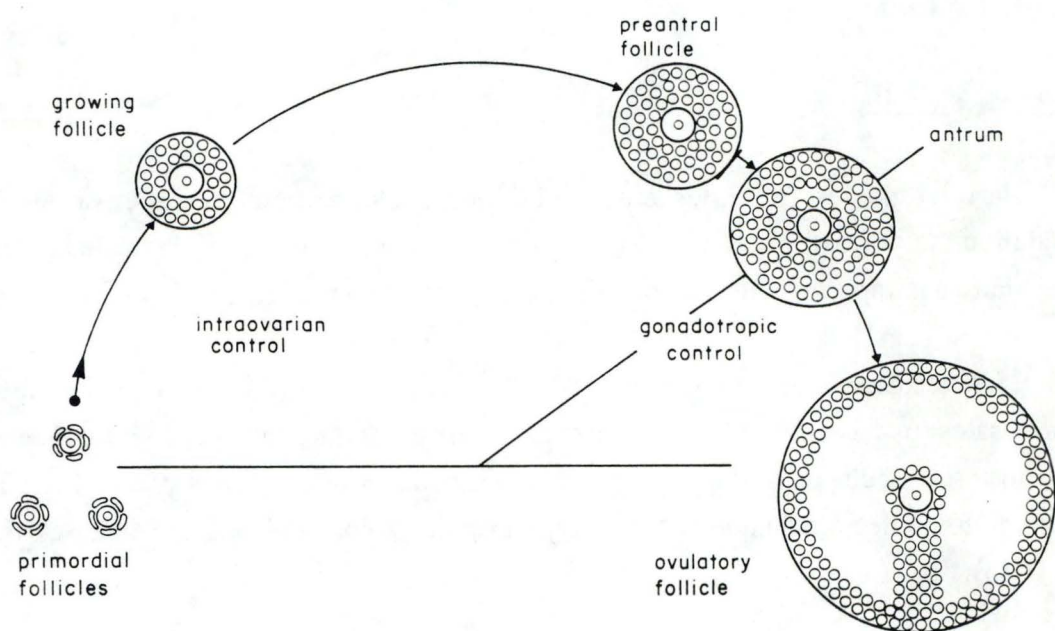


FIGURE 5 : Les deux phases de la croissance folliculaire (Hafez, 1980).

Il existe un écart considérable entre la réserve de départ en ovocytes (200 000 à 300 000 chez l'agnelle) et le petit nombre (250 à 500) qui parviendra à ovulation (Derivaux et Ectors, 1986).

3. CROISSANCE FOLLICULAIRE

Régulièrement, les follicules s'échappent de la population de follicules primordiaux et entament des processus de croissance et de développement, passant par les différentes étapes décrites précédemment.

Suite aux travaux de Mc Neilly et al. (1986) et Driancourt et al. (1987), on distingue deux types de folliculogénèses l'une basale et l'autre tonique. Cette distinction se base sur le contrôle de la croissance et sa vitesse, mais suit aussi un critère morphologique (diamètre du follicule inférieur ou supérieur à 2 mm). Le développement des follicules au-delà de cette taille requiert en effet l'intervention des gonadotropines (figure 5).

3.1. FOLLICULOGENESE BASALE

La folliculogénèse basale concerne les follicules de taille inférieure à 2 mm, c'est à dire du stade primordial au début du stade antral. Elle est continue, de nouveaux follicules entament leur croissance régulièrement.

Le déclenchement de ce processus est encore mal connu. Deux hypothèses furent émises quant au stimulus initial de la croissance et de la différenciation.

Le stimulus proviendrait de l'ovocyte ou bien des cellules granulosales (Cahill, 1984). Il s'agit probablement d'un phénomène endogène de l'ovaire s'effectuant par l'intermédiaire de cybernines (Bister, 1989).

L'hypophysectomie n'entrave pas cette première phase du développement folliculaire bien que l'on constate un ralentissement de croissance. La folliculogénèse basale est donc indépendante des gonadotropines (Dufour et al., 1979).

L'augmentation de la taille folliculaire est due dans un premier temps à une augmentation du nombre de cellules, puis à l'accumulation concomitante du fluide folliculaire. Peu après la formation de l'antrum, les follicules entrent dans une phase de croissance rapide, le taux de division des cellules granulosales étant maximal pour un diamètre d'un mm environ (Cahill, 1984).

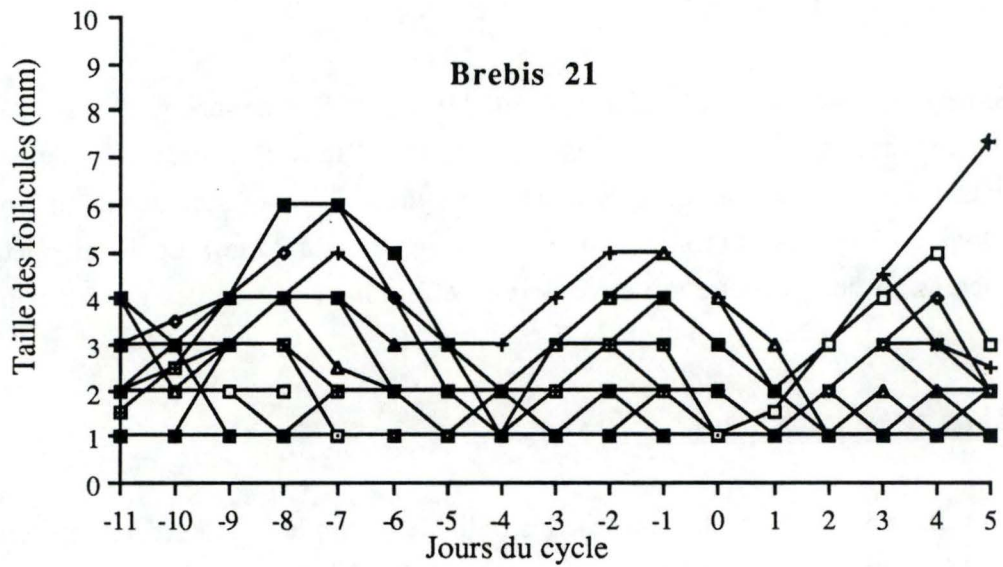


FIGURE 6 : Les 3 vagues de croissance folliculaire (Noël et al., 1991)

3.2. FOLLICULOGENESE TONIQUE

La croissance folliculaire tonique ou terminale nécessite la présence des gonadotropines et concerne les follicules à antrum ayant atteint 2 mm de diamètre. Le follicule continue à augmenter de taille bien que la multiplication des cellules granulosales soit en diminution progressive. Les divisions mitotiques sont quasiment nulles dans le follicule préovulatoire (Cahill, 1984).

3.2.1. Périodicité de la croissance folliculaire terminale

Le cycle oestral, de 17 jours chez la brebis, est divisé en une phase lutéale durant laquelle un niveau élevé de progestérone est maintenu par le corps jaune jusqu'à la lutéolyse et en une phase folliculaire caractérisée par une faible émission de progestérone et un taux d'oestradiol important. La première phase dure environ 13 jours, soit environ 2/3 du cycle.

Tout au long du cycle oestral chaque ovaire présente de nombreux follicules antraux à sa surface, mais à la fin du cycle seuls un ou deux ovulent (Driancourt et Cahill, 1984).

Pendant la phase lutéale se développent deux vagues de croissance de follicules qui peuvent atteindre 4 à 7 mm puis régressent. Ce haut degré d'activité folliculaire de la phase lutéale, commun aux ovins et aux bovins, démontre que des follicules de taille préovulatoire peuvent se développer en présence de niveaux hormonaux très différents de ceux de la phase folliculaire (Driancourt et al., 1984 ; Jacques, 1989). Bien que ces follicules subissent un développement considérable, ils ne peuvent pas être transformés en corps jaunes pleinement fonctionnels quand ils sont exposés à une dose ovulatoire de LH (Mc Natty et al., 1981).

Une troisième vague de croissance se déroule pendant la phase folliculaire, seuls ces follicules sont capables d'ovuler (figure 6).

3.2.2. Etapes de la croissance folliculaire terminale

Deux processus distincts dirigeant le développement en follicules préovulatoires sont considérés :

-le recrutement qui s'adresse à tous les follicules que la croissance basale a amené à un diamètre de l'ordre de 2 mm. Ce recrutement s'effectue à trois moments privilégiés du cycle : peu après l'ovulation, en pleine phase lutéale puis aux environs du début de la

lutéolyse. Tous les follicules sains excédant 2 mm au moment de la lutéolyse sont recrutés comme le montre l'étude de la cinétique de croissance individuelle d'un follicule suivi in vivo par marquage à l'encre de Chine (Driancourt et Cahill, 1984).

-la sélection d'une minorité de follicules qui poursuivent leur développement préovulatoire pendant que les autres subissent l'atrésie (Driancourt et Cahill, 1984). Ce n'est pas un processus d'élimination des follicules faibles ou défectifs. Deux hypothèses peuvent expliquer ce mécanisme, la stabilité développementale et l'élimination active.

L'hypothèse de la stabilité développementale préconise que le follicule sélectionné peut échapper à l'atrésie de façon passive de par ses caractéristiques morphologiques et fonctionnelles, étant moins sensible aux influences hormonales conduisant les autres follicules à l'atrésie.

L'hypothèse de l'élimination active suivant laquelle les follicules sélectionnés peuvent exercer une dominance et induire l'atrésie des autres follicules (Di Zerega et al., 1983), ou inhiber leur croissance en supprimant leur réponse aux gonadotropines (Di Zerega et al., 1981). Cette hypothèse est la plus plausible ; des composés pouvant être impliqués dans cette action ont été détectés dans le fluide folliculaire ovin.

Parmi les follicules dominants un faible nombre parviendra à l'ovulation qui représente l'aboutissement de la maturation folliculaire et ovocytaire, tandis que les autres subiront l'atrésie. Les follicules ovulatoires font obligatoirement partie de ceux qui sont sélectionnés au cours de la troisième vague de croissance du cycle, après la lutéolyse.

Le déroulement des processus de recrutement et sélection est strictement dépendant des gonadotropines hypophysaires, la LH (Luteinizing Hormone) et la FSH (Follicle Stimulating Hormone) (pour plus de détails le lecteur se rapportera au point 5.2.).

4. PROFILS HORMONAUX AU COURS DU CYCLE

Le follicule est soumis à toute une série de régulations locales par de nombreux composés capables de contrôler son activité. Certains facteurs tels que l'ocytocine, l'activine, l'inhibine, le LI (Luteinization Inhibitor), le LS (Lutenization Stimulator), sont spécifiques au follicule ; d'autres facteurs, comme les facteurs de croissance (IGF I et II, EGF, FGF, TGF α , TGF β), ont également des actions bien connues sur d'autres tissus.

Dans le cadre de ce travail nous nous limiterons aux cinq hormones principales intervenant dans la régulation de la croissance et de la différenciation des follicules, ainsi

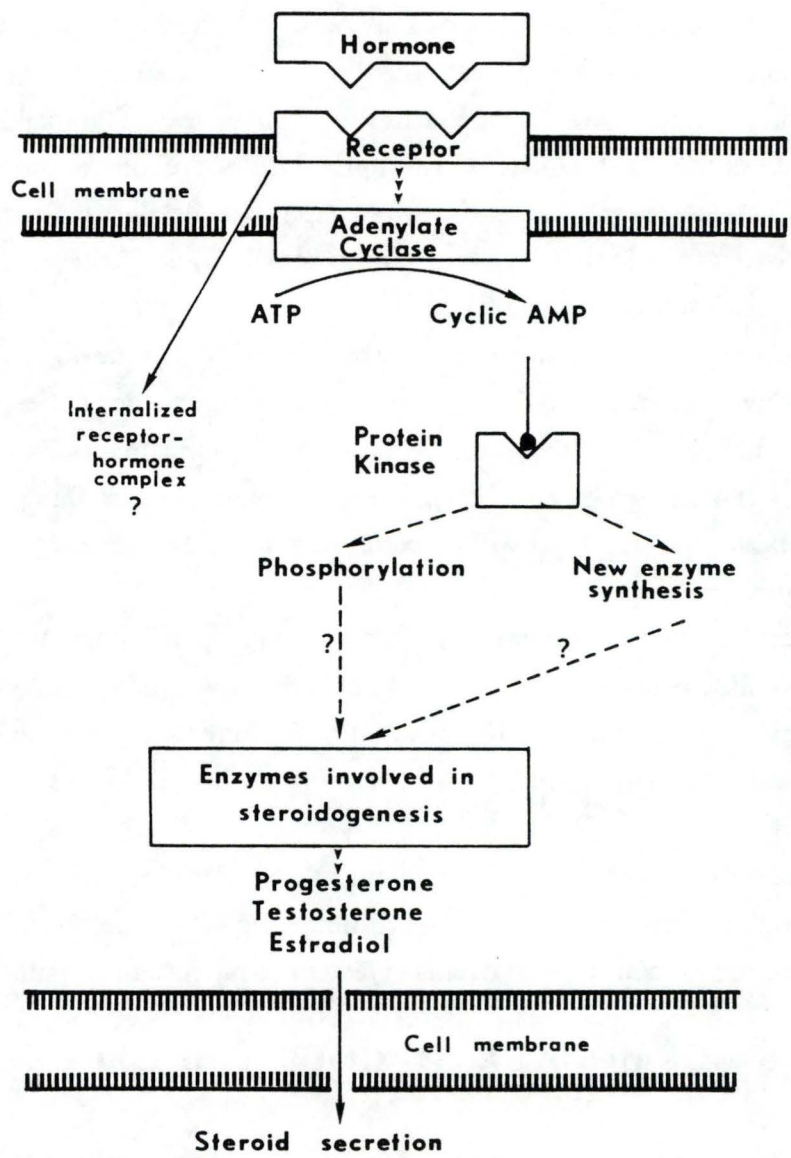


FIGURE 7 : Mode d'action des gonadotropines (Hafez, 1980).

que dans le contrôle du cycle ; soit la FSH et la LH (gonadotropines), la progestérone (P4), l'oestradiol (E2) et l'androstènedione, trois hormones stéroïdiennes.

4.1. GONADOTROPINES

Les rôles exacts de la FSH et de la LH dans la maturation folliculaire restent à approfondir. Néanmoins, on peut leur attribuer un rôle majeur dans la différenciation des cellules granulosales et thécales.

4.1.1. Structure

La LH et la FSH, gonadotropines adéno-hypophysaires, appartiennent à la famille des hormones glycoprotéiques (au même titre que la thyrotropine et la choriogonadotropine). Elles sont constituées par l'assemblage de deux sous-unités α et β . La structure de la sous-unité α est semblable pour les deux et la spécificité biologique et immunologique est portée par la sous-unité β (Ronin, 1989).

Ces hormones diffèrent par leur sous-unité β mais également par leur composition qualitative et quantitative en hydrates de carbone et par leur teneur en acide sialique (Williams, 1972).

4.1.2. Mode d'action

Les glycoprotéines hypophysaires circulent dans le sang sous forme libre et leur demi-vie varie en fonction de la teneur en acide sialique (Derivaux et Ectors, 1986):

	<u>FSH</u>	<u>LH</u>
<u>Acide sialique</u>	5%	2%
<u>Demi-vie</u>	3-4 heures	12-50 minutes

Au niveau de la cellule cible, la liaison au récepteur membranaire spécifique entraîne l'activation de l'adénylate cyclase (figure 7) et, par conséquent, une augmentation du taux intracellulaire d'AMPc par transformation de l'ATP. Le mécanisme précis suivant lequel l'AMPc agit n'est pas complètement élucidé mais il semblerait que l'activation de protéines kinases et la phosphorylation résultant de cette activation soient impliquées (Derivaux et Ectors, 1986 ; Beebe et al., 1989).

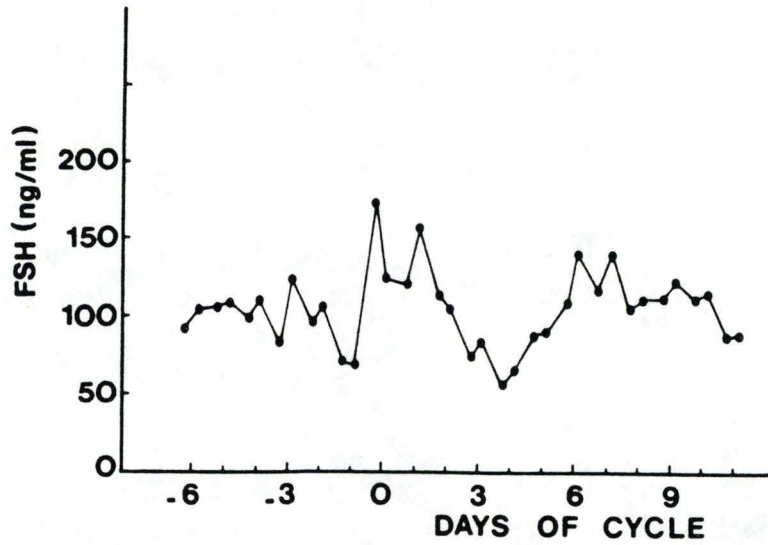


FIGURE 8 : Concentration en FSH durant le cycle oestral (Bister et Paquay, 1983).

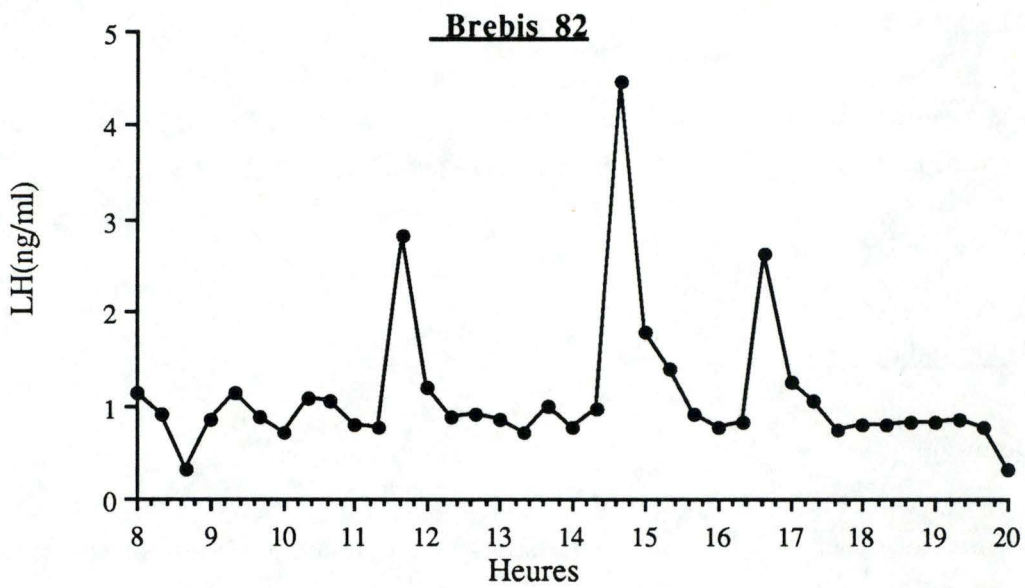


FIGURE 9 : Exemple de sécrétion pulsatile de LH chez la brebis en oestrus (Pierquin, 1991).

Des récepteurs spécifiques à FSH ont été trouvés exclusivement au niveau des cellules de la granulosa des follicules ovariens et des cellules de Sertoli du testicule. Aucune autre cible tissulaire n'a été découverte (Midgley, 1973 : cité par Hsueh et al., 1989 ; Ronin, 1989).

Les petits follicules antraux possèdent des récepteurs à LH au niveau des cellules de la thèque interne tandis que les follicules préovulatoires présentent ces récepteurs au niveau des cellules granulosales et thécales (England et al., 1981). Ces récepteurs se situent également à la surface des cellules interstitielles du cortex ovarien et de la médulla (Ronin, 1989).

4.1.3. Emission au cours du cycle

Les sécrétions moyennes de FSH présentent trois vagues successives (figure 8) au cours du cycle oestral, suivant un rythme endogène de 5 jours. La première vague, au jour 0 du cycle, est composée de deux pics préovulatoires, le premier coïncidant avec le pic de LH et le second apparaissant 30 à 40 heures plus tard (Bister et Paquay, 1983).

La LH est émise de manière pulsatile (figure 9), les pulses peuvent atteindre jusqu'à 5 ng/ml et sa sécrétion reste relativement constante (Bister et Paquay, 1982) tout au long de la phase lutéale. L'amplitude des pulses de LH diminue pendant la phase folliculaire alors que leur fréquence augmente progressivement (Clarke, 1984). Cette augmentation provoque la sommation de la LH circulante qui se traduit par une brusque et nette augmentation appelée pic ou décharge préovulatoire (Bister, 1989). Cette décharge préovulatoire provoque une augmentation de la teneur sanguine qui se maintient pendant environ 12 heures et atteint des valeurs de 5 à 50 ng/ml de plasma (Mandiki, 1991).

4.1.4. Contrôle de la sécrétion des gonadotropines

Le contrôle de la sécrétion des gonadotropines est exercé principalement par la sécrétion de la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) hypothalamique qui, par action sur l'hypophyse, influence synthèse et sécrétion de LH et de FSH. Les sécrétions de GnRH, de LH et de FSH sont affectées par des feed-backs hormonaux provenant de l'ovaire (Clarke, 1984).

La progestérone réduit la fréquence des pulses de LH et augmente leur amplitude probablement via la réduction de la fréquence des pulses de GnRH.

La progestérone est capable de supprimer la maturation folliculaire et l'ovulation par ses effets inhibiteurs sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. De fortes concentrations

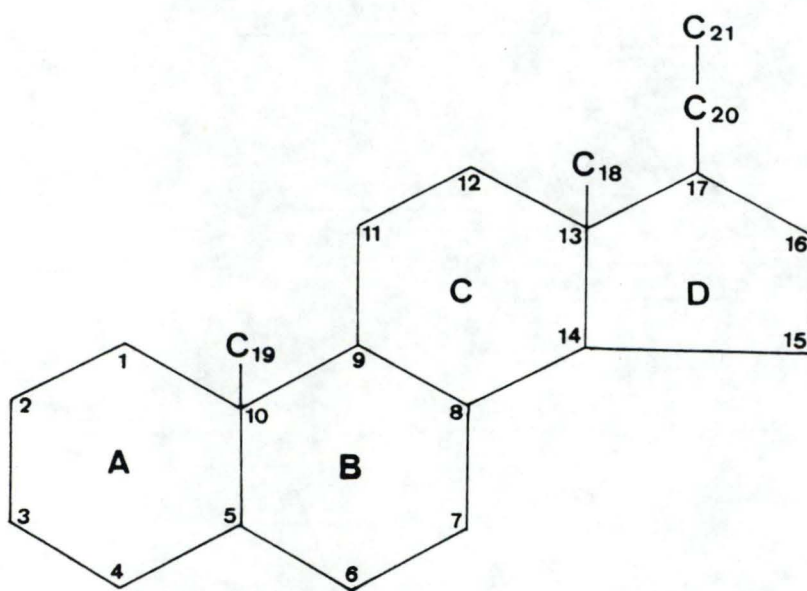


FIGURE 10 : Noyau cycloperhydrophénantrène (Derivaux et Ectors, 1986).

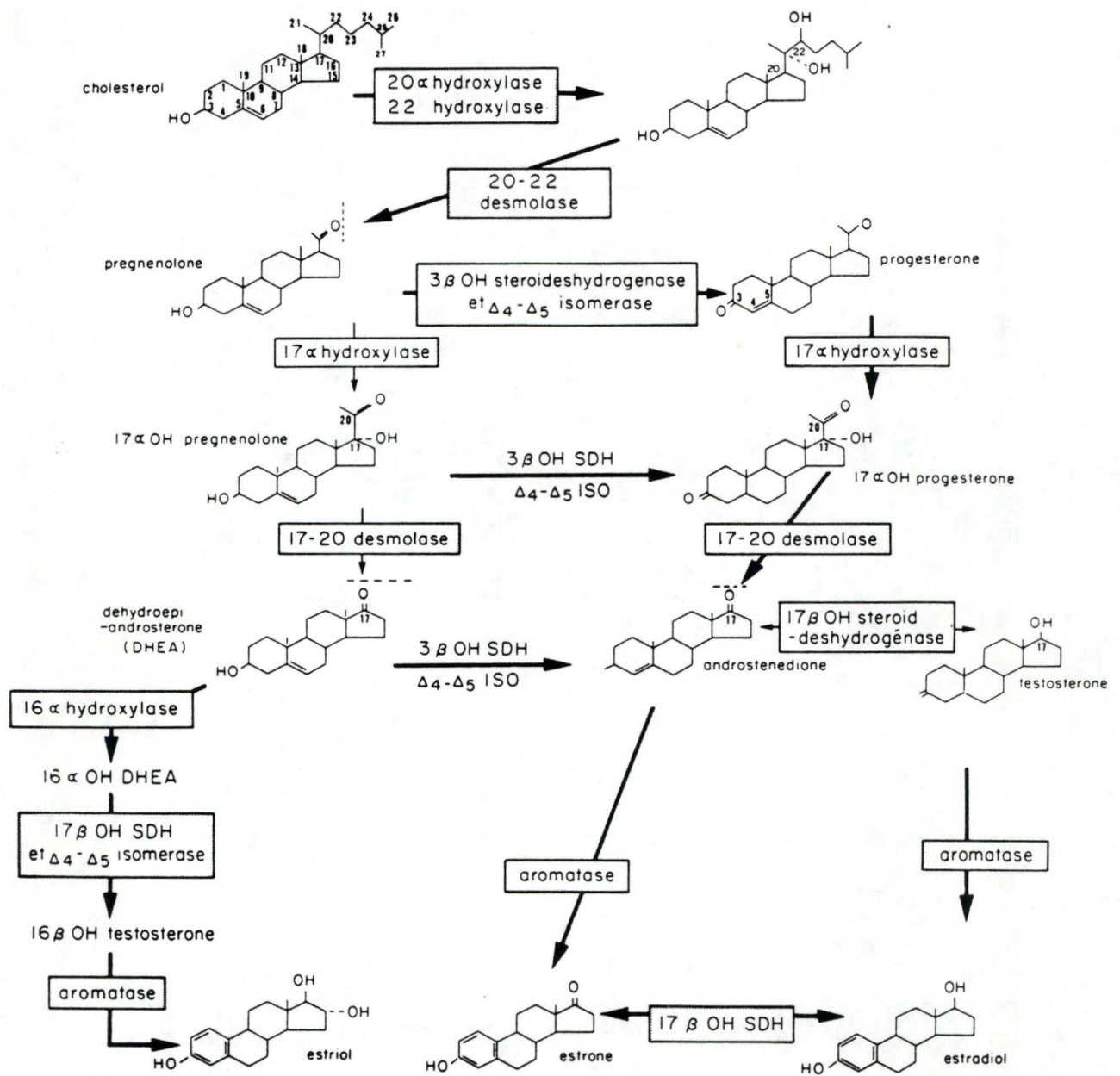


FIGURE 11 : Les principales étapes de la biosynthèse des stéroïdes sexuels (Hafez, 1980).

en progestérone peuvent inhiber la sécrétion tonique de la LH par un mécanisme de feedback négatif (Beattie et Corbin, 1975 : cités par Kim et Greenwald, 1987).

Pendant la phase lutéale, le faible niveau de sécrétion d'oestradiol semble agir en synergie avec la progestérone pour limiter la sécrétion de LH ; tandis que pendant la phase folliculaire, l'oestradiol augmente la fréquence des pulses de LH.

Le pic préovulatoire de LH peut être induit par l'injection d'oestrogènes à des brebis ovariectomisées (Scaramuzzi et Radford, 1983), grâce à la stimulation d'une décharge de GnRH.

4.2. HORMONES STEROIDIENNES

Le groupe des hormones stéroïdes comprend les oestrogènes, les progestagènes et les androgènes ; leur structure de base est représentée par le noyau cycloperhydropentanophénantrène (figure 10) dont le squelette est analogue à celui du cholestérol (Derivaux et Ectors, 1986).

4.2.1. Stéroïdogénèse

Le cholestérol est la molécule de base, délivrée par les vaisseaux sanguins, pour la biosynthèse des stéroïdes (figure 11). Le cholestérol exogène apporté par l'alimentation est utilisé préférentiellement au cholestérol synthétisé de novo par la cellule. Les lipoprotéines sont la source principale du cholestérol, mais celui lié à d'autres molécules ou associé à l'albumine est également utilisé (Martin, 1985).

Après avoir traversé la membrane basale qui sépare les cellules granulosales du sang, le cholestérol est transporté dans la mitochondrie où il est transformé en $\Delta 5$ pregnenolone par l'enzyme cytochrome P450 side chain cleavage (P450_{scc}) qui clive la chaîne latérale en C20. Cette étape initiale de la synthèse est identique quel que soit le stéroïde formé (Hafez, 1980 ; Derivaux et Ectors, 1986).

La pregnenolone est transformée en progestérone par oxydation de la fonction 3β hydroxyle et transfert d'une double liaison sous l'action de la $\Delta 5-3\beta$ hydroxystéroïde déshydrogénase et de la $\Delta 5-4$ isomérase. Ces réactions ont lieu dans le réticulum endoplasmique des cellules granulosales et thécales, mais la source physiologique la plus importante de progestérone est le corps jaune.

La progestérone est transformée en $17-\alpha$ hydroxyprogestérone par hydroxylation en C17 sous l'action de la $17-\alpha$ hydrolase. La $17-\alpha$ hydroxyprogestérone ainsi formée

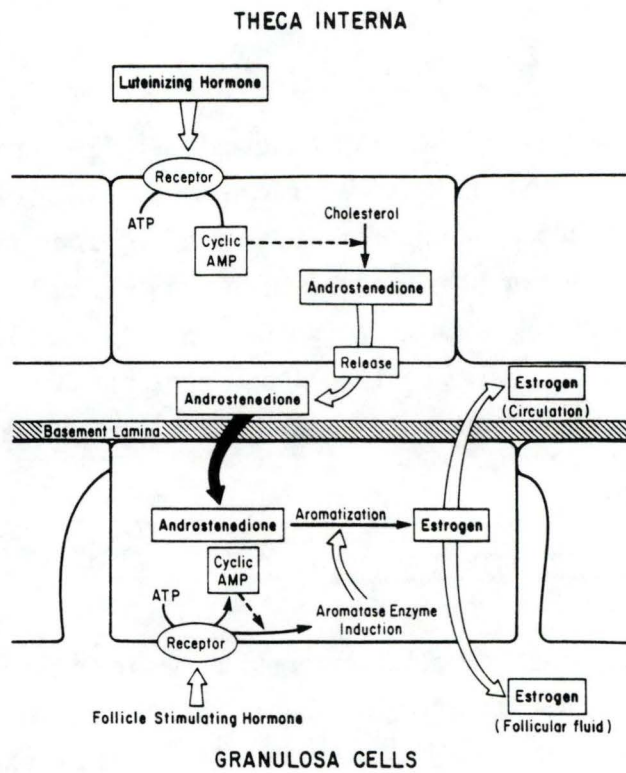


FIGURE 12 : Biosynthèse des oestrogènes (Martin, 1985).

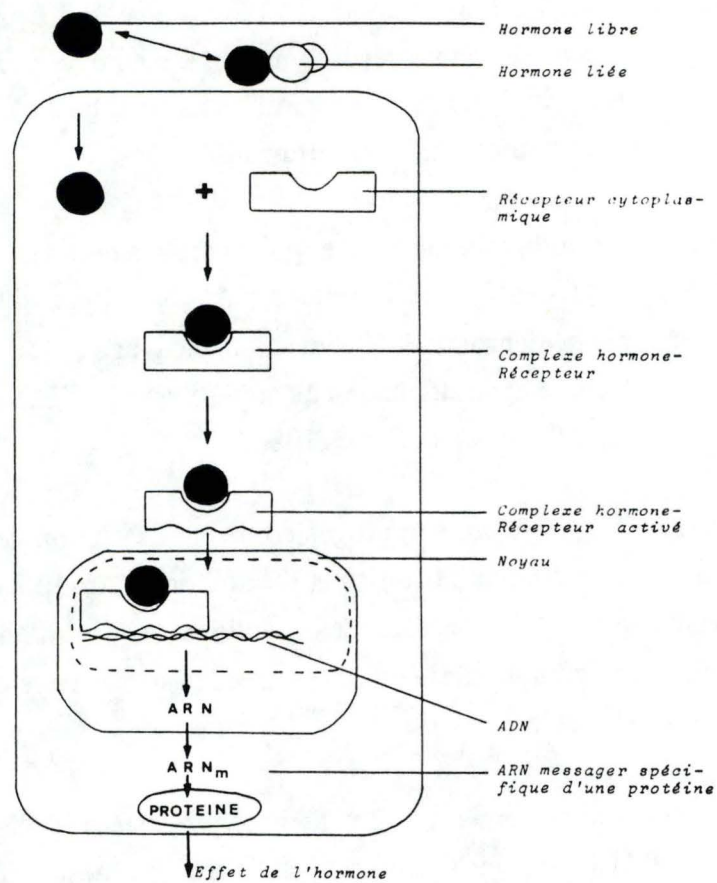


FIGURE 13 : Mode d'action des hormones stéroïdes (Derivaux et Ectors, 1986).

subit l'action d'une desmolase, ce qui produit la $\Delta 4$ androstènedione. Seules les cellules thécales produisent de l'androstènedione ; les enzymes concernés se trouvent dans le cytoplasme.

L'androstènedione est l'intermédiaire principal pour la formation des androgènes et des oestrogènes.

La formation de la testostérone résulte de l'action d'une déshydrogénase en C17 sur l'androstènedione.

La formation des oestrogènes, quant à elle, nécessite l'élimination du C19 et l'aromatisation du noyau A par un complexe enzymatique nommé aromatase, qui comprend l'enzyme cytochrome P450 aromase (P450_{arom}).

La testostérone peut se transformer en oestradiol par une voie sensiblement parallèle.

Les oestrogènes sont élaborés par les cellules de la thèque et de la granulosa. Il y a complémentarité entre ces deux formations (figure 12) pour la synthèse du 17- β oestradiol. La granulosa sécrète des quantités négligeables d'oestrogènes et de testostérone mais possède une forte activité aromatase tandis que la thèque ne possède pas une capacité d'aromatisation suffisante pour convertir en oestradiol l'androstènedione qu'elle produit. La progestérone produite par la granulosa est alors utilisée par la thèque pour former des androgènes, aromatisés ensuite en oestrogènes dans la granulosa (Liu et Hsueh, 1986).

Il existe un équilibre entre les formes cétonique et β -hydroxylée d'oestrogènes (oestrone et oestradiol) du fait de la présence d'une 17- β -hydroxystéroïde déshydrogénase (Derivaux et Ectors, 1986 ; Hafez, 1980).

4.2.2. Mode d'action

Les hormones stéroïdiennes sont libérées dans le sang circulant, sous deux formes : libre (active) ou liée (matériel de réserve).

Les formes libres se fixent sur les récepteurs protéiques cytoplasmiques des cellules et tissus cibles et forment un complexe stéroïde-récepteur (figure 13) qui est transféré au noyau où se réalisent des réactions complexes, avec comme résultat final la formation d'ARN transféré dans le cytoplasme et servant à la synthèse de protéines spécifiques.

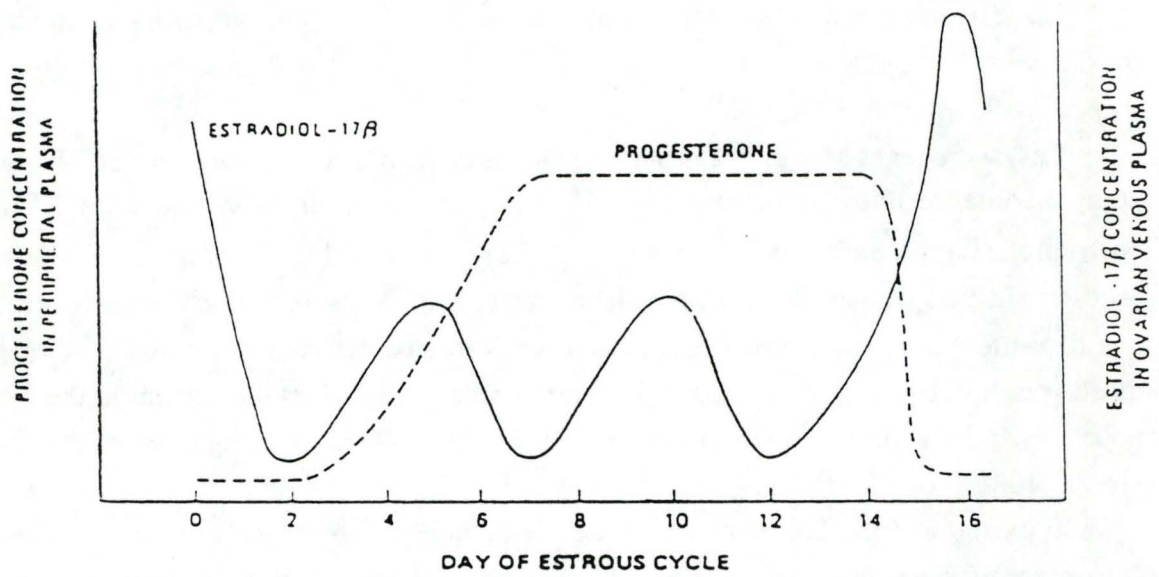


FIGURE 14 : Profils hormonaux au cours du cycle oestral (Robertson, 1977).

4.2.3. Emission au cours du cycle

Pendant la phase lutéale, le corps jaune sécrète presque exclusivement de la progestérone, bien que de petites quantités de 20α -dihydroprogestérone et 17α -hydroxyprogestérone soient également produites. Les teneurs plasmatiques en progestérone augmentent deux jours après l'ovulation pour plafonner pendant la majeure partie de la phase lutéale, après quoi elle régresse, ce qui conditionne la sécrétion des gonadotropines hypophysaires (figure 14).

Le principal oestrogène sécrété par le follicule est le $17\text{-}\beta$ oestradiol, bien que l'oestrone soit présent en faible quantité.

Il y a trois hausses de sécrétion d'oestradiol ; deux pendant la phase lutéale et un pic préovulatoire.

Les oestrogènes sécrétés pendant la phase lutéale du cycle proviennent des follicules de De Graaf en développement plutôt que du corps jaune.

Les concentrations d'androstènedione (et testostérone) augmentent parallèlement à celles d'oestradiol (Baird, 1977).

5. CONTROLE HORMONAL DU DEVELOPPEMENT ET DE LA DIFFERENCIATION DU FOLLICULE A ANTRUM

5.1. FOLLICULOGENESE BASALE

La première étape du développement folliculaire ne dépend pas strictement des gonadotropines. En effet, après une inhibition chimique de l'hypophyse, saturée par un analogue de GnRH, on peut remarquer une abondance de follicules atteignant 2mm maximum (Cognié, 1991 ; Communication personnelle).

Ceci ne prouve pas que la folliculogenèse basale soit totalement indépendante des gonadotropines, en effet la FSH participe à la formation de l'antrum. Gore-Langton et Daniel (1990) ont observé, in vitro, une réorganisation des cellules granulosales de follicules préantraux en culture indépendante de l'accumulation de fluide folliculaire, et ceci sous l'effet de la FSH et de l'oestradiol. La FSH ne stimule donc pas la formation de l'antrum uniquement par régulation des sécrétions des cellules granulosales et par l'accumulation de fluide folliculaire comme supposé jusqu'à présent.

Certaines études sur des hamsters hypophysectomisés montrent un effet stimulateur de doses, élevées mais physiologiques, de progestérone sur la croissance folliculaire. L'hormone agit alors comme stimulus mitogénique au niveau des follicules préantraux (Kim et Greenwald, 1987).

5.2. FOLLICULOGENESE TONIQUE

5.2.1. Recrutement

Le nombre de follicules recrutables pour la dernière vague de croissance folliculaire du cycle, qui intéresse les follicules capables d'ovuler, semble dépendre du taux de FSH durant les 24 heures précédant la lutéolyse (Driancourt et al., 1984).

Kim et Greenwald (1989) postulent que la progestérone et la LH constituent un "complexe folliculotrope" aux effets synergiques comparables à ceux de la FSH et de l'oestradiol. On ne sait pas encore si ce complexe augmente le taux de recrutement ou empêche l'atrésie. Il est à noter que ce postulat valable chez le hamster n'est pas nécessairement extrapolable à la brebis.

Pour certains, la LH est l'hormone la plus importante dans le recrutement des follicules (Mc Natty et al., 1981). Mais Di Zerega et al. (1981) ont montré qu'une suppression du taux sérique de FSH pendant la phase folliculaire provoque le retard voire même l'échec de la maturation finale du follicule. En présence d'un niveau basal de LH, la FSH seule peut stimuler développement et fonction des cellules granulosales ; cet effet stimulateur est contrarié par l'addition de pulses de LH de grande amplitude (Picton et al., 1990).

La **LH** est capable d'induire la différenciation des cellules thécales au niveau morphologique et biochimique; elle constitue l'inducteur primaire de la cytodifférenciation de ces cellules. Une des conséquences majeures de l'action de la LH sur les cellules thécales est la stimulation de la biosynthèse d'androgènes. D'après Erickson et al. (1985) ces faits résultent de l'activation de l'expression des gènes codant pour les enzymes cholestérol side chain cleavage (P450_{scc}), 17 hydroxylase et C17,20 desmolase.

A ce stade, le fluide folliculaire est riche en androgènes et ne contient que de faibles concentrations en oestrogènes (Jacques, 1989). En réalité, la FSH fournit le stimulus primaire entraînant la croissance et la prolifération des cellules granulosales ainsi que l'induction sur ces mêmes cellules de récepteurs à LH. La phase folliculaire progresse et

les pulses de LH de plus en plus fréquents mènent au recrutement de follicules. Ces follicules commencent à sécréter plus d'oestrogènes (Driancourt et al., 1984). Une imprégnation préalable à la FSH est donc nécessaire pour la réponse des follicules à la LH.

La *FSH* agit à différents niveaux :

- la stimulation de la prolifération des cellules granulosales . Son action est biphasique lors de la maturation folliculaire ; il y a stimulation initiale de l'activité mitotique (mise en évidence par l'incorporation de thymidine tritiée) et ensuite stimulation de la sécrétion d'oestradiol. La FSH perd alors son activité mitogénique tandis qu'elle garde ses capacités stéroïdogéniques (Peluso et al., 1991);

- la stimulation de la production de ses propres récepteurs au niveau des cellules granulosales (Nimrod et al., 1976 ; cités par Ronin, 1989);

- la stimulation de l'acquisition de récepteurs à LH au niveau de la thèque interne et l'augmentation progressive de ces récepteurs sur les cellules granulosales (Richards et Midgley, 1976 : cités par Gruenberg et al., 1983);

Les stéroïdes n'interviennent pour ainsi dire pas dans le recrutement des follicules.

5.2.2. Sélection et dominance

La LH, comme la FSH, augmente la quantité de ses propres récepteurs, au niveau des cellules granulosales différenciées, après une induction initiale de ces récepteurs par la FSH (Jia et Hsueh, 1984). Un traitement des cellules granulosales en culture à la cycloheximide (inhibiteur des synthèses protéiques) diminue de 46% les récepteurs induits par la LH, ce qui suppose l'implication d'une nouvelle synthèse protéique (Jia et Hsueh, 1984).

La présence de récepteurs à LH tant au niveau des cellules thécales que granulosales marque un stade de développement où les follicules activés possèdent une plus grande capacité de conversion des androgènes en oestrogènes (Webb et Gauld, 1984). En effet il se produit, à ce stade, une inversion du profil de sécrétion dans le sens d'une production accrue d'oestradiol. La plupart de l'oestradiol sécrété provient précisément de l'ovaire contenant les follicules de De Graaf matures (Webb et England, 1982).

Cette évolution de la synthèse des stéroïdes est contrôlée par quatre voies principales à savoir :

- La conversion de cholestérol en pregnenolone par le P450_{scc}. Cet enzyme est limitant pour la biosynthèse de progestérone et est régulé par les gonadotropines aussi bien in vivo qu'in vitro. La *FSH*, ainsi que l'AMPc, stimule la production de messenger ribonucléique de P450_{scc} (Goldring et al., 1987); la *LH* a également un effet positif sur la synthèse de progestérone. Le P450_{scc} est en quantité plus importante dans les follicules préovulatoires que dans les petits follicules (le maximum se trouve au niveau du corps jaune) (Channing et al., 1984).

- La conversion de pregnenolone en progestérone par la $\Delta 5-3\beta$ hydroxystéroïde déshydrogénase. En présence d'un inhibiteur de cet enzyme, la *progestérone* augmente la capacité de la FSH et de la LH à stimuler sa propre synthèse (Fanjul et al., 1983).

Les androgènes stimulent la synthèse de progestérone de follicules ovariens de brebis en culture (Moor et al., 1975 ; cités par Armstrong et al., 1987). C'est un effet réel des androgènes plutôt qu'un effet dépendant de l'aromatisation en oestrogènes puisque des anti-androgènes diminuent la synthèse de progestérone par des cellules granulosales en culture (Schromberg et al., 1978).

En plus de leur propre effet stimuloire, les androgènes favorisent la synthèse de progestérone induite par la FSH en augmentant la production d'AMPc induite par celle-ci. De plus elles agissent en synergie avec la FSH pour accroître l'utilisation des lipoprotéines.

Certains auteurs ont montré, au contraire, un effet inhibiteur des androgènes sur la synthèse de progestérone par des cellules de granulosa humaine ou porcine (Armstrong et al., 1987).

L'oestradiol limite la conversion de pregnenolone en progestérone en agissant au niveau d'étapes précédant la génération d'AMPc car celui-ci peut restaurer la synthèse de progestérone in vitro (Leung et Armstrong, 1979).

- La transformation de progestérone en androgènes par le P450 17 α . Cet enzyme qui possède les activités 17 α -hydrolase et 17-20 α -hydrolase semble en effet être un facteur limitant de la production d'oestradiol (Bogovich et Richards, 1984) et est activé par la *LH*.

La progestérone est un inhibiteur de la 17-20 α -hydrolase, ce qui indique une régulation partielle de la synthèse des androgènes (Armstrong et al., 1987).

- L'aromatation des androgènes en oestrogènes par le "complexe aromatase" comprenant l'enzyme P450_{arom} dont la synthèse est régulée, in vitro, par l'action de la *FSH* (Steinkampf et al., 1987). La *FSH* induit la synthèse de novo de nouveaux enzymes P450_{arom} plutôt que d'activer les enzymes préexistantes (Chan et Tan, 1987). En outre, alors que les petits follicules antraux contiennent peu de P450_{arom}, la concentration de cet enzyme augmente d'un facteur 16 dans les follicules préovulatoires (Hickey et al., 1988). Un cotraitement avec des inhibiteurs de la phosphodiesterase, qui minimisent la scission de l'AMPc, confirme le rôle de ce dernier en tant que médiateur (Jia et Hsueh, 1986). La *FSH* entraîne également une augmentation de l'activité totale de la sous-unité catalytique de la protéine kinase A (protéine impliquée dans la réponse cellulaire) ainsi qu'une augmentation des deux isoformes de la sous-unité régulatrice de cette même protéine (Beebe et al., 1989).

Le follicule dominant (d'où provient la plupart de l'oestradiol de la circulation périphérique) incubé in vitro sécrète beaucoup plus d'oestradiol que ceux de taille similaire ne contenant pas de récepteurs à LH/hCG. La *LH* joue donc un rôle actif dans l'augmentation de la synthèse d'oestradiol par le follicule dominant (Baird et al., 1981 : cités par Webb et England, 1982). En effet l'activité aromatase, au sein des follicules préovulatoires, est stimulée par la *LH* qui participe alors avec la *FSH* à la production d'oestrogènes (Hickey et al., 1988).

La progestérone peut supprimer directement le développement des follicules préovulatoires, in vivo, en inhibant l'aromatase. La progestérone inhibe les effets de la *FSH* dans son maintien des sécrétions d'oestradiol et exerce un effet inhibiteur irréversible sur la production d'oestradiol par les cellules granulosales (Fortune et Vincent, 1983). En réalité cet effet de la progestérone est dû à la diminution de la synthèse d'AMPc induite par la *FSH* (Armstrong et al., 1987).

L'androstènedione, en plus de son intervention en tant que substrat de l'aromatase, augmente l'effet de la *FSH* sur l'activité de ce complexe enzymatique. Cette action de l'androstènedione n'est pas dépendante de son aromatisation (Armstrong et al., 1980 : cités par Armstrong et al., 1987) mais se situe avant la production d'AMPc (Armstrong et al., 1987). La synthèse des oestrogènes est influencée par le substrat C19 disponible et par la variation du rapport androgènes aromatisables (testostérone, androstènedione) et non aromatisables (5 α -dihydroxytestostérone, androstérone) (Armstrong et al., 1987).

L'oestradiol augmente sa propre production par action directe sur les cellules granulosales en stimulant l'activité aromatase induite par la *FSH* (Goodman et al., 1981).

Par rapport aux stades précédents du cycle, après l'évolution de la synthèse des stéroïdes, plus d'oestradiol est sécrété en réponse à chaque pulse de LH. L'oestradiol agit alors en synergie avec la FSH dans les cas suivants :

- La stimulation de la prolifération des cellules de la granulosa ; l'oestradiol seul a des effets limités mais on observe une augmentation rapide de l'activité mitogénique de la FSH quand elle agit de concert avec l'oestradiol (Martin, 1985 ; Peluso et al., 1991) ;

- l'induction de ses propres récepteurs ;

- l'induction de récepteurs à FSH au niveau des cellules granulosales ;

- l'induction de récepteurs à LH au niveau des cellules de la thèque interne ainsi qu'au niveau des cellules granulosales ;

- la génération d'AMPC ;

- l'induction du messenger ribonucléique de P450_{scc} : l'oestradiol agit en induisant la synthèse d'une protéine régulatrice activant la transcription du gène de P450_{scc} (Goldring et al., 1987);

- la formation de l'antrum.

Outre ces actions, les oestrogènes bloquent la production d'androgènes stimulée par la LH. Cet effet ne se déroule pas via une diminution de l'action des gonadotropines ni via un changement des récepteurs à LH. L'action inhibitrice se situe directement au niveau des cellules thécales par la réduction de l'activité de l'enzyme 17 α -hydroxylase (Onoda et Hall, 1982 : cités par Erickson et al., 1985), ou par activation de la 5 α -réductase (Eckstein et Nimrod, 1977).

La biosynthèse d'oestradiol par le follicule ovulatoire est nécessaire, non seulement pour la différenciation des cellules granulosales mais également pour le déclenchement du pic préovulatoire de LH. L'oestradiol intervient dans deux boucles de feed-back positifs, l'une au niveau de l'hypothalamus, l'autre au niveau de l'ovaire, pour assurer le maintien du follicule dominant et provoquer l'ovulation (Bister, 1989).

5.3. ATRESIE FONCTIONNELLE

L'atrésie est consécutive à l'action de différents mécanismes qui agissent synergiquement. Le processus initiateur de l'atrésie des follicules à antrum est encore inconnu bien que la cascade d'évènements ultérieurs soit établie :

- perte de l'aptitude à aromatiser les androgènes ;
- réduction de la totalité de production stéroïdienne ;
- réduction du nombre de récepteurs à LH et FSH (Webb et Gauld, 1984).

L'aromatisation des androgènes en oestrogènes est nécessaire au développement du follicule. Son inhibition provoque une accumulation d'*androgènes* en son sein, entraînant de la sorte l'arrêt des divisions des cellules granulosales et une réduction de la sensibilité du follicule aux hormones gonadotropes.

Les androgènes, régulateurs importants du développement folliculaire, suppriment la formation des récepteurs à LH au niveau des cellules granulosales par un mécanisme ultérieur à la production d'AMPc.

L'augmentation des teneurs intrafolliculaires en androgènes peut être le résultat d'une perte de l'activité aromatase, mais aussi une cause de l'atrésie (Scaramuzzi et al., 1977 ; cités par Jia et al., 1985).

En effet, l'atrésie peut être induite in vitro par de hautes concentrations en androgènes. L'addition de $\Delta 4$ - Androstènedione à une culture de cellules granulosales provoque des changements mitochondriaux, l'acquisition de reticulum endoplasmique lisse et la déficience des filaments d'actine, ce qui peut refléter une altération des fonctions cellulaires (Anderson, 1989). En outre, une immunisation active ou passive contre l'androstènedione réduit le taux d'atrésie folliculaire et augmente le taux d'ovulation (Titeca, 1987).

L'oestradiol agit contre l'effet atrésiant des androgènes, ce qui préserve le follicule dominant.

La FSH inhibe l'atrésie des follicules à antrum. En effet, l'injection d'un antagoniste de GnRH peut causer l'atrésie folliculaire et l'infertilité. Lors de l'arrêt de ce traitement, la concentration sérique en FSH revient à sa valeur normale alors que l'atrésie persiste ce qui implique l'intervention de facteurs paracrines dans la persistance de l'atrésie (Sharpe et al., 1990).

Une chute de la synthèse de DNA folliculaire apparaît entre 12 et 18 heures après l'induction de l'atrésie par un antisérum contre la PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) (Greenwald, 1989).

Lors de sa détérioration, le follicule libère des substances stimulant les cellules phagocytaires (Martin, 1985).

Chez la brebis, la perte des follicules ovariens s'effectue à 70% au niveau des follicules primordiaux et à 30% au niveau des follicules préantraux et antraux.

6. LE FLUIDE FOLLICULAIRE

Le fluide folliculaire est un milieu important pour la croissance et la maturation de l'ovocyte et des cellules granulosales. Le liquide folliculaire contient aussi un certain nombre de protéines, peptides, facteurs de croissance, protéoglycans qui peuvent avoir des rôles importants dans la régulation paracrine ou autocrine de la fonction ovarienne (Cahill, 1984 ; Ronin, 1989 ; Yarney et al., 1989).

Le fluide folliculaire contient des sites de liaison des gonadotropines. On a pu montrer la présence dans le fluide folliculaire isolé, de composants de structure similaire au domaine extracellulaire du récepteur à LH/hCG. Les auteurs proposent que de tels récepteurs soient sécrétés activement par les cellules folliculaires ou par libération des récepteurs membranaires dans le fluide (Yarney et al., 1989). La signification physiologique de ces composants n'a pas encore été établie mais leur présence et leur variation, en respect de la taille et de la maturation, suggèrent qu'ils font partie de systèmes régulateurs contrôlant la réponse hormonale (Kolena, 1986 : cité par Yarney et al., 1989).

Di Zerega et al. (1983) ont découvert une protéine semblable à la FSH-binding inhibitor au pouvoir anti-aromatisant. Le follicule dominant peut donc sécréter une protéine anti-aromatisante et ainsi favoriser la sélection active par inhibition des autres follicules recrutés.

***RECHERCHES
PERSONNELLES***

Objectifs

Différents éléments de la littérature, ainsi que des expériences réalisées préalablement au laboratoire (Jacques, 1989 ; Noël , 1989), montrent que des follicules morphologiquement identiques peuvent avoir une capacité de synthèse hormonale tout à fait différente. Les données obtenues par observation directe des ovaires grâce à la technique d'endoscopie ne sont dès lors pas suffisantes pour étudier le fonctionnement de l'ovaire.

Une technique de culture *in vitro* des follicules ovariens a été mise au point dans le cadre d'un mémoire de fin d'étude (Demuynck, 1990). Cette technique permet une bonne survie histologique et fonctionnelle des follicules ovariens, ainsi qu'une étude de leur dynamique de sécrétion. De plus elle présente l'avantage, par rapport aux cultures de cellules, de conserver l'intégrité des interactions thèque-granulosa, interactions capitales pour un bon déroulement de la stéroïdogénèse.

Dans le cadre de nos expériences, nous avons dans un premier temps tenté de perfectionner la technique employée. Il apparaît en effet que la température de transport des ovaires peut conditionner la survie histologique et fonctionnelle des follicules mis en culture ultérieurement. Nous avons donc testé trois températures de transport des ovaires (4, 20 et 38°C) couramment citées dans la littérature. La température de transport donnant les meilleurs résultats sera retenue pour les expériences ultérieures.

Dans un second temps, nous avons étudié la dynamique de sécrétion des follicules en culture, leur capacité de réponse à différentes doses de gonadotropines, ainsi que l'effet de différents types de stimulation (FSH seule, LH seule, FSH suivie de LH et LH suivie de FSH).

*Matériel et
méthodes*

TABLEAU 1 : Composition détaillée du milieu de culture.

Medium 199¹

Component	071-01100	041-02340	079-00011
	Powder	1X Liquid	Powder
	mg/L	mg/L	mg/L
INORGANIC SALTS:			
CaCl ₂ (anhyd.)	200.00	200.00	200.00
Fe(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	0.72	0.72	0.72
KCl	400.00	400.00	400.00
MgSO ₄ (anhyd.)	97.67	—	97.67
MgSO ₄ · 7H ₂ O	—	200.00	—
NaCl	6800.00	6300.00	6300.00
NaHCO ₃	—	2200.00	—
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	140.00	140.00	140.00
OTHER COMPONENTS:			
Adenine Sulphate	10.00	10.00	10.00
Adenosinetriphosphate (disodium salt)	1.00	1.00	1.00
Adenylic Acid	0.20	0.20	0.20
Cholesterol	0.20	0.20	0.20
Deoxyribose	0.50	0.50	0.50
D-Glucose	1000.00	1000.00	1000.00
Glutathione (reduced)	0.05	0.05	0.05
Guanine HCl	0.30	0.30	0.30
HEPES	—	5958.00	5958.00
Hypoxanthine	—	0.30	—
Hypoxanthine (Na Salt)	0.354	—	0.354
Phenol Red	20.00	20.00	20.00
Ribose	0.50	0.50	0.50
Sodium Acetate	50.00	50.00	50.00
Thymine	0.30	0.30	0.30
Tween 80 [®]	20.00	20.00	20.00
Uracil	0.30	0.30	0.30
Xanthine	—	0.30	—
Xanthine (Na Salt)	0.344	—	0.344

Component	071-01100	041-02340	079-00011
	Powder	1X Liquid	Powder
	mg/L	mg/L	mg/L
AMINO ACIDS:			
DL-Alanine	50.00	50.00	50.00
L-Arginine · HCl	70.00	70.00	70.00
DL-Aspartic Acid	60.00	60.00	60.00
L-Cysteine HCl · H ₂ O	0.11	0.11	0.11
L-Cystine	—	20.00	—
L-Cystine · 2HCl	26.00	—	26.00
DL-Glutamic Acid · H ₂ O	150.00	150.00	150.00
L-Glutamine	100.00	100.00	100.00
Glycine	50.00	50.00	50.00
L-Histidine HCl · H ₂ O	21.88	21.88	21.88
L-Hydroxyproline	10.00	10.00	10.00
DL-Isoleucine	40.00	40.00	40.00
DL-Leucine	120.00	120.00	120.00
L-Lysine · HCl	70.00	70.00	70.00
DL-Methionine	30.00	30.00	30.00
DL-Phenylalanine	50.00	50.00	50.00
L-Proline	40.00	40.00	40.00
DL-Serine	50.00	50.00	50.00
DL-Threonine	60.00	60.00	60.00
DL-Tryptophan	20.00	20.00	20.00
L-Tyrosine	—	40.00	—
L-Tyrosine (disodium salt)	57.66	—	57.66
DL-Valine	50.00	50.00	50.00
VITAMINS:			
Ascorbic Acid	0.05	0.05	0.05
α-Tocopherol Phosphate (disodium salt)	0.01	0.01	0.01
d-Biotin	0.01	0.01	0.01
Calciferol	0.10	0.10	0.10
D-Ca Pantothenate	0.01	0.01	0.01
Choline Chloride	0.50	0.50	0.50
Folic Acid	0.01	0.01	0.01
i-Inositol	0.05	0.05	0.05
Menadione	0.01	0.01	0.01
Niacin	0.025	0.025	0.025
Niacinamide	0.025	0.025	0.025
Para-aminobenzoic Acid	0.05	0.05	0.05
Pyridoxal HCl	0.025	0.025	0.025
Pyridoxine HCl	0.025	0.025	0.025
Riboflavin	0.01	0.01	0.01
Thiamine HCl	0.01	0.01	0.01
Vitamin A (acetate) ^a	0.14	0.14	0.14

1. Morgan, Morton and Parker (1950) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73, 1.

a. Values established by the Tissue Culture Standards Committee.

® Tween 80 is a registered trademark of ICI Americas Inc.

1. MATERIEL

1.1. PREPARATION DU MILIEU DE CULTURE

1.1.1. Composition

Le milieu de culture est composé d'eau ultrapure (deminéralisée, désionisée) à laquelle sont additionnés:

- le milieu de culture M199 sous forme de poudre (Gibco, No. 079-00011P), dont la composition est détaillée dans le tableau 1 ;
- du NaHCO_3 (Merck, No. 6329, PM 84,01) à raison de 2,2 g/l de milieu ;
- de la gentamycine à 50 ng/ml (Gibco, No. 043-05750D) à raison de 1ml/l de milieu, ajoutée après filtration ;

Le matériel utilisé en vue de la préparation du milieu de culture est préalablement rincé à l'eau ultrapure.

Remarque : lors des stimulations hormonales nous avons utilisé de la LH (NIADDK-oLH-I-3) et de la FSH (NIAMDD-oFSH-RP1) fournies par le NIH (National Institute of Hormonology, U.S.A.).

1.1.2. Mesure du pH

Le pH du milieu est déterminé à l'aide d'un pH mètre "WTW pH 95" équipé d'une électrode de verre "WTW type E50 pHc, 3m/l KCl" ; le pH obtenu étant trop acide, il est porté à 7,2 par ajout de Na OH 1 N.

1.1.3. Filtration

Le milieu est ensuite filtré par une pompe péristaltique simple "Millipore Catalog. No. XX80 202 30" équipée de filtres "Millipores type H A" de 0,45 et 0,22 μm préalablement stérilisés par autoclavage.

Après filtration le milieu est récolté dans des bouteilles stérilisées également à l'autoclave. Le pH est vérifié et se trouve alors vers 7,4 ce qui correspond au pH physiologique

1.1.4. Mesure de la pression osmotique

La pression osmotique du milieu est vérifiée à l'aide d'un osmomètre cryoscopique "Osmomat 030, Gonatec", elle est proche de 330 mosm/Kg, ce qui correspond à la valeur physiologique.

1.2. MATERIEL BIOLOGIQUE

1.2.1. Récolte et transport

La récolte des ovaires est réalisée à l'abattoir d'Anderlecht, dans les plus brefs délais suivant l'abattage de la brebis (environ 10 minutes). Les brebis concernées sont pour la plupart de race Texel et Suffolk.

Les ovaires sont prélevés à l'aide de ciseaux de dissection et placés sans tarder dans du milieu de culture conservé à T° voulue (soit 4, 20 ou 38°C).

Une fois le nombre escompté d'ovaires obtenu, ceux-ci sont transportés jusqu'au laboratoire où ils sont disséqués.

Le délai écoulé entre la récolte des ovaires et la mise en culture des follicules est un facteur important. En ce qui nous concerne ce délai se situe aux alentours de 2 à 3 heures (maximum à ne pas dépasser).

1.2.2. Dissection

Les follicules de diamètre compris entre 4 et 7 mm sont disséqués à l'aide de pinces fines et de ciseaux de microdissection tout en étant maintenus à la T° voulue, soit 4, 20 ou 38°C.

Cette technique permet une élimination relativement bonne du stroma ovarien entourant le follicule. Il faut cependant procéder précautionneusement afin de ne pas blesser les follicules, ce qui peut provoquer l'apparition de plages de pycnose localisées au niveau de la granulosa (photo 1) et interférer avec nos interprétations histologiques.

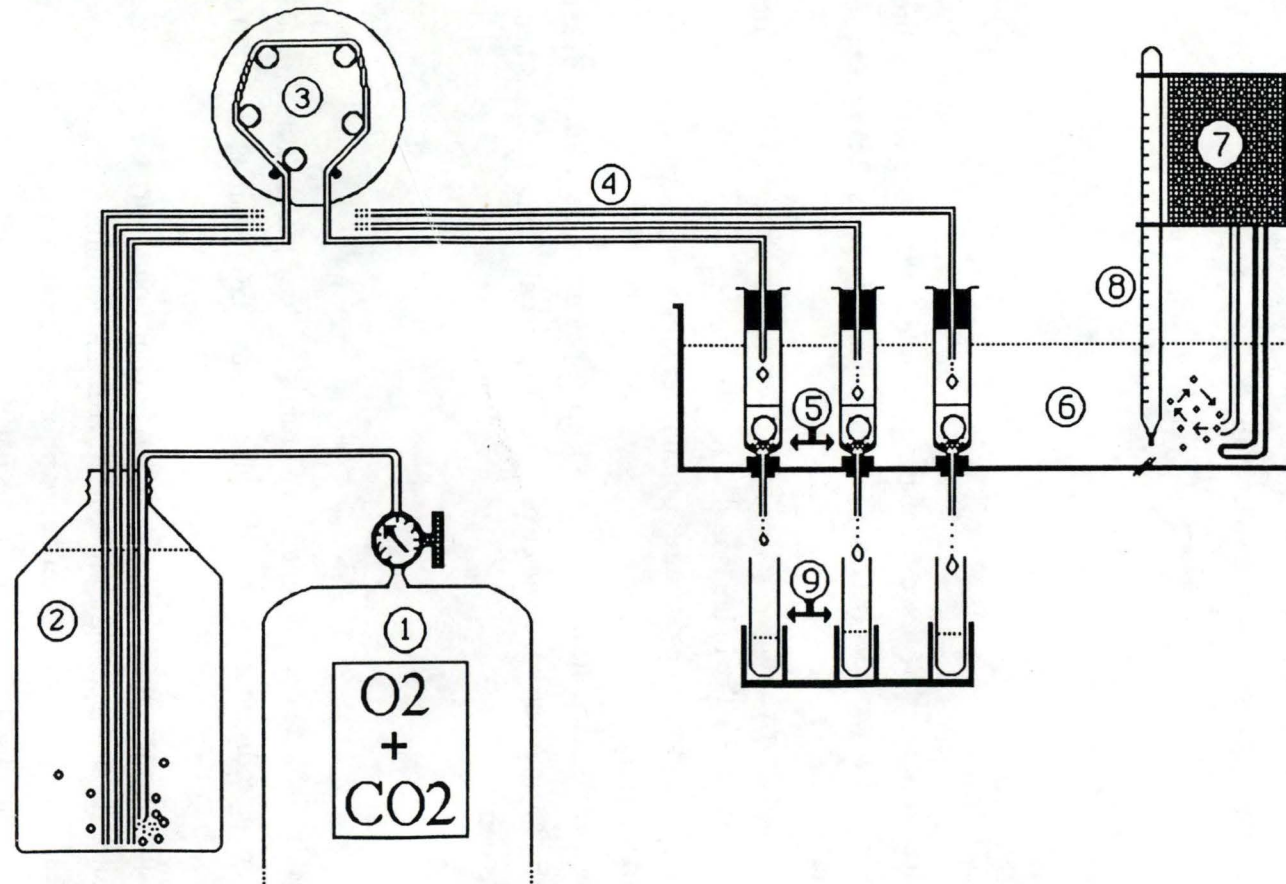


FIGURE 1 : Système de périfusion. 1 : mélange gazeux O₂ (95%) + CO₂ (5%) ; 2 : milieu de culture ; 3 : pompe péristaltique ; 4 : tuyaux en tygon ; 5 : chambre de culture ; 6 : bain thermostatisé ; 7 : pompe thermostatique ; 8 : thermomètre ; 9 : tubes pour la récolte des fractions.

2. METHODES

2.1. TECHNIQUE DE CULTURE IN VITRO

La technique employée au laboratoire et mise au point récemment est la périfusion, couramment utilisée lors de cultures folliculaires (Bahr et al., 1980 ; Peluso et Hirschel, 1987; Terqui et al., 1988), schématisée à la figure 1. Cette technique présente en effet certains avantages intéressants en ce qui concerne notre étude tels que le renouvellement continu du milieu et la possibilité d'une part, d'études de la cinétique de sécrétion folliculaire et de stimulations hormonales pulsatiles ou continues d'autre part.

Les follicules sont placés dans des seringues de 2 ml, à usage unique, faisant office de chambres de culture et contenant 1 ml de milieu, volume fixé et maintenu tout au long de la culture. Les chambres sont fermées hermétiquement par des bouchons de caoutchouc percés d'une aiguille par laquelle le milieu est injecté. Le fond est recouvert d'un papier filtre en propylène (Geldman Sciences, No. 61756) sur lequel repose le follicule. Le milieu de culture est périfusé, via des tubes en Tygon, par une pompe péristaltique "Watson-Marlow 501" réglée à un débit de 0,1 ml par minute par chambre, et est oxygéné par barbotage d'un mélange gazeux d'O₂ (95%) et de CO₂ (5%), qui permet également de maintenir le pH du milieu à 7,4. Le pH est contrôlé régulièrement au cours de la culture et réajusté si besoin est.

L'hermétisme du système, ainsi que la constance du débit, permettent le maintien d'un volume déterminé de milieu dans les chambres durant la culture.

Les chambres sont maintenues à température idéale (37,5°C) dans un bain thermostaté et homogénéisé par une pompe "Thermomix 1441". L'eau thermostatée est contenue dans un bassin percé de trous dans lesquels sont placés des bouchons de caoutchouc ; les seringues sont munies d'aiguilles traversant de part en part ces bouchons. Le milieu périfusé s'écoule régulièrement et est recueilli par fractions à intervalles de temps déterminés. Les prélèvements sont ensuite stockés à -20°C en vue du dosage ultérieur des stéroïdes émis dans le milieu au cours de la culture.

2.2. TECHNIQUE HISTOLOGIQUE

2.2.1. Mode opératoire

La préparation des follicules en vue de l'examen histologique est réalisée selon les techniques classiques.

- Fixation: immédiatement après leur retrait des chambres de culture, les follicules sont fixés dans une solution de Bouin durant 48 à 72 heures.

- Déshydratation: dans 3 bains successifs de 1 heure dans du méthanol absolu.

- Préparation à l'inclusion: par 3 bains successifs de 1 heure dans du toluol.

- Inclusion: dans 3 bains successifs de 1 heure dans du paraplast.

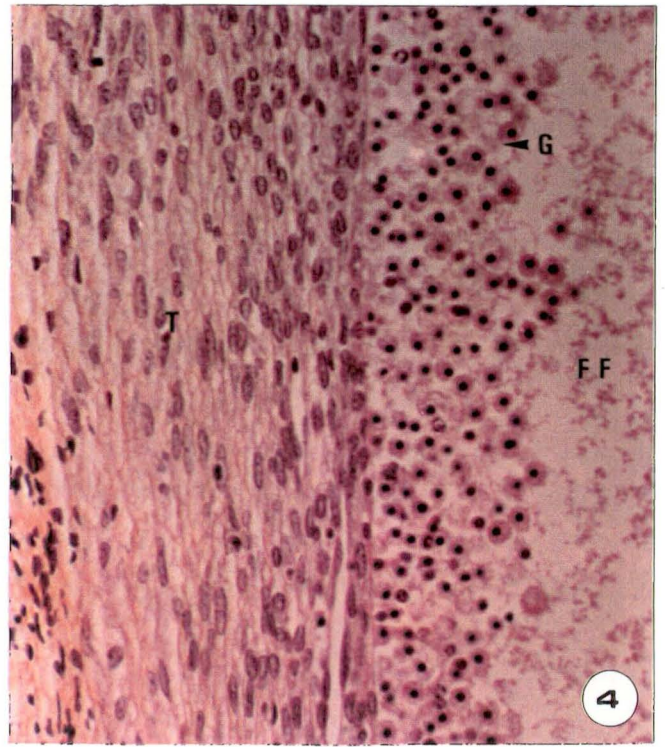
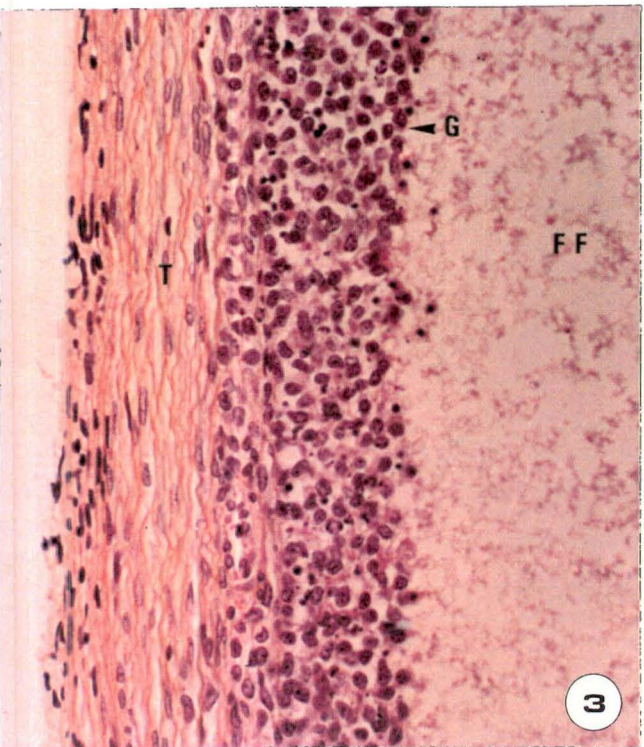
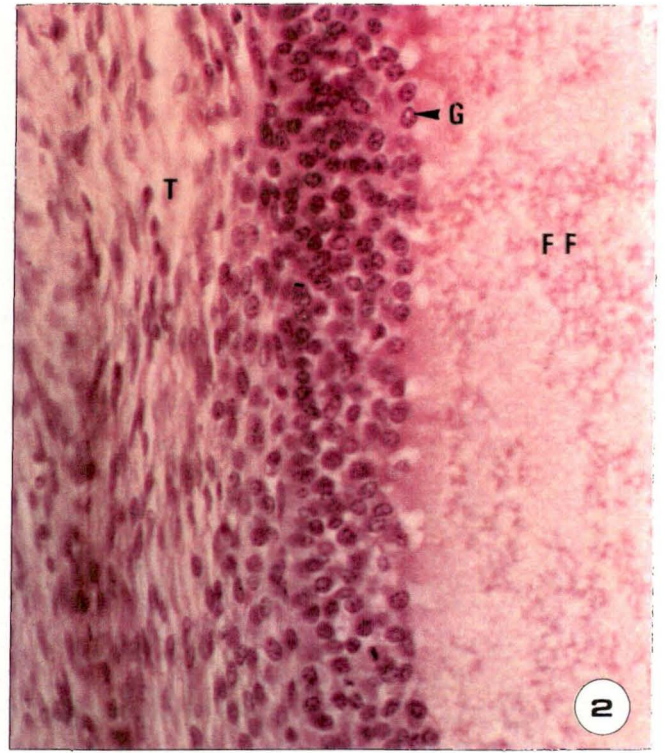
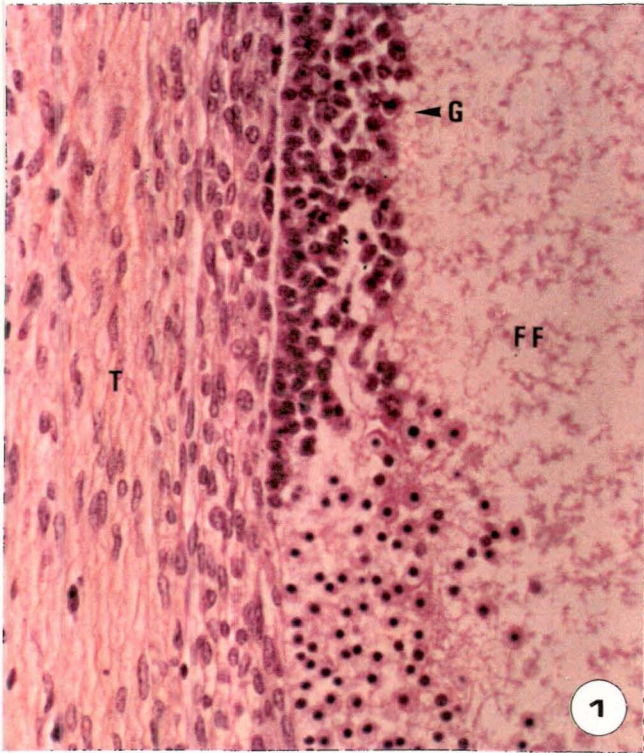
- Enrobage et préparation du bloc à la découpe.

- Réalisation des coupes au microtome, de 6 à 7 μm d'épaisseur.

- Étalement sur lame : les coupes sont disposées sur des lames de verre préalablement recouvertes d'une goutte d'eau gélatineuse. L'étalement se réalise sur une plaque chauffante à 60°C. Après séchage 1 heure à l'étuve, les coupes sont prêtes pour la coloration.

- Coloration des coupes à l' H.E.S. (Hémalun Erythrosine Safran) dont les différentes étapes sont les suivantes:

- déparaffinage dans deux bains de toluol de 3 minutes,
- 2 bains de 3 minutes dans du méthanol,
- 1 bain de 3 minutes dans du méthanol 70%,
- blanchissement 10 minutes à l'eau courante,
- 1 bain de 5 minutes d'Hémalun,
- rinçage à l'eau de source,
- différenciation dans l'alcool-HCl pendant 1 à 3 minutes,
- eau courante pendant 10 minutes,
- 1 bain de 6 minutes d'Erythrosine,
- rinçage à l'eau de source,
- différenciation dans l'alcool éthylique 70% pendant 2 à 3 minutes,
- déshydratation dans 2 bains d'alcool isopropylique absolu,
- 1 bain de Safran de 6 à 8 minutes,
- rinçage dans 3 bains d'alcool isopropylique absolu,
- passage dans 3 bains de toluol,
- montage de la lamelle couvre objet au D.P.X.



PHOTOS : 1. Granulosa présentant une plage de pycnose due à une blessure. 2. Granulosa de follicule sain. 3. Granulosa de follicule en atresie précoce. 4. Granulosa de follicule en atresie avancée. Grossissement : 80x. (G : granulosa ; T : thèques ; FF : fluide folliculaire).

2.2.2. Interprétation

Les follicules sont ensuite analysés par observation microscopique de la granulosa, ce qui nous permet de déterminer leur état.

Webb et al. (1989) ont classifié l'état des follicules ovins sur base du nombre de noyaux pycnotiques de la granulosa:

- Stade 1: normal ; moins de 5 noyaux pycnotiques dans la granulosa de la section observée
- Stade 2: atrophie précoce I ; 5 à 100 noyaux pycnotiques
- Stade 3: atrophie précoce II ; 100 à 200 noyaux pycnotiques
- Stade 4: atrophie avancée I ; nombreux noyaux pycnotiques mais la granulosa garde toujours sa structure
- Stade 5: atrophie avancée II ; nombreux noyaux pycnotiques et la granulosa perd sa structure
- Stade 6: atrophie tardive ; plus de cellules de la granulosa présentes, sauf autour de l'ovocyte.

Dans le cadre de ce travail, nous avons considéré 3 stades (photos 2 à 4): follicule sain, follicule en atrophie précoce et follicule en atrophie avancée.

2.3. DOSAGES HORMONAUX

2.3.1. Principe du dosage radioimmunologique

Tout au long des cultures, des prélèvements de milieu sont réalisés à intervalles de temps réguliers, puis congelés à -20°C en attendant le dosage des hormones stéroïdiennes $\Delta 4$ -androstènedione (A), oestradiol (E_2) et progestérone (P_4). Les concentrations en stéroïdes sont déterminées par R.I.A. (Radio-Immuno-Assay) selon les techniques décrites par Bister (1980).

Le dosage R.I.A se base sur la compétition entre une quantité connue d'hormone marquée, par la fixation d'atomes radioactifs (H^3), et une quantité inconnue et variable de la même hormone, froide, se trouvant dans l'échantillon à analyser et ce, vis-à-vis d'un antisérum qui leur est spécifique.

L'hormone froide (H^0) ainsi que l'hormone radioactive (H^*) peuvent donc se lier à l'antisérum spécifique. La quantité de H^* fixée aux anticorps sera d'autant plus faible que la quantité d'hormone froide contenue dans l'échantillon sera élevée, et inversement.

TABLEAU 2: Mode opératoire du dosage de la P4

Extraction:

- 1) Extraction de la P4 contenue dans 200 μ l de plasma par 2 ml d'hexane, puis agitation pendant deux minutes au vortex.
- 2) Prélèvement d'un ml de surnageant.
- 3) Evaporation à sec dans une étuve sous vide à 40°C.

Fixation Ag-Ac:

- 1) Addition de
 - 50 μ l de tampon wide.
 - 100 μ l de P4*
 - 50 μ l d'AS
- 2) Incubation 1/2 heure à 37°C et une nuit à 4°C.

Séparation:

- 1) Addition de 500 μ l de dextran-charcoal à 4°C.
- 2) Agitation et incubation pendant 10 min à 4°C.
- 3) Centrifugation pendant 10 min à 0°C et à 2800 rpm.

Comptage:

- 1) Prélèvement de 300 μ l de surnageant (phase liée) et addition de 3 ml d'Ecoscint A.
- 2) Comptage 4 min à l'analyseur β .

La courbe standard est réalisée à partir de 100 μ l de solutions contenant 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; et 10 ng de P4/ml.

En séparant l'H* liée à l'antiserum de l'H* libre, on peut calculer la quantité de H° en via la mesure de la radioactivité d'une de ces deux fractions. Une courbe standard, qui sert de référence, est effectuée dans les mêmes conditions avec des quantités connues d'hormone froide.

2.3.2. Calcul des résultats

La radioactivité de la fraction liée peut être déterminée par l'équation suivante selon le modèle mathématique couramment appliqué aux dosages R.I.A. :

$$A = A_0 \frac{C_m}{C_m + C_f} + BG$$

A : radioactivité de la fraction liée (en cpm) pour une certaine quantité d'hormone froide.

A₀ : radioactivité maximale (en cpm) de la fraction liée.

BG : radioactivité non spécifique (Back Ground), en l'absence d'Ac.

C_m : concentration en hormone marquée.

C_f : concentration en hormone froide.

Cette équation, qui permet de transformer en ng/ml les données obtenues en cpm, est ajustée aux données expérimentales de la courbe standard par la méthode des moindres carrés "Steepest descent" avec pondération.

2.3.3. Dosage de la progestérone

Le tableau 2 résume les différentes étapes du dosage de la progestérone.

Les solutions de référence servant à l'établissement de la courbe standard sont préparées par pesée précise et dilution de progestérone cristalline (Merck 246/4) dans du milieu de culture. Les concentrations de progestérone de la courbe standard (connues et croissantes) sont utilisées comme référence: 0,00 ; 0,25 ; 0,50 ; 1,00 ; 2,00 ; 4,00 ; 6,00 ; 8,00 et 10,00 ng de P₄/ ml.

Le traceur radioactif utilisé est la (1-2-6-7 H³) P₄ (Amersham, No. TRK-413) d'activité spécifique de 110 Ci/m Mole (4,07 TBq/m Mole) et de concentration radioactive de 1 m Ci/ ml de toluène. On dilue 50 µl de cette solution dans 5ml de solvant (toluène-

éthanol, 9/1). De cette nouvelle solution appelée solution stock, 100 µl sont pipetés dans un tube en verre et mis à évaporer dans une étuve sous vide à 40°C. L'hormone marquée est alors diluée de façon à obtenir 7000 cpm pour le "Total Count", soit 100 µl dans 3 ml de liquide scintillant (Ecoscint A, National diagnostics, No. LS-273).

L'antisérum spécifique nous est fourni par le laboratoire d'hormonologie du Centre d'Economie rurale de Marloie, et a été obtenu par immunisation de lapins. Etant sous forme lyophilisée, l'antisérum est reconstitué par l'addition de 10 ml d'eau distillée.

L'extraction de la progestérone du milieu, première étape du dosage, est réalisée à l'hexane p.a. (Merck, No. 4367).

La fixation, deuxième étape du dosage, requiert la dilution de la progestérone froide et radioactive dans une solution de tampon Wide. C'est un tampon phosphate 0,06 M de pH 7,55, préparé à partir d'une solution stock 0,6 M (7,5 gr de KH_2PO_4 (UCB, No. 1627, PM: 136,09) et 77,9 gr de NaH_2PO_4 (UCB, NO. 1770, PM: 141,96) par litre d' H_2O d).

La troisième étape du dosage, la séparation de la phase libre de la phase liée à l'antisérum, s'effectue par adsorption de la phase libre sur une solution de "Dextran-Charcoal" (650 mgr de Charcoal (Norit A Serva, No. 30890) et 65 mgr de Dextran (T70 Pharmacia, No. 31390) dans 300 ml de tampon Wide).

L'activité est mesurée au compteur β à scintillation (Beckman LS 801) durant 4 minutes.

2.3.4. Dosage de l'oestradiol

Les solutions de référence servant à l'établissement de la courbe standard sont préparées par pesée précise et dilution de l'oestradiol cristalline (Merck 246/4). La courbe est réalisée à partir de 100 µl de solution contenant : 0,0 ; 2,5 ; 5,0 ; 10,0 ; 25,0 ; 50,0 ; 100,0 ; 200,0 ; 500,0 ; 1000,0 et 2000,0 pg de E2/ml.

Le traceur radioactif utilisé est l'oestradiol tritiée ($2,4,6,7 \text{ H}^3$) E2 (Amersham, No. TRK-322) d'activité spécifique de 101,3 Ci/mmole (3,75 TBq/mmole) et de concentration radioactive 1mCi/ml de toluène.

L'oestradiol contenue dans le milieu est extraite par du diéthyl éther p.a. (Merck, No. 921).

TABLEAU 3: Mode opératoire du dosage de l'E₂

Extraction:

- 1) Extraction de l' E₂ contenue dans 200 µl de plasma par 2 ml de diéthyl éther P.A., puis agitation pendant deux minutes au vortex.
- 2) Congélation à -20°C.
- 3) Récupération de la totalité de la phase liquide.
- 4) Evaporation à sec dans une étuve sous vide à 40°C.

Fixation Ag-Ac:

- 1) Addition de
 - 50 µl de tampon wide.
 - 100 µl de E₂*
 - 50 µl d'AS
- 2) Incubation 1/2 heure à 37°C et une nuit à 4°C.

Séparation:

- 1) Addition de 500 µl de dextran-charcoal à 4°C.
- 2) Agitation et incubation pendant 10 min à 4°C.
- 3) Centrifugation pendant 10 min à 0°C et à 2800 rpm.

Comptage:

- 1) Prélèvement de 300 µl de surnageant (phase liée) et addition de 3 ml d'Ecoscint A.
- 2) Comptage 4 min à l'analyseur β.

La courbe standard est réalisée à partir de 100 µl de solutions contenant 0; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 200; 500; 1000; 2000 et 3000 pg de E₂/ml.

Hormis ces quelques variantes le dosage de l'oestradiol se réalise de la même façon que pour la P4. Le tableau 3 résume les différentes étapes de ce dosage.

2.3.5. Dosage de l'androstènedione

Les solutions de référence servant à l'établissement de la courbe standard sont préparées par pesée précise et dilution d'androstènedione cristalline (Merck 246/4). La courbe standard est réalisée à partir de 100 µl de solution contenant : 0,0 ; 0,25 ; 0,5 ; 1,0 ; 2,0 ; 4,0 ; 6,0 ; 8,0 et 10,0 ng/ml.

Le traceur radioactif utilisé est la (1,2,6,7-H³ Δ4-Andro) (Amersham, No. TRK-454).

Le dosage de l'androstènedione se réalise de la même façon que celui de la progestérone.

2.4. ANALYSES STATISTIQUES

La comparaison de moyennes effectuée lors de l'étude de l'influence de la température de transport sur l'état histologique a été traitée par le test de Chi-carré.

Les résultats obtenus au cours des différentes expériences de stimulations gonadotropes ont été traités selon le modèle de l'anova. Le modèle utilisé est une anova 2 (modèle croisé mixte) en bloc aléatoire, il n'y a donc pas de réplicats ni de résiduelle.

Les différences significatives sont ensuite testées par contraste de Scheffé.

*Résultats et
discussion*

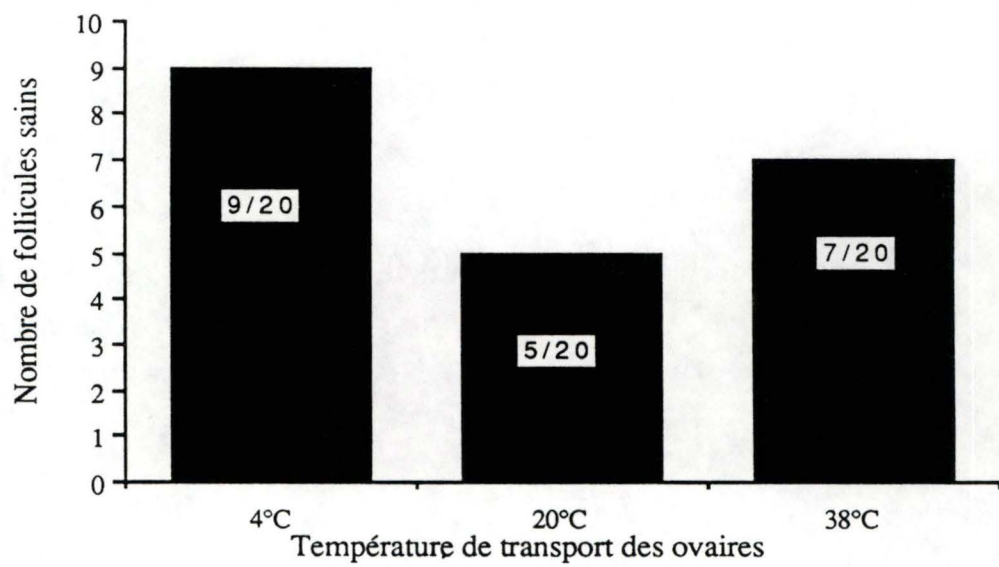


FIGURE 1 : Nombre de follicules sains en fonction de la température de transport des ovaires.

1. RAPPEL DES OBJECTIFS

Ce travail poursuit un double but, dans un premier temps, le choix d'une température de transport des ovaires (4, 20 ou 38°C) favorisant la survie des follicules en culture et, dans un second temps, l'étude de la dynamique de sécrétion des follicules en culture, en réponse à des stimulations par les gonadotropines hypophysaires.

2. PRELIMINAIRE

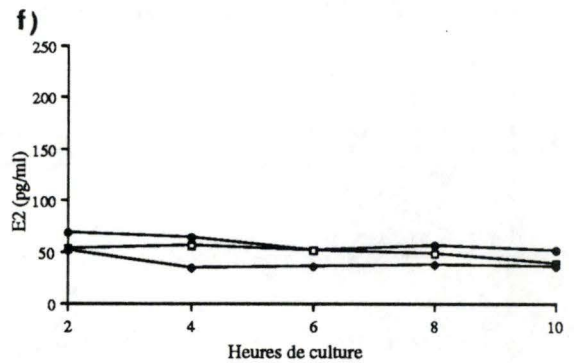
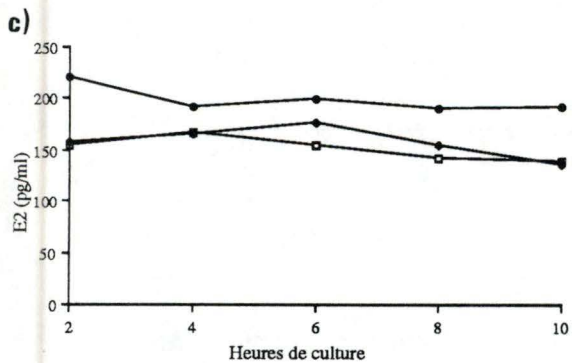
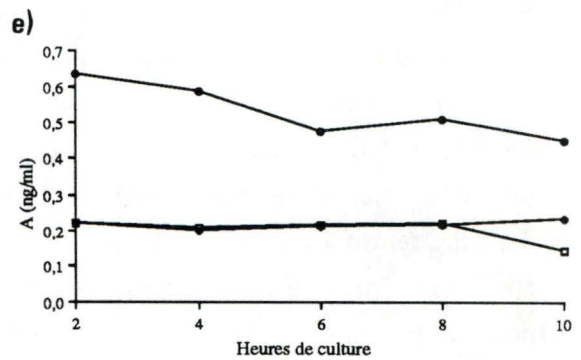
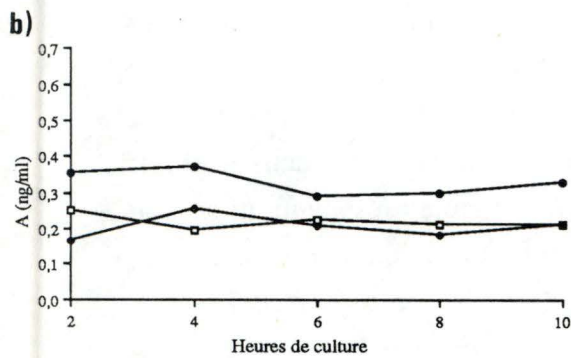
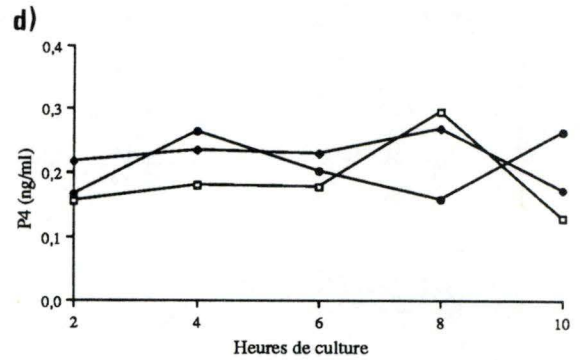
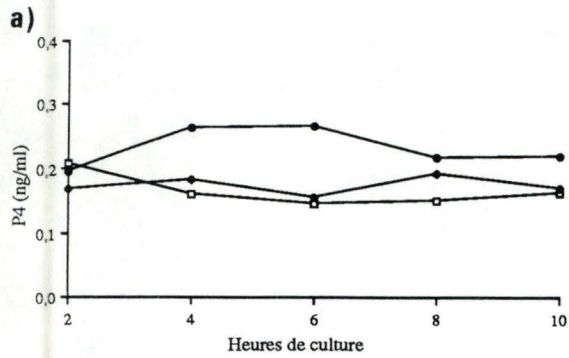
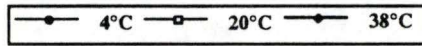
Lors de la dissection et de la mise en culture, il nous est impossible de déterminer l'état physiologique du follicule, sain, en atresie précoce ou en atresie avancée. Nous avons, pour cette raison, procédé à un tri des follicules après chaque culture. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur les travaux de Bellin et Ax (1984) qui ont déterminé que le rapport des concentrations en E₂ sur les concentrations en P₄ dans le fluide folliculaire reflète l'état physiologique du follicule. Un follicule présentant un rapport E₂/P₄ supérieur à 1 est jugé sain, tandis que pour un rapport inférieur à 1, il sera classé atretique. La corrélation significative existant entre la production in vitro d'E₂ par le follicule et la concentration en E₂ dans le fluide folliculaire ou dans la veine ovarienne (Webb et Gauld, 1985 : cités par Webb et al., 1989) nous permet d'utiliser cette méthode. Ce premier classement est confirmé par une étude histologique de la granulosa. Seuls les follicules ne présentant aucun signe de pycnose sont considérés sains.

3. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE DE TRANSPORT

3.1. PLAN EXPERIMENTAL

Une trentaine d'ovaires sont prélevés à l'abattoir et répartis aléatoirement en trois groupes de dix. Chaque groupe est conservé jusqu'à la mise en culture dans du milieu maintenu soit à 4°C dans de la glace, soit à 20 ou à 38°C dans de l'eau portée préalablement à cette température et placée dans un thermos.

De retour au laboratoire, cinq follicules de chaque groupe sont disséqués et mis en culture. Le milieu périfusé est recueilli pendant 20 minutes toutes les deux heures, ce qui nous permet d'obtenir des échantillons de 2 ml (quantité nécessaire pour la réalisation des dosages). La durée de culture choisie est de 10 heures.



FIGURES 2 : Moyenne des sécrétions de chaque stéroïde, par des follicules provenant d'ovaires transportés à 4, 20 et 38°C, en fonction du temps de culture.

- a) Sécrétion moyenne de progestérone par les follicules sains
- b) Sécrétion moyenne d'androstènedione par les follicules sains
- c) Sécrétion moyenne d'oestradiol par les follicules sains
- d) Sécrétion moyenne de progestérone par les follicules atrétiques
- e) Sécrétion moyenne d'androstènedione par les follicules atrétiques
- f) Sécrétion moyenne d'oestradiol par les follicules atrétiques

Ce temps est estimé suffisant pour pouvoir étudier la cinétique de réponse des follicules aux stimulations hormonales, objet des expériences ultérieures. Cette expérience a été répétée quatre fois.

3.2. RESULTATS

Au total des quatre cultures réalisées nous constatons que des 20 follicules provenant des ovaires transportés à 4°C, 20°C et 38°C, respectivement 9, 5 et 7 se sont avérés sains tout au long de la culture (figure 1). Ces différences ne sont toutefois pas significatives.

L'étude des sécrétions hormonales des *follicules ne présentant aucun signe d'atrésie* révèle que les taux moyens de progestérone (figure 2a) les plus importants (0,32 ng/ml) sont obtenus à une température de transport de 4°C. A 38 et 20°C nous obtenons des taux moyens plus faibles, respectivement 0,21 ng/ml et 0,16 ng/ml.

Il en est de même pour l'androstènedione (figure 2b) dont les sécrétions moyennes sont plus importantes pour les follicules provenant d'ovaires transportés à 4°C (0,28 ng/ml) que pour ceux transportés à 20 ou 38°C (0,20 ng/ml).

Les taux de sécrétion d'oestradiol (figure 2c) les plus élevés durant l'entièreté de la culture sont ceux provenant des follicules transportés à 4°C. En effet, à cette température nous obtenons des taux moyens avoisinant 190 pg/ml. Par contre à 20 et 38°C, les sécrétions moyennes se maintiennent aux alentours de 150-160 pg/ml.

Quelle que soit la température de transport, pour les trois hormones, les niveaux de sécrétion restent relativement constants pendant les 10 heures de périfusion, ce qui rend compte d'un bon fonctionnement des cellules folliculaires durant l'entièreté de la culture.

Le transport à 4°C permet cependant le maintien des sécrétions folliculaires des trois hormones stéroïdiennes à un niveau plus élevé que les transports à 20 ou à 38°C.

Pour les *follicules atrétiques*, on remarque que le niveau moyen de progestérone (figure 2d) émise dans le milieu est sensiblement identique à celui des follicules sains et ce, à toute température.

En ce qui concerne les sécrétions d'androstènedione (figure 2e), aucune différence importante, par rapport aux follicules sains, n'est constatée à 20°C ou à 38°C. Par contre, à 4°C, le niveau moyen est plus élevé tant par rapport aux mêmes types de follicules transportés à des températures différentes que par rapport aux follicules sains.

Quelle que soit la température de transport, les sécrétions d'oestradiol se situent dans une zone nettement inférieure à celle des follicules sains (figure 2f), soit aux environs de 50 pg/ml .

Nous présentons ici une analyse purement descriptive de nos résultats. Nous n'avons pas réalisé d'analyse statistique dans ce cas-ci car le nombre de follicules déterminés sains, totalement incontrôlable, est différent dans chacun des groupes.

3.3. DISCUSSION

Pour les trois températures testées, les complexes enzymatiques responsables de la production des stéroïdes sont actifs au cours de la culture. En effet, nous n'observons pas la diminution exponentielle des sécrétions stéroïdiennes qui devrait se produire s'il s'agissait d'une diffusion simple des stéroïdes du fluide folliculaire vers le milieu, jusqu'à épuisement de ceux-ci (Bahr et al., 1980).

Des trois températures testées, 4°C permet un maintien plus élevé des sécrétions stéroïdiennes durant la totalité de la culture, tandis que très peu de différences existent entre les sécrétions des follicules transportés à 20 et à 38°C. Le transport des ovaires à 4°C semble donc influencer positivement le comportement des follicules sains en culture, en permettant un meilleur maintien des fonctions enzymatiques et métaboliques.

Lors du transport, les ovaires sont privés de l'apport sanguin d'oxygène et de nutriments. Bien qu'ils soient conservés dans du milieu de culture, celui-ci n'est ni renouvelé, ni évacué, ni oxygéné ce qui peut provoquer l'accumulation de métabolites non désirés ainsi qu'un épuisement des réserves si les cellules poursuivent leur métabolisme.

Le refroidissement à 4°C ralentirait le métabolisme des cellules constitutives du follicule, favorisant de la sorte une meilleure conservation des capacités cellulaires jusqu'au retour des bonnes conditions physiologiques lors de la mise en culture. En outre, les températures de 20 et 38°C sont moins facilement contrôlables et donc plus variables.

De plus, les sécrétions d'androstènedione des follicules atrétiques transportés à 4°C sont relativement élevées, ce qui indique qu'à cette température, l'atrésie folliculaire est moins avancée qu'à 20 ou 38°C. Effectivement, une des premières étapes du processus d'atrésie est la perte de l'aptitude à aromatiser les androgènes en oestrogènes, avec comme conséquence une diminution des taux d'oestradiol et en une accumulation d'androgènes ; par contre, lorsque l'atrésie atteint des stades tardifs, c'est la totalité de la

production stéroïdienne qui diminue. Ceci explique pourquoi les follicules atrétiques transportés à 4°C sécrètent plus d'androstènedione que les sains à cette même température.

Ces résultats suggèrent que le transport à 4°C est plus favorable au bon fonctionnement physiologique et enzymatique des follicules. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Skinner et Osteen (1988), ainsi que par Sirois et al. (1990). En réalité ce sujet est à l'heure actuelle encore très controversé car d'autres auteurs travaillent à 38°C (Peluso et Hirschel, 1987; Anderson, 1989) et obtiennent de bons résultats. Timmermans et Dessy (1990, résultats non publiés) ont également montré qu'en dessous de 20°C, aucune maturation ovocytaire n'était possible ce qui n'est pas prépondérant dans le cadre de nos recherches.

Un point important à signaler est la forte différence existant entre les quantités d'oestradiol émises par les follicules sains et atrétiques quelle que soit la température. Cette constatation est en accord avec la littérature en ce sens que l'atrésie débute par la perte de l'activité aromatasique, ce qui nous permet de nous baser sur les sécrétions d'oestradiol pour juger du bon fonctionnement physiologique des follicules.

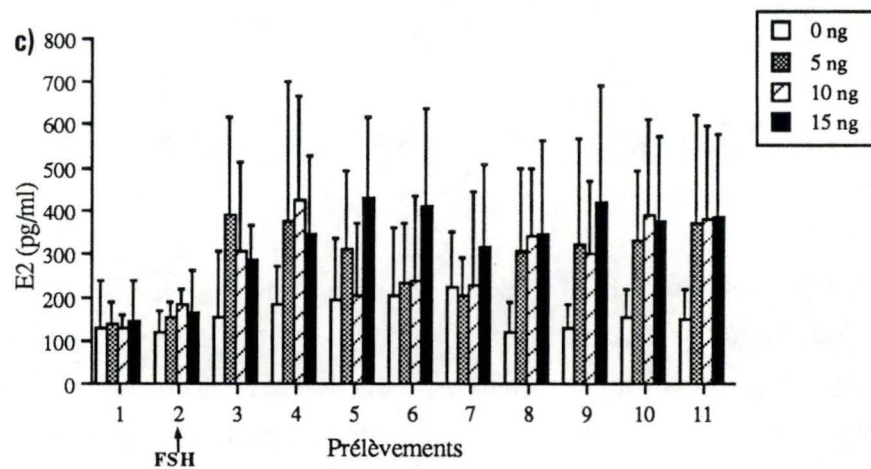
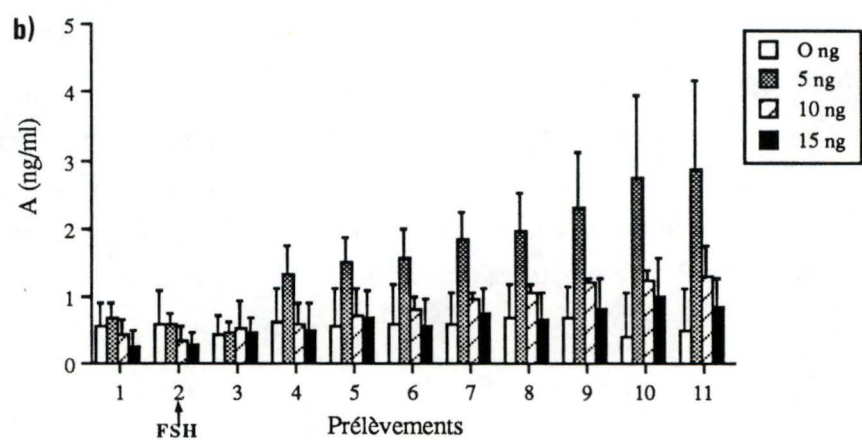
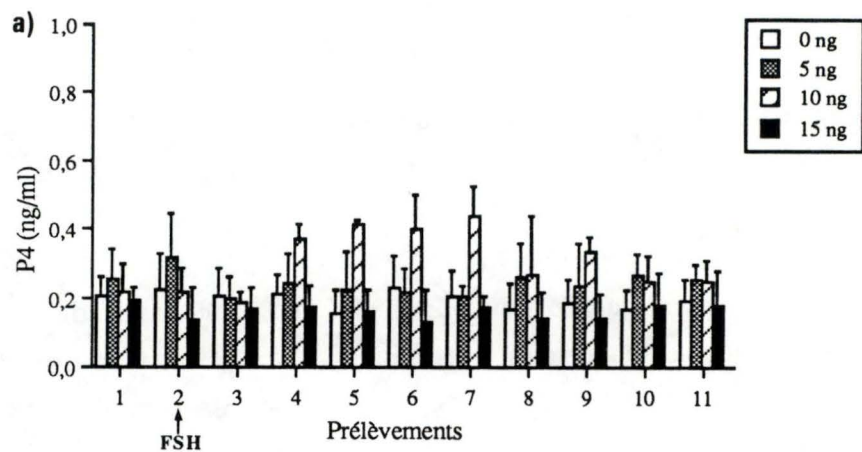
3.4. CONCLUSION

Nous avons opté pour une température de transport des ovaires de 4°C. Cette température présente en effet, par rapport aux deux autres températures testées, certains avantages tels que sa stabilité, le meilleur maintien des niveaux de sécrétion des stéroïdes et de la structure histologique de la granulosa.

4. STIMULATIONS PAR LES GONADOTROPINES HYPO-PHYSAIRES

Au total six, essais ont été réalisés au cours des mois de janvier et février, période pendant laquelle tous les ovaires récoltés provenaient de brebis en cycle, comme en témoignaient la présence de corps jaunes récents et de traces d'ovulation.

Dans aucun cas nous n'étudierons le comportement des follicules atrétiques dont les sécrétions sont basses et peu variables.



FIGURES 3 : Moyenne des sécrétions de chaque stéroïde, par des follicules soumis à différentes doses de FSH, en fonction du temps (prélèvements).

a) Sécrétion moyenne de progestérone

b) Sécrétion moyenne d'androstènedione

c) Sécrétion moyenne d'oestradiol

4.1. INFLUENCE DE STIMULATIONS PAR LA FSH

4.1.1. Plan expérimental

Pour chacune des trois expériences réalisées, nous avons mis en culture vingt follicules dont cinq témoins, c'est-à-dire ne recevant aucune stimulation de FSH, et quinze autres stimulés par une dose précise de FSH à un moment déterminé de la culture.

Une heure après le début de l'expérience, cinq follicules sont périfusés par du milieu contenant 5 ng/ml de FSH, cinq autres par du milieu en contenant 10 ng/ml et les cinq derniers avec 15 ng/ml ; la stimulation dure une heure.

La durée totale de la culture est de 5H30, temps suffisant pour tester l'effet de la FSH. Le milieu périfusé est recueilli pendant 20 minutes toutes les 30 minutes, ce qui correspond en définitive à onze prélèvements. La fréquence des prélèvements est augmentée de façon à rendre possible une étude de la dynamique de sécrétion des follicules.

4.1.2. Résultats

Au terme des trois expériences réalisées, nous avons déterminé sains 6 des 15 follicules témoins mis en culture, ainsi que 5, 5 et 7 des 15 follicules recevant une dose de respectivement 5, 10 et 15 ng/ml de FSH .

L'observation des taux de progestérone émise (figure 3a) nous indique que les sécrétions moyennes des *follicules témoins* et stimulés à 5 ou 15 ng/ml sont peu variables au cours de la culture (variations non significatives). Par contre, les *follicules stimulés* à 10 ng/ml semblent augmenter leurs sécrétions de progestérone une heure après la stimulation et ce durant 1H30, cette augmentation n'est toutefois pas significative.

Le niveau moyen d'androstènedione (figure 3b) des *follicules témoins* ne varie pas significativement au cours de la culture. Celui des *follicules stimulés* à 10 ou 15 ng/ml présente une légère augmentation (non significative), tandis qu'en ce qui concerne les follicules stimulés à 5 ng/ml, le niveau moyen d'androstènedione augmente progressivement dès le quatrième prélèvement, une heure après la stimulation, pour atteindre un taux proche de 3 ng/ml. Ce taux atteint est significativement différent ($P < 0.05$) du taux précédant la stimulation (0,68 ng/ml).

En ce qui concerne l'oestradiol (figure 3c), l'observation de la dynamique de sécrétion des follicules sains du début à la fin de la culture montre qu'en moyenne, les *follicules témoins* présentent des taux avoisinant 170 pg/ml, taux ne variant pas significativement tout au long de la culture.

Les *follicules stimulés* par la FSH, quant à eux, présentent une augmentation nette et significative des taux d'oestradiol sécrétés.

Quelle que soit la concentration de FSH administrée, il semble que les sécrétions d'E₂ évoluent par vagues. Si on compare les résultats obtenus avec les différentes concentrations de FSH, on remarque que pour les follicules stimulés par de la FSH à 5 ng/ml, l'augmentation des sécrétions d'oestradiol est brusque et significative 30 minutes après la stimulation (P<0.05). Les follicules stimulés par 10 ng/ml de FSH présentent une augmentation moins brusque, mais significative (P<0.05) après 30 minutes également. Au sein du troisième groupe de follicules, stimulés par de la FSH à 15 ng/ml, les sécrétions d'E₂ suivent une augmentation plus progressive, significative après une heure (P<0.05). Seule la concentration de 15ng/ml de FSH induit une augmentation des niveaux d'oestradiol significative pendant la totalité de la culture. En effet, pour les 2 autres concentrations, on observe une diminution significative des taux d'oestradiol aux prélèvements 6 et 7 pour 5 ng/ml et 5, 6 et 7 pour 10 ng/ml.

4.1.3. Discussion

En ce qui concerne les sécrétions de progestérone, les taux sécrétés par les follicules stimulés à 10 ng/ml s'élèvent pendant un certain temps pour revenir ensuite au niveau de départ. Ces résultats tendent à montrer que la FSH stimule les enzymes catalysant l'étape de conversion de pregnenolone en progestérone, comprenant le 3 β -OH steroïdeshydrogenase (3 β -HSD). Ceci concorde avec les résultats de Fanjul et al. (1984) qui ont montré que la FSH seule est capable de stimuler l'activité de cet enzyme. Aux autres concentrations, les taux de progestérone sont relativement constants ce qui suggère que la progestérone est continuellement synthétisée et transformée en androstènedione, elle-même transformée en oestradiol.

Du point de vue de l'androstènedione, de même que pour la progestérone, l'effet de la stimulation n'est pas très marqué. De fait, avec 15 et 10 ng/ml, les niveaux varient très faiblement. Cependant, on remarque une hausse progressive du taux émis par les follicules stimulés à 5 ng/ml. Cette accumulation d'androstènedione rend compte de l'action de la FSH au niveau des enzymes intervenant dans la conversion de progestérone en androgènes. Cet effet a été observé in vitro notamment par Roy et Greenwald (1987) et Demuyneck (1990).

Quelle que soit la dose de FSH administrée, celle-ci provoque une augmentation des taux d'oestradiol sécrétée par les follicules en culture. Ces résultats concordent avec les données de la littérature qui mettent en évidence l'action de la FSH in vitro sur le complexe aromatasé, et de ce fait sur la stimulation de la synthèse d'oestradiol (Steinkampf et al., 1987 ; Terqui et al., 1988). L'activité aromatasé présentant une légère augmentation avec la taille du follicule, on pourrait penser que l'effet de la FSH soit variable suivant la taille folliculaire, mais Skinner et al. (1988) ont montré que ce n'était pas le cas.

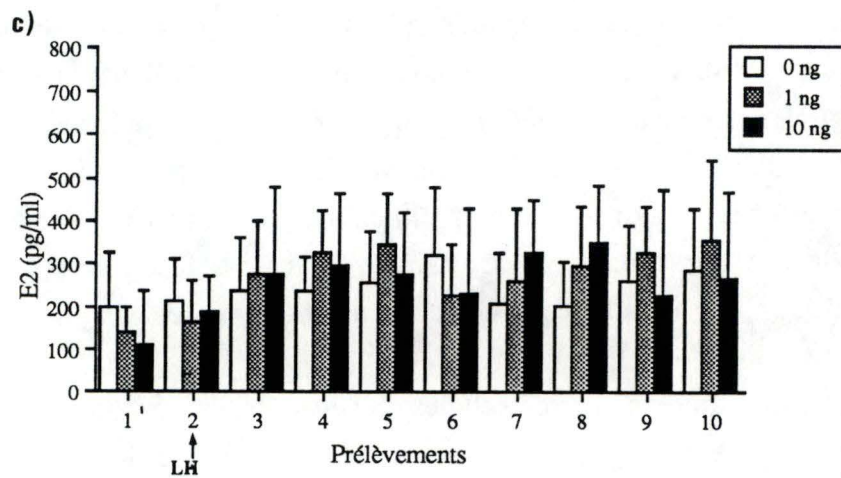
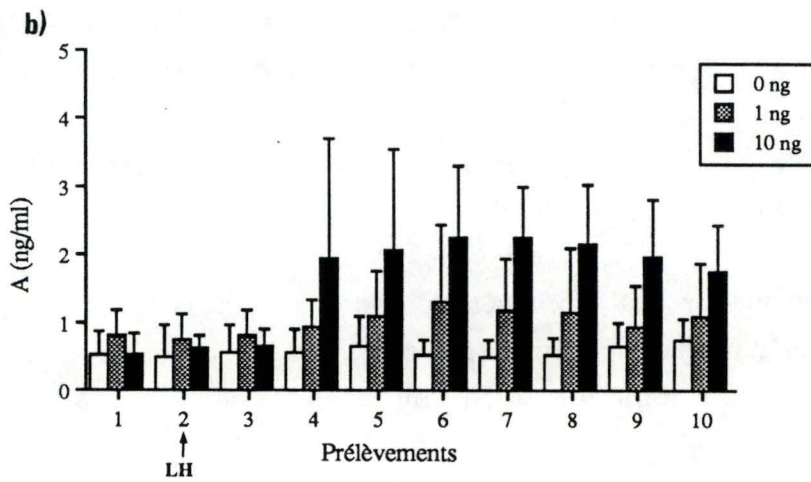
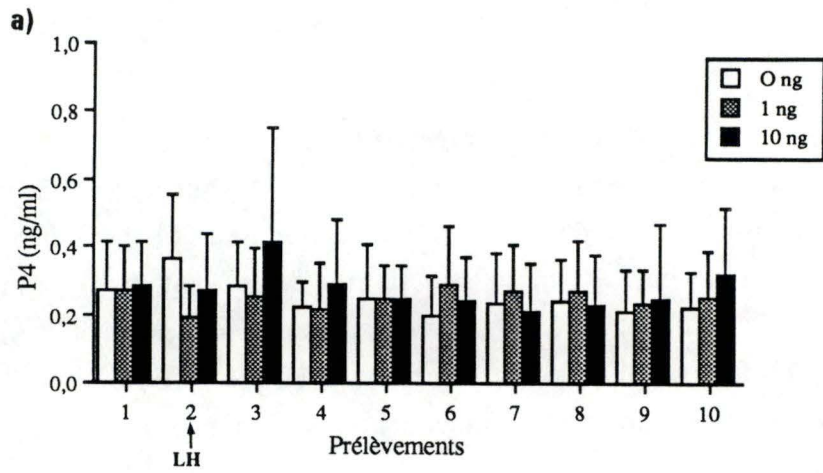
La réponse à la stimulation semble se manifester sous forme de vagues, ce qui peut être dû à la pulsativité naturelle de l'émission de l'oestradiol qui, comme l'ont montré Mc Neilly et al. (1984), est dépendante de la sécrétion pulsatile de FSH. Cette pulsativité, faible, n'est pas décelable dans la circulation périphérique mais bien au niveau de la veine ovarienne.

La FSH stimule donc les trois grandes étapes de la biosynthèse des stéroïdes dans le sens d'une production accrue d'oestradiol.

Outre l'augmentation des taux d'oestradiol sécrétée dans le milieu, la FSH maintient ces taux à un niveau supérieur à celui précédant la stimulation. Ceci est plus marqué en ce qui concerne la stimulation à 15 ng/ml.

L'effet de la FSH semble donc être dépendant de la dose, la stimulation à 15 ng/ml induisant une augmentation progressive des taux d'oestradiol sécrétée, mais légèrement plus stable et plus durable que celles à 5 ou 10 ng/ml. Ces taux ne dépassent pas de beaucoup le taux de base de la FSH plasmatique, qui est de 5 à 6 ng/ml chez la brebis (Derivaux et Ectors, 1986). La plupart des auteurs utilisent d'ailleurs des doses supérieures à 10 ng/ml, notamment Roy et Greenwald (1987) qui n'ont observé un effet significatif que pour les doses atteignant 25 ng/ml. Kessel et al. (1987) préconisent 55 ng/ml comme dose effective maximale pour la stimulation de l'activité aromatasé de cellules granulosales de rats immatures. Certains vont même jusqu'à 100 ng/ml (Amsterdam et al., 1988) pour les cultures de cellules granulosales porcines.

Après 24 heures de culture in vitro de cellules granulosales, l'aromatasé est altérée de par l'absence des agents régulateurs requis pour maintenir la production d'oestrogènes. Skinner et al. (1988) ont montré que la FSH est un important régulateur stimulant l'activité aromatasé et maintenant le développement des cellules granulosales. La FSH réduit le taux de follicules atrétiques et augmente le contenu en DNA des cellules granulosales, ainsi que leur activité mitotique (Roy et Greenwald, 1989). Il serait donc



FIGURES 4 : Moyenne des sécrétions de chaque stéroïde, par des follicules soumis à différentes doses de LH, en fonction du temps (prélèvements).

a) Sécrétion moyenne de progestérone

b) Sécrétion moyenne d'androstènedione

c) Sécrétion moyenne d'oestradiol

intéressant d'enrichir le milieu de culture avec de la FSH, ne fût-ce que pour maintenir l'intégrité et la fonction des cellules granulosales.

4.1.4. Conclusion

La FSH stimule l'activité de l'aromatase, ce qui se traduit par une élévation des taux d'oestradiol émise par les follicules lors de la périfusion. De plus, elle agit également au niveau des étapes précédentes, formation de progestérone et d'androstènedione.

Lors des expériences ultérieures nécessitant l'intervention de FSH, nous utiliserons cette dernière à une concentration de 15 ng/ml, concentration permettant la meilleure succession des différentes étapes de la biosynthèse d'oestradiol sans accumulation d'intermédiaires et favorisant donc un métabolisme rapide des stéroïdes par les complexes enzymatiques impliqués.

4.2. INFLUENCE DE STIMULATIONS PAR LA LH

4.2.1. Plan expérimental

Trois essais de ce type ont été réalisés au cours desquels 15 follicules ont été mis en culture pour une durée totale de 5 heures. Le milieu périfusé est recueilli de la même façon que lors de l'expérience précédente (point 4.1.1.).

Les 15 follicules mis en culture sont répartis en trois groupes de cinq, un groupe témoin ne recevant aucune stimulation, un groupe recevant du milieu contenant 1 ng/ml de LH et le troisième périfusé avec du milieu contenant 10 ng/ml de LH. La stimulation de LH est envoyée après 30 minutes de culture et ce pendant 20 minutes, durée déterminée en fonction du temps de demi-vie de l'hormone in vivo.

4.2.2. Résultats

Pour les trois essais, nous avons retenu 12, 12, et 9 follicules sains provenant des trois groupes stimulés à 0, 1 et 10 ng/ml respectivement.

Globalement, quel que soit le groupe de follicules considéré, les sécrétions de progestérone ne subissent aucune variation significative (figure 4a).

Le niveau moyen de sécrétion d'androstènedione (figure 4b) des *follicules témoins* est constant durant la totalité de la culture. Celui des *follicules stimulés* à 1 ng/ml présente une très légère augmentation (non significative), tandis que celui des

follicules stimulés à 10 ng/ml s'élève significativement ($P < 0.05$) environ une heure après la stimulation et se maintient à un niveau élevé jusqu'à la fin de la culture.

Les profils de sécrétion d'oestradiol montrent peu de variations en ce qui concerne les *follicules témoins*. Dans le cas des *follicules stimulés*, on décèle une légère hausse des taux émis (figure 4c), ces différences ne sont toutefois pas significatives. Les sécrétions d'oestradiol semblent se développer sous forme de vagues.

4.2.3. Discussion

La production de progestérone ne semble pas influencée par la stimulation. Or, Roy et Greenwald (1989) constatent que la LH favorise la production de progestérone. On pourrait penser que, suite à notre stimulation par la LH, les follicules ont sécrété de la progestérone mais qui a été rapidement transformée en androstènedione, la LH stimulant préférentiellement le complexe enzymatique P450-17 α (Bogovich et Richards, 1984).

La stimulation à 10 ng/ml provoque une hausse significative des sécrétions d'androstènedione, ce qui confirme les données nombreuses de la littérature obtenues par cultures de cellules et notamment, les résultats de Fortune (1986) qui observe une production triplée, voire quadruplée, d'androstènedione lors de la stimulation de cellules thécales en culture par de la LH à 10 ng/ml. Ces résultats sont tout à fait compréhensibles puisque les pulses de LH peuvent atteindre une amplitude de 5 ng/ml, voire de 10 ng/ml, et que le taux de base varie de 0,2 à 1 ng/ml.

Nous observons des taux d'oestradiol un peu plus élevés qu'en début de culture après la stimulation de LH et ce, quelle que soit la concentration administrée. De même, Eiler (1978) a observé que, suite à une stimulation de LH, les taux d'oestradiol mesurés au niveau de la veine ovarienne ne variaient pas significativement sauf dans les cas de follicules préovulatoires prélevés en phase folliculaire. La LH stimule, en effet, la synthèse d'oestradiol dans les follicules préovulatoires possédant des récepteurs à LH sur les cellules granulosales. Seulement un ou deux follicules par cycle sont donc capables de sécréter des quantités notables d'oestrogènes. Cependant, Hay et Moor (1973) ont montré qu'*in vitro* 20 % des follicules non destinés à ovuler sont capables de sécréter des oestrogènes. Ceci était probablement le cas lors de nos essais pour certains follicules puisqu'on décèle une légère hausse des taux d'oestradiol bien que non significative.

En ce qui concerne la concentration de LH administrée, nous obtenons les meilleurs résultats avec 10 ng/ml, concentration nécessaire d'après Jia et Hsueh (1984) afin

d'obtenir une stimulation maximale du nombre de récepteurs à LH des cellules granulosales, des doses plus hautes n'étant pas effectives. Roy et Greenwald (1987), travaillant sur le hamster, ont obtenu des résultats significatifs dès 1 ng/ml.

4.2.4. Conclusion

La stimulation par 10 ng/ml de LH provoque une augmentation significative des taux d'androstèdione par activation du complexe enzymatique P450-17 α au niveau des cellules thécales. Cet effet est beaucoup moins marqué pour 1ng/ml de LH. Dans aucun des deux cas l'augmentation ne se traduit par une production accrue d'oestradiol. Nous retiendrons la concentration de 10 ng/ml pour les expériences ultérieures.

5. INFLUENCE DE STIMULATIONS SUCCESSIVES

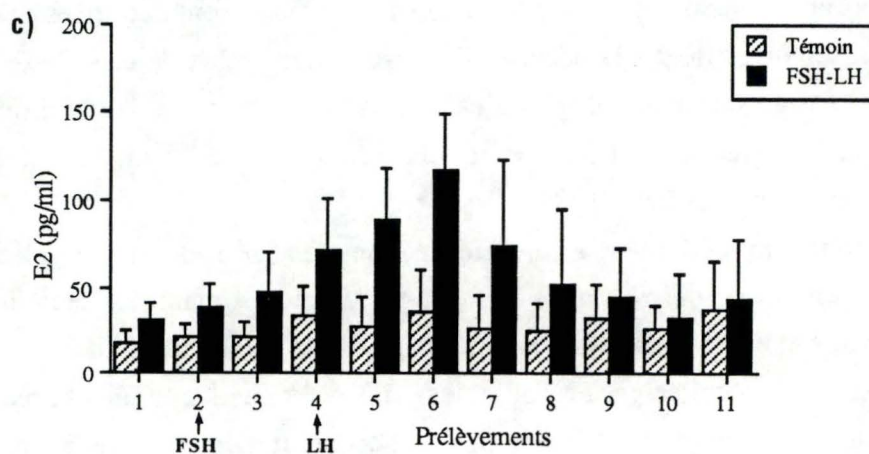
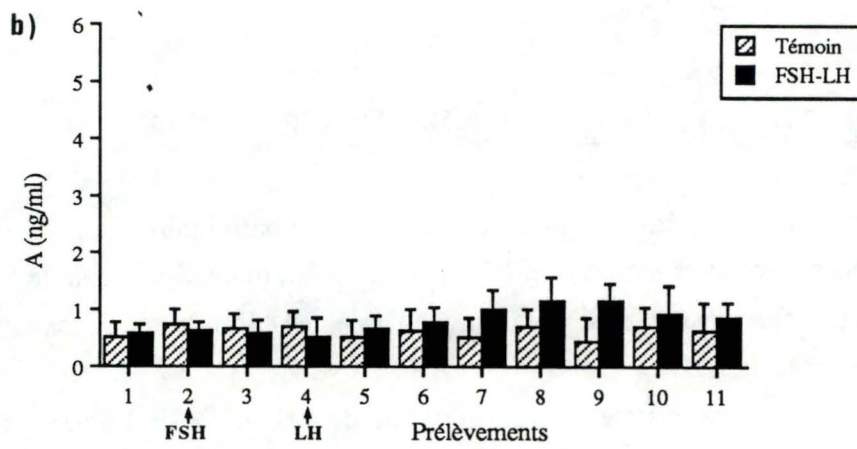
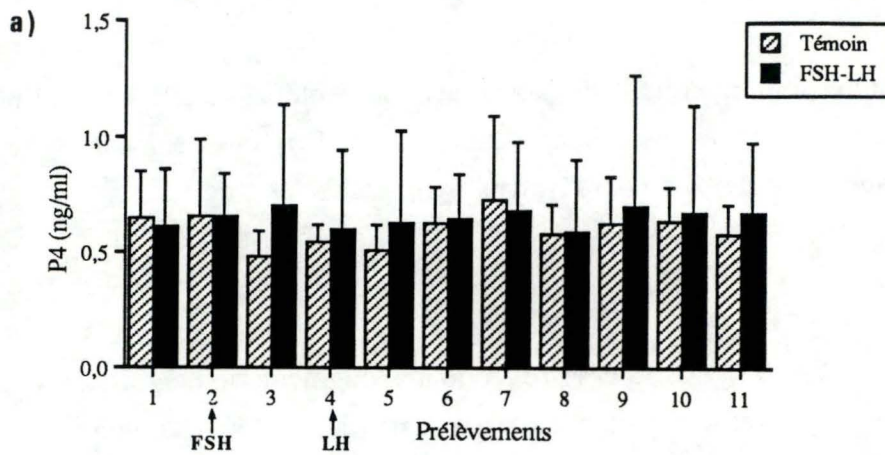
Au vu des résultats des expériences précédentes, il nous a paru intéressant de tester l'effet de stimulations successives par FSH et LH. Tout d'abord, une stimulation de FSH suivie de LH, ce qui permettrait une sensibilisation préalable des cellules granulosales par l'apparition de récepteurs à la LH.

L'expérience suivante consiste en une stimulation de LH suivie de FSH. Ce qui, d'après les résultats obtenus précédemment, favoriserait la production d'oestradiol par transformation de l'androstèdione élaborée suite à la stimulation de LH.

Un détail important concernant ces expériences est qu'elles se sont déroulées de fin mars à mi avril, ce qui correspond à la période d'anoestrus des brebis de race Texel et Suffolk. L'anoestrus est un état physiologique caractérisé par l'absence d'ovulation et causé par la réduction de la fréquence des pulses de LH (Scaramuzzi et Baird, 1979 : cités par Jacques, 1989 ; Armstrong et Britt, 1987).

Les expériences précédentes ayant été menées en période de "cyclicité ovarienne", période dénommée oestrus, nous avons jugé utile de comparer les sécrétions stéroïdiennes en oestrus et en anoestrus. Cette comparaison fera l'objet du point 6.

Le taux d'oestradiol sécrétée par les follicules sains étant beaucoup plus faible en anoestrus qu'en oestrus et le taux de progestérone étant constant d'une période à l'autre, nous n'avons pu nous baser sur le rapport E₂/P₄ pour déterminer l'état physiologique des follicules considérés. Nous nous sommes alors principalement axés sur l'état histologique des follicules en fin de culture, ainsi que sur leurs sécrétions d'oestradiol.



FIGURES 5 : Moyenne des sécrétions de chaque stéroïde, par des follicules soumis à une stimulation par la FSH (15 ng) puis par la LH (10 ng), en fonction du temps (prélèvements).

a) Sécrétion moyenne de progestérone

b) Sécrétion moyenne d'androstènedione

c) Sécrétion moyenne d'oestradiol

5.1. STIMULATION PAR FSH PUIS LH

5.1.1. Plan expérimental

Deux cultures de ce type ont été réalisées, comprenant chacune 16 follicules divisés en deux groupes, un groupe témoin et un groupe stimulé. La stimulation se déroule en deux temps. Après une heure de culture, les follicules sont périfusés pendant une heure par du milieu contenant 15 ng/ml de FSH et reçoivent ensuite du milieu contenant 10 ng/ml de LH durant 20 minutes.

Tout au long de la culture, dont la durée est de 5H30, onze prélèvements sont effectués comme décrit précédemment.

5.1.2. Résultats

L'étude histologique de la granulosa nous apprend qu'au total des 32 follicules, 9 et 8 sur 16 se sont avérés sains en fin de culture pour les groupes témoins et stimulés.

Le niveau de progestérone des *follicules témoins* ainsi que des *follicules stimulés*, présente de très légères variations, non significatives, autour d'une valeur moyenne de 0,6 ng/ml (figure 5a).

Le taux d'androstènedione produite par les *follicules témoins* varie peu (non significativement) autour d'une valeur moyenne de 0,5 ng/ml. Les *follicules stimulés* présentent une élévation de ce taux environ une heure après le début de la stimulation de LH (prélèvement 6). Cette augmentation se maintient à une valeur maximale, significativement supérieure ($P < 0.05$) aux valeurs précédant la stimulation, pendant une heure (prélèvements 8 et 9), puis les taux diminuent (figure 5b).

Le niveau d'oestradiol sécrété par les *follicules témoins* reste plus ou moins constant, fluctuant légèrement, de manière non significative, autour de 20-30 pg/ml au cours de la culture (figure 5c).

L'observation des sécrétions d'oestradiol par les *follicules stimulés* montre que, 30 minutes après la stimulation de FSH, le taux émis augmente progressivement, partant de 35 ng/ml, pour atteindre un maximum de 115 ng/ml deux heures après le début de la stimulation (prélèvement 6) et diminuer ensuite. Cette élévation des taux d'oestradiol est significative ($P < 0.05$) dès le prélèvement 4 et se maintient jusqu'au prélèvement 7.

5.1.3. Discussion

Suite à la double stimulation administrée aux follicules, les sécrétions d'oestradiol augmentent progressivement jusqu'au prélèvement 6 pour diminuer ensuite au moment où les sécrétions d'androstènedione augmentent, progressivement également, mais ne se maintiennent pas.

Ces résultats sont certainement dus à la stimulation, dans un premier temps, de l'activité du complexe aromatasé par la FSH et, dans un second temps, de l'activité du P450-17 α par la LH. L'effet de la FSH sur l'aromatasé est moins durable que lors des expériences réalisées en oestrus, ce qui est sans doute dû à la moindre activité du complexe aromatasé en cette saison.

In vivo, les cellules granulosales acquièrent des récepteurs à LH en réponse à une stimulation de FSH, et produisent alors de l'oestradiol sous l'effet de la LH. Nous n'observons pas ce phénomène lors de nos expériences, mais il faut souligner que, pour induire l'apparition ou l'augmentation de récepteurs à LH au niveau de cellules granulosales en culture, différents auteurs (Jia et Hsueh, 1984 ; Fanjul et al., 1984) incubent ces cellules pendant deux jours avec de la FSH à 10 ng/ml. La durée de notre stimulation de FSH est sans doute insuffisante que pour induire l'apparition de ces récepteurs.

D'après Fanjul et al. (1984), dans les cellules préalablement stimulées par de la FSH, la LH stimule l'activité de l'enzyme 3 β -HSD, c'est à dire la synthèse de progestérone or nous n'observons pas de variation des niveaux de progestérone sans doute parce qu'elle est convertie en androstènedione.

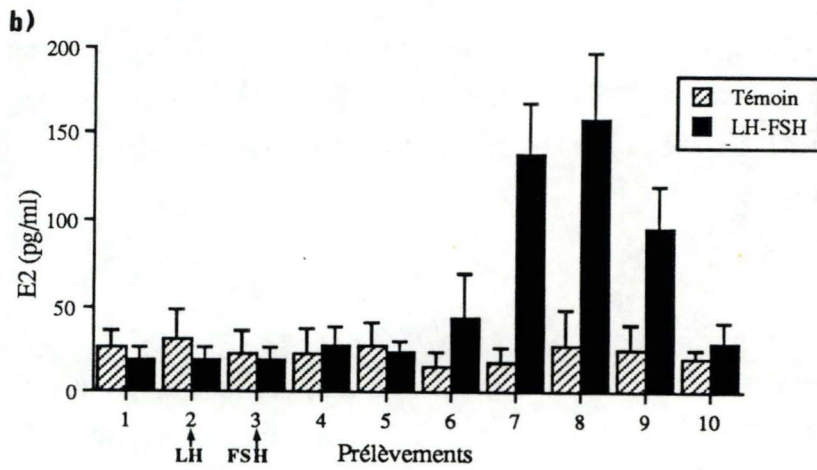
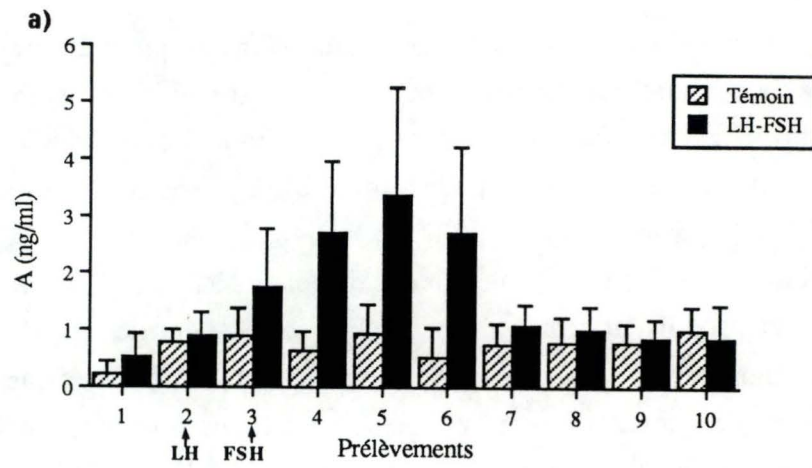
5.1.4. Conclusion

La double stimulation hormonale administrée aux follicules, FSH puis LH, provoque de leur part une réponse en deux temps. Premièrement, une augmentation des taux d'oestradiol due à la FSH et ensuite une hausse des taux d'androstènedione due à la LH. L'effet des deux hormones stimulantes étant ici indépendant, cette succession des gonadotropines ne présente aucun effet avantageux.

5.2. STIMULATION PAR LH PUIS FSH

5.2.1. Plan expérimental

Si ce n'est sur deux points, le plan expérimental suivi pour la réalisation de cette expérience est identique à celui du paragraphe 5.1.1.



FIGURES 6 : Moyenne des sécrétions de chaque stéroïde, par des follicules soumis à une stimulation par la LH (10 ng) puis par la FSH (15 ng), en fonction du temps (prélèvements).

a) Sécrétion moyenne d'androstènedione

b) Sécrétion moyenne d'oestradiol

Ces deux points sont la durée de la culture, qui est de 5 heures dans ce cas-ci, et l'ordre des stimulations. Après une heure de culture, les huit follicules concernés reçoivent du milieu contenant 10 ng/ml de LH pendant 20 minutes et ensuite, après 1H30 de culture, les follicules sont stimulés par de la FSH à 15 ng/ml pendant une heure.

5.2.2. Résultats

La détermination de l'état physiologique des follicules est effectuée suivant les mêmes critères que pour l'expérience précédente. Nous obtenons, après analyse des coupes histologiques, 6 follicules sains sur 16 témoins et 8 follicules sains sur 16 stimulés.

Des problèmes survenus lors des dosages de progestérone ne nous permettent pas de tenir compte de ce stéroïde lors de notre analyse.

Les concentrations d'androstènedione élaborée par les *follicules témoins* fluctuent très peu (non significativement) autour d'une valeur moyenne de 0,8 ng/ml (figure 6a). Le niveau de sécrétion d'androstènedione des *follicules stimulés* augmente progressivement à partir du troisième prélèvement (30 minutes après le début de la première stimulation) jusqu'à atteindre une valeur maximale de 3,35 ng/ml, significativement supérieure aux valeurs de départ, 1H30 après la stimulation de LH. Au prélèvement 7, le niveau est de nouveau aux valeurs de départ.

Les *follicules témoins* sécrètent un taux très peu variable d'oestradiol se situant en moyenne aux alentours de 25 pg/ml (figure 6b). Les *follicules stimulés* présentent une nette élévation des taux émis passant de 20-25 pg/ml à 140-160 pg/ml (valeurs significativement différentes, $P < 0.05$) deux heures après le début de la deuxième stimulation ; ce niveau élevé se maintient une heure environ.

5.2.3. Discussion

La diminution du taux d'androstènedione correspond exactement à l'élévation des taux d'oestradiol, ce qui démontre son utilisation comme substrat de l'aromatase. En plus de son action en tant que substrat, l'androstènedione augmente l'effet d'activation de l'aromatase par la FSH (Armstrong et al., 1980 : cités par Armstrong et al., 1987), ce qui provoque une production d'oestradiol plus importante. C'est ce que l'on observe effectivement dans ce cas, contrairement à l'expérience précédente où la stimulation de FSH précédait celle de LH.

Cet essai donne de meilleurs résultats que l'essai antérieur puisque la LH stimule, préalablement à la stimulation de l'activité aromatasase par la FSH, l'enzyme P450-17 α responsable de la formation d'androstènedione et limitant de la synthèse d'oestradiol, substrat de l'aromatase. L'activité du complexe aromatasase est alors stimulée par la présence de substrat en quantités importantes, et par la FSH dont l'action est elle-même augmentée par la présence d'androstènedione. En réalité, les androgènes induisent l'atrésie en l'absence de gonadotropines et favorisent par contre la stéroïdogènèse en leur présence (Kessel et al., 1987).

Un élément à ne pas négliger en vue d'une amélioration future de ces stimulations est l'augmentation de leur durée, ce qui permettrait un maintien des concentrations en oestradiol.

5.2.4. Conclusion

Lors de l'administration successive de LH puis de FSH, il y a coopération entre les deux gonadotropines pour la formation d'oestradiol. Une stimulation préalable à la LH favorise l'effet ultérieur de la FSH dans le sens d'une production accrue d'oestradiol. Cette combinaison de gonadotropines donne donc de meilleurs résultats que les stimulations uniques.

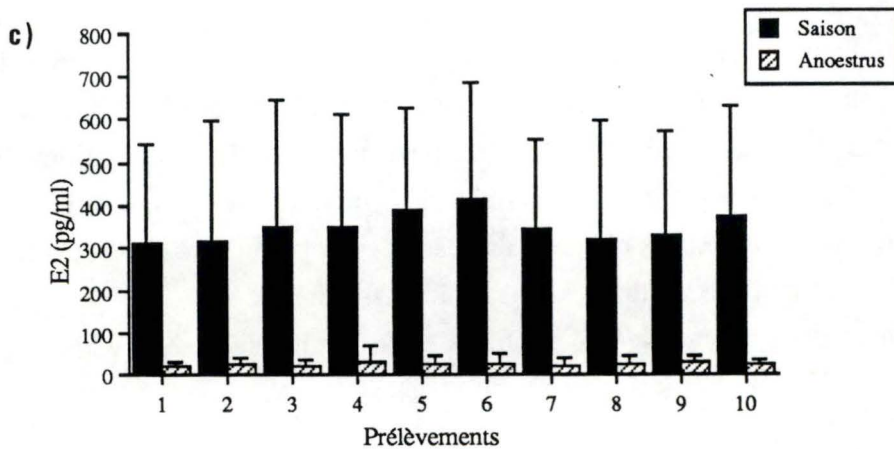
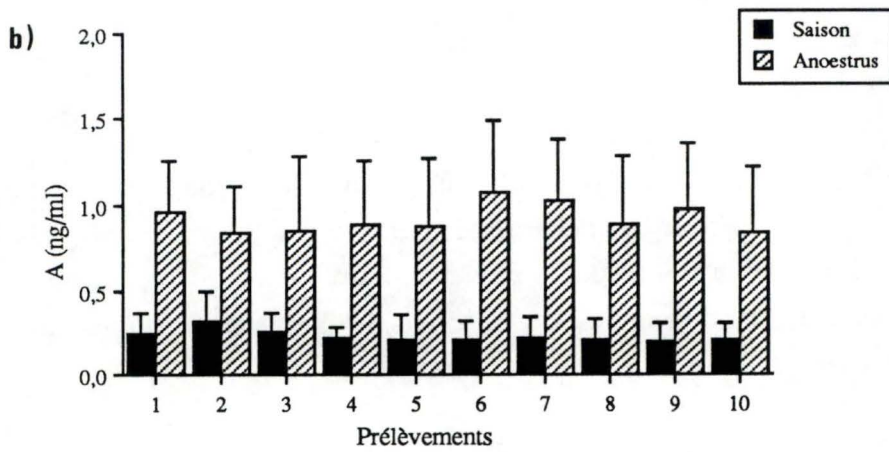
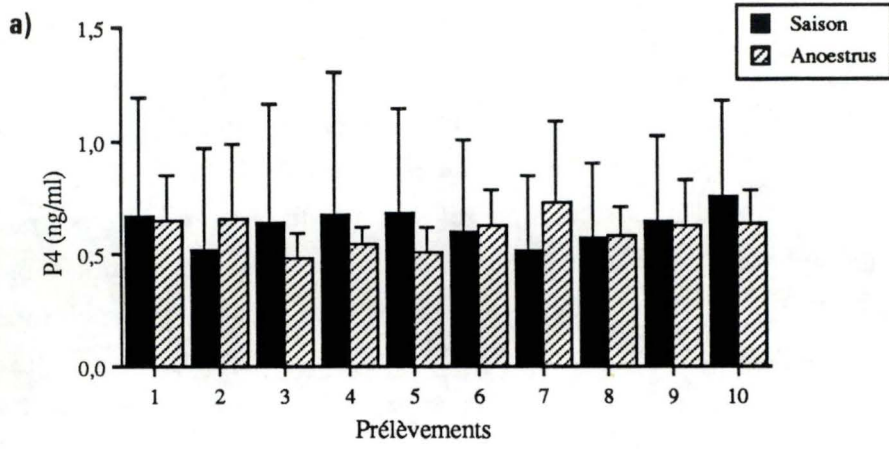
6. COMPARAISON DES SECRETIONS STEROIDIENNES EN PERIODE D' OESTRUS ET D'ANOESTRUS

Afin de comparer l'activité sécrétoire des follicules en culture d'une période à l'autre, nous avons rassemblé les résultats des expériences de stimulation par gonadotropines, ces expériences s'étant toutes déroulées dans les mêmes conditions. Plus précisément, nous avons comparé les sécrétions des follicules témoins (ne recevant aucune stimulation) des expériences réalisées en oestrus (point 4) et de celles réalisées en anoestrus (point 5). Au total dix cultures sont donc ici rassemblées.

Nous avons alors comparé les sécrétions des follicules sains en oestrus et en anoestrus.

6.1. RESULTATS

Les taux de progestérone émise se maintiennent pendant les 5 heures de culture aux environs de 0,5 ng/ml quelle que soit la période considérée (figure 7a).



FIGURES 7 : Moyenne des sécrétions de chaque stéroïde, par des follicules prélevés chez des brebis en cycle et en anoestrus, en fonction du temps (prélèvements).

- a) Sécrétion moyenne de progestérone
- b) Sécrétion moyenne d'androstènedione
- c) Sécrétion moyenne d'oestradiol

Le niveau moyen des sécrétions d'androstènedione (figure 7b) est plus faible pour les follicules provenant de brebis en *oestrus* (il se situe vers 0,2 ng/ml), que pour les brebis en *anoestrus* (vers 1 ng/ml) . Ces taux varient très peu au cours de la culture.

Contrairement à l'androstènedione, le taux d'oestradiol des follicules prélevés en période d' *oestrus* fluctue légèrement autour de 300 pg/ml et se maintient pendant les 5 heures de culture. Par contre en *anoestrus* , le niveau, peu variable également durant la culture, se situe seulement aux environs de 25 pg/ml (figure 7c)

6.2. DISCUSSION

Les résultats obtenus ne nous permettent pas de mettre en évidence un effet éventuel de la saison sur l'activité des enzymes responsables de la synthèse de progestérone et d'androstènedione, les $\Delta 5-3\beta$ HSD et P450-17 α .

La diminution de synthèse d'oestradiol ainsi que l'accumulation d'androstènedione, reflètent une insuffisance de l'activité de l'aromatase en anoestrus, ce qui confirme les données de Jacques (1989), et va à l'encontre de celles de Mc Natty et al. (1985) qui mesurent, en anoestrus, une activité aromatase similaire à celle obtenue au cours de la saison de reproduction, à condition de fournir les quantités appropriées de précurseurs.

D'après Webb et England (1982), l'absence de précurseurs serait une des causes principales de la faible émission d'oestradiol . Cette absence serait due à la déficience des cellules thécales en récepteurs à LH. Or nous n'observons pas, en anoestrus, de réduction dans la production des précurseurs de l'oestradiol, mais plutôt une accumulation de ceux-ci qui montre bien l'insuffisance du complexe aromatase.

Contrairement aux follicules atrétiques, qui manifestent une perte de l'aptitude à aromatiser les androgènes (Webb et Gauld, 1984), les follicules provenant de brebis en anoestrus gardent cette capacité, bien que fortement diminuée, puisqu'une stimulation par la FSH provoque une augmentation des taux d'oestradiol.

6.3. CONCLUSION

L'anoestrus est principalement caractérisé par une insuffisance, et non pas par une altération, de l'activité aromatase. Ceci est confirmé par le fait que les stimulations par les gonadotropines (points 5.1. et 5.2.) sont capables d'entraîner l'augmentation du taux d'oestradiol, n'atteignant toutefois pas les valeurs observées en saison de reproduction.

*Conclusion
générale*

Afin d'assurer un bon fonctionnement et d'augmenter le taux de survie de follicules en cultures, nous avons testé trois températures de transport des ovaires. Ce facteur semble en effet conditionner l'état histologique des follicules dès le prélèvement. Il semble également influencer leur état physiologique en culture. Les essais effectués suggèrent que la température de transport de 4°C est préférable aux autres températures testées (20 et 38°C), car elle permet sans doute aux follicules de ralentir leur métabolisme en attendant le retour aux conditions physiologiques.

Les follicules atrétiques avant la mise en culture présentent une diminution importante des taux de sécrétion d'oestradiol, ce qui rend compte de l'altération du complexe aromatasase ; les autres complexes ne semblent pas fortement altérés par l'atrésie.

Les stimulations hormonales réalisées par la suite se traduisent dans tous les cas par une variation des sécrétions stéroïdiennes, ce qui témoigne du maintien des capacités stéroïdogéniques des follicules en culture ainsi que de l'aptitude à répondre à des stimulations hormonales.

La **FSH** favorise le fonctionnement des trois grandes étapes de la stéroïdogénèse, à savoir, la production successive de progestérone, d'androstènedione et surtout d'oestradiol, via l'activation du complexe aromatasase.

La **LH** entraîne une production accrue d'androstènedione sans effet marqué sur la sécrétion des deux autres stéroïdes étudiés.

Ces résultats, obtenus en période d'oestrus, confirment les données de la littérature provenant d'études effectuées sur cultures de cellules.

Des différentes concentrations hormonales administrées, 15 ng/ml de FSH et 10 ng/ml de LH sont préférables en vue de mettre en évidence leur effet sur les dynamiques de sécrétion.

En ce qui concerne ces deux types d'essais, les follicules utilisés proviennent de brebis en anoestrus. Les résultats obtenus à la suite de stimulations successives par les deux gonadotropines montrent qu'une stimulation préalable par la **FSH** ne conditionne pas la réponse des follicules à une stimulation postérieure par la **LH**. Les sécrétions résultant de cette double stimulation correspondent globalement aux effets des deux gonadotropines administrées séparément.

Par contre, une stimulation par la **LH** suivie d'une autre par la **FSH** donne de bons résultats. La LH entraîne tout d'abord une production d'androstènedione, précurseur de l'oestradiol, ce qui favorise la synthèse d'oestradiol après stimulation à la FSH. Ceci est un bel exemple de l'interaction des cellules thécales et granulosales et rend compte de l'intérêt d'une étude sur des follicules entiers.

Le fait que certaines expériences se soient déroulées avec des follicules provenant de brebis en oestrus et d'autres en anoestrus nous a conduits à comparer les sécrétions des follicules témoins (ne recevant aucune stimulation) provenant de ces différentes périodes. La principale conclusion que nous pouvons en tirer est la diminution de l'activité du complexe aromatasase lors de l'anoestrus. Cette diminution n'est pas comparable à ce qui est observé en atrésie car, en anoestrus, une stimulation par la FSH peut encore entraîner une augmentation de la sécrétion d'oestradiol. Ceci témoigne de la conservation des capacités de ce complexe enzymatique. Par contre, dans les cas d'atrésie, la capacité d'aromatisation semble définitivement altérée.

Nous avons donc déterminé des concentrations permettant de visualiser l'effet des hormones utilisées sur les sécrétions stéroïdiennes de follicules en culture. Nous avons également déterminé un type de stimulation intéressant en prévision d'une étude approfondie et précise des effets de stimulations gonadotropiques sur des follicules prélevés à des moments déterminés du cycle oestral de la brebis.

Dans le cadre d'études futures, il serait intéressant :

- . de mettre au point une technique permettant d'analyser l'état des follicules avant la mise en culture afin de ne manipuler que les follicules sains ;
- . d'étudier l'évolution des capacités de réponse des follicules en fonction de la taille ;
- . d'entreprendre des essais de maturation folliculaire.

BIBLIOGRAPHIE

- Adler N.T.** (1981). Neuroendocrinology of reproduction. Plenum press, New York and London.
- Alberts B., Dennis B., Lewis J., Raff M., Roberts K. et Watson J.D.** (1990). Molecular biology of the cell. Garland Publishnig, Inc. New York & London, 2nd edition.
- Amsterdam A., May J.V. et Schromberg D.W.** (1988). Synergistic effect of insulin and Follicle-Stimulating Hormone on biochemical and morphological differentiation of porcine granulosa cells *in vitro*. Biology of reproduction, 39, 379-390.
- Anderson E.** (1989). *In vitro* and *in vivo* effects of androgens on rat ovarian granulosa cells. Am. J. Obstet. Gynecol., 160, 782-788.
- Armstrong D.T., Daniel S.A.J et Gore-Langton R.E.** (1987). Intra-ovarian actions of steroids in regulation of follicular steroid biosynthesis. In : Endocrinology and physiology of reproduction (Leung P.C.K., Armstrong D.T., Ruf K.B., Moger W.H. et Flieren H.G., eds), p. 177-195, Plenum Press, New York.
- Armstrong J.D. et Britt J.H.** (1987). Nutritionally-induced anoestrus in gilts : metabolic and endocrine changes associated with cessation and resumption of estrous cycles. J. Anim. Sci., 65, 508-523.
- Bahr J., Gardner R., Schenk P. et Shahabi N.** (1980). Follicular steroidogenesis : effects of reproductive condition. Biology of reproduction, 22, (4), 817-826.
- Baird D.T.** (1977). Synthesis and secretion of steroid hormones by the ovary *in vivo*., In : The ovary, 2nd edition, Zuckerman S., (3), p.305-357, Academic Press, New York.
- Beebe S.J., Segaloff D.L., Burks D., Beasley-Leach A., Limbird L.E. et Corbin J.D.** (1989). Evidence that cyclic Adenosine 3'5'-monophosphate dependent protein kinase activation causes pig ovarian granulosa cell differentiation, including increases in two type II subclasses of this kinase. Biology of reproduction, 41, 295-307.

- Bellin M.E. et Ax R.L.** (1984). Chondroitin sulfate : an indicator of atresia in bovine follicles. *Endocrinology*, 114, (2), 428-434.
- Bister J.L.** (1989). Physiologie spéciale, Tome 2, FUNDP Namur.
- Bister J.L. et Paquay R.** (1982). La sécrétion tonique de LH et de FSH au cours de l'anoestrus de la brebis Texel. *Arch. Int. Physiol.Biochim.*, 89, 29-30.
- Bister J.L. et Paquay R.** (1983). Fluctuations in the plasma levels of the follicle-stimulating hormone during estrous cycle, anestrus, gestation and lactation in the ewe : evidence for an endogenous rythm of FSH release. *Theriogenology*, 19, (4), 565-582.
- Bogovich K. et Richards J.S.** (1984). Androgen synthesis during follicular development : evidence that rat granulosa cell 17-ketosteroid reductase is independant or hormonal regulation. *Biology of reproduction*, 31,122-131.
- Cahill L.P.** (1984). Folliculogenesis and ovulation rate in sheep. In : *Reproduction in sheep*, p.92-93, Australian Academy of Sciences eds, Cambridge University Press.
- Channing C.P., Tanabe K., Chacon M. et Tildon J.T.** (1984). Stimulatory effects of follicle- stimulating hormone and luteinizing hormone upon secretion of progesterone and inhibin activity by cultured infant human ovarian granulosa cells. *Fertil. Steril.*, 42, 598-605.
- Chan W.K. et Tan C.H.** (1987). Induction of aromatase activity in porcine granulosa cells by FSH and cyclic AMP. *Endocrine Research*, 13, 285-299.
- Clarke I.J.** (1984). Neuroendocrine control of the ovine oestrous cycle. In : *Reproduction in sheep*, p.1-6, Ed Lindsay D.R., Cambridge University Press.
- Demuyneck F.** (1990). Mise au point d'une technique de culture *in vitro* de follicules ovariens de brebis. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de licencié en sciences biologiques. FUNDP Namur.
- Derivaux J. et Ectors F.** (1986). *Reproduction chez les animaux domestiques*, Cabay, Louvain-la-Neuve, 3^{ième} édition.

- Di Zerega G.S., Nixon W.E. et Hodgen G.D.** (1981). Suppression of Follicle-Stimulating Hormone dependent folliculogenesis during the primate ovarian cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 52, 451-456.
- Di Zerega G.S., Marrs R.P., Campeau J.D. et Kling O.R.** (1983). Human granulosa cell secretion of protein(s) which suppress follicular response to gonadotrophins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 56, 147-155.
- Driancourt M.A. et Cahill L.P.** (1984). Preovulatory follicular events in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 71, 205-211.
- Driancourt M.A., Gibson W.R. et Cahill L.P.** (1984). Follicular dynamics throughout the oestrous cycle in sheep. *Reprod. Nutr. Develop.* 25, 1-15.
- Driancourt M.A. Fry R.C., Clarke I.J. et Cahill L.P.** (1987). Follicular growth and regression during the 8 days after hypophysectomy in sheep. 79, 635-641.
- Dufour J., Cahill L.P. et Mauléon P.** (1979). Short and long term effects of hypophysectomy and unilateral ovariectomy on ovarian follicular populations in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 57, 301-309.
- Eckstein B. et Nimrod A.** (1977). Properties of microsomal Δ^4 -3-Ketosteroid 5α reductase in immature rat ovary. Inhibition by estradiol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 499, 1-9.
- Eiler H.** (1978). Effect of Luteinizing Hormone on ovarian release of steroids : ovarian vein sampling technique in conscious gilt. *American Journal of Veterinary Research*, 39, 1695-1698.
- England B.G., Dammer M.K., Webb R.** (1981). Relationships between follicular size and antral fluid steroid concentrations at three stages of the estrous cycle in ewe. *Biol. Reprod.* 24, 1068-1075.
- Erickson G.F., Magoffin D.A., Dyer C.A. et Hofeditz, C.** (1985). The ovarian androgen producing cells a review of structure function relationship. *Endocrine reviews*, 6, 371-399.

- Fanjul L.F., Ruiz de Galarreta C.M. et Hsueh A.J.W.** (1983). Progesterone augmentation of gonadotropin-stimulated progesterone production by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, 112, 405-407.
- Fanjul L.F., Ruiz De Galarreta C.M. et Hsueh A.J.W.** (1984). Estrogen regulation of progesterone biosynthetic enzymes in cultured rat granulosa cells. *Biology of reproduction*, 30, 903-912.
- Fortune J.E.** (1986). Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. *Biology of reproduction*, 35, 292-299.
- Fortune J.E. et Vincent S.E.** (1983). Progesterone inhibits the induction of aromatase activity in rat granulosa cells *in vitro*. *Biology of reproduction*, 28, 1078-1089.
- Goldring N.B., Durica J.M., Lifka J., Hedin, L., Ratoosh S.L., Miller, W.L., Orly J. et Richards J.S.** (1987). Cholesterol side-chain cleavage P450 messenger ribonucleic acid : evidence for hormonal regulation in rat ovarian follicles and constitutive expression in corpora lutea. *Endocrinology*, 120, 1942-1950.
- Goodman R.L., Reichert L.E., Legan S.J., Ryan K.D., Foster D.L. et Karsch F.J.** (1981). Role of gonadotropins and progesterone in determining the preovulatory oestradiol rise in the ewe. *Biol. Reprod.*, 25, 134-142.
- Gore-Langton R.E. et Daniel S.A.J.** (1990). Follicle-stimulating hormone and estradiol regulate antrum-like reorganization of granulosa cells in rat preantral follicle cultures. *Biology of reproduction*, 43, 65-72.
- Greenwald G.S.** (1989). Temporal and topographic changes in DNA synthesis after induced follicular atresia. *Biology of reproduction*, 41, 175-181.
- Gruenberg R. Steger R.W. et Peluso J.J.** (1983). Follicular development, steroidogenesis and ovulation within ovaries exposed *in vitro* to hormone levels which mimic those of the rat estrous cycle. *Biol. Reprod.*, 29, 1265-1275.
- Hafez H.S.E.** (1980). *Reproduction in farm animals* VW. Lea & Febiger, Philadelphia, 4th edition.

Hay M.F. et Moor R.M. (1973). The graafian follicle of the sheep : relationships between gonadotrophins, steroid production, morphology and oocyte maturation. *Ann. Biol. Bioch. Biophys.*, 13, 241-248.

Hickey G.J., Chen S., Besman M.J., Shively J.E., Hall P.F., Gaddy-Kurten D. et Richards J.S. (1988). Hormonal regulation, tissue distribution, and content of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid and enzyme in rat ovarian follicles and corpora lutea : relationship to estradiol biosynthesis. *Endocrinology*, 122, 1426-1436.

Hsueh A.J.W., Bicsak T.A., Jia X-C., Dhal K.D., Fauser B.C.J.M., Galway A.B., Czekala N., Pavlou S.N., Papkoff H., Keene J. et Boime I. (1989). Granulosa cells as hormone targets. In : *Recent progress in hormone research*, 45, 209-277.

Jacques E. (1989). Contrôle de la croissance terminale et de la maturation des follicules ovariens de brebis. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences, FUNDP Namur.

Jia X.C. et Hsueh A.J.W. (1984). Homologous regulations of hormone receptors : luteinizing hormone increases its own receptors in cultured granulosa cells. *Endocrinology*, 115, 2433-2439.

Jia C., Kessel B., Welsh T.H. et Hsueh A.J.W. (1985). Androgen inhibition of follicle-stimulating hormone-stimulated luteinizing hormone receptor formation in cultured rat granular cells. *Endocrinology*, 117, 13-22.

Jia X.C. et Hsueh A.J.W. (1986). Granulosa cell aromatase bioassay for follicle-stimulating hormone : validation and application of the method. *Endocrinology*, 119, 1570-1577.

Junqueira L.C., Carneiro J. et Long J.A. (1986). *Basic Histology*, Appleton-Century-Crofts, Norwalk, 5th edition.

Kessel B., Xiao-Chi J., Davoren B. et Hsueh A.J.W. (1987). The ovarian granulosa cells as a follicle-stimulating hormone target tissue. In : *Endocrinology and physiology of reproduction* (Leung P.C.K., Armstrong D.T., Ruf K.B., Moger W.H. et Flieren H.G., eds), p. 177-195, Plenum Press, New York.

- Kim I. et Greenwald G.S.** (1987). Stimulatory and inhibitory effects of progesterone on follicular development in the hypophysectomized Follicle-Stimulating Hormone/Luteinizing Hormone-treated hamster. *Biology of reproduction*, 36, 270-276.
- Kim I. et Greenwald G.S.** (1989). Effects of progesterone or Luteinizing Hormone on folliculogenesis in intact or hypophysectomized immature hamsters. *Biology of reproduction*, 40, 74-78.
- Leung P.C.K. et Armstrong D.T.** (1979). A mechanism for the intraovarian inhibitory action of estrogen on androgen production. *Biology of reproduction*, 21, 1035-1042.
- Liu Y.X. et Hsueh A.J.W.** (1986). Synergism between granulosa and theca-interstitial cells in estrogen biosynthesis by gonadotropin-treated rat ovaries : studies on the two cell, two gonadotropin hypothesis using steroid antisera. *Biology of reproduction*, 35, 27-36.
- Mandiki S.N.M.** (1991). Allaitement et reprise de l'activité reproductrice chez la brebis Texel. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences, FUNDP Namur.
- Martin C.R.** (1985). *Endocrine Physiology*, Oxford University Press.
- Mauléon P.** (1973). Modification expérimentale de l'apparition et de l'évolution de la prophase méiotique dans l'ovaire d'embryon de brebis. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 13, 89-102.
- McNatty K.P., Gibb M., Dobson c. et Thurley D.C.** (1981). Evidence that changes in luteinizing hormone secretion regulate the growth of the preovulatory follicle in the ewe. *J. Endoc.*, 90, 375-389.
- McNatty K.P., Hudson N.L., Gibb M., Ball K., Henderson K.M., Heath D.A., Lun S., Kieboom L.E.** (1985). FSH influences follicles viability, estradiol biosynthesis and ovulation rate in Romney ewes. *J. Reprod. Fert.*, 75, 121-131.

- Mc Neilly A.S., Fraser H.M. et Baird D.T.** (1984). Effect of immunoneutralization of LH releasing hormone on LH, FSH and ovarian steroid secretion in the preovulatory phase of the oestrus cycle of the ewe. *J. Reprod. Fert.*, 101, 213-219.
- Mc Neilly A.S., Jonassen J.A. et Fraser H.M.** (1986). Suppression of follicular development after chronic LHRH immunoneutralization in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, 76, 481-490.
- Noël B.** (1989). Etude de l'action de la PMSG sur les mécanismes d'ovulation de la brebis Suffolk. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de licencié en sciences biologiques, FUNDP Namur.
- Noël B., Bister J.L. et Paquay R.** (1991). Follicular events during the cycle in Suffolk ewes, communication présentée au colloque sur la maîtrise de la reproduction. Tours, France.
- Peluso J.J. et Hirschel M.D.** (1987). Role of gonadotropins and insulin in controlling steroidogenesis and growth of antral bovine follicles in perfusion culture. *Theriogenology*, 28, (4), 503-512.
- Peluso J.J., Delidow B.C., Lynch J. et White B.A.** (1991). Follicle-Stimulating Hormone and insulin regulations of 17β -estradiol secretion and granulosa cell proliferation within immature rat ovaries maintained in perfusion culture. *Endocrinology*, 128, (1), 191-196.
- Picton H.M., Tsonis C.G. et McNeilly A.S.** (1990). The antagonistic effect of exogenous LH pulses on FSH stimulated preovulatory follicle growth in ewes chronically treated with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *J. Endoc.*, 127, 273-283.
- Pierquin B.** (1991). Influence d'un progestagène (FGA) et de la PMSG sur la croissance des follicules ovariens chez la brebis Suffolk. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de licencié en sciences. FUNDP Namur.
- Rhodin J.A.G.** (1974). *Histology a text and atlas*. Ed. Oxford Univ. Press. New York.

- Robertson H.A.** (1977). Reproduction in the ewe and the goat. In : reproduction in domestic animals. Ed: Cole H.H. et Cupps E.T., 477-496. Academic Press. New York.
- Ronin C.** (1989). Les récepteurs des gonadotropines. Annales d'endocrinologie (Paris), 50, 388-398.
- Roy S.K. et Greenwald G.S.** (1987). *In vitro* steroidogenesis by primary to antral follicles in the hamster during the periovulatory period : effects of Follicle-Stimulating Hormone, Luteinizing Hormone and prolactin. Biology of reproduction, 37, 39-46.
- Roy S.K. et Greenwald G.S.** (1989). Hormonal requirements for the growth and differentiation of hamster preantral follicles in long-term culture. J. Reprod. Fert., 87, 103-114.
- Scaramuzzi R.J. et Radford H.M.** (1983). Factors regulating ovulation rate in the ewe. J. Reprod.Fert., 69, 353-367.
- Schomberg D.W., Williams R.F., Tyrey L. et Ulberg L.C.** (1978). Reduction of granulosa cell progesterone secretion *in vitro* by intraovarian implants of antiandrogen. Endocrinology, 102, (3), 984-987.
- Sharpe K.L., Bertero M.C., Lyon B.P., Muse K.W. et Vernon M.W.** (1990). Follicular atresia and infertility in rats treated with a gonadotropin-releasing hormone antagonist. Endocrinology, 127, 25-31.
- Sirois J., Kimmich T.L. et Fortune J.E.** (1990). Developmental changes in steroidogenesis by equine preovulatory follicles : effects of equine LH, FSH, and CG. Endocrinology, 127, (5), 2423-2430.
- Skinner M.K. et Osteen K.G.** (1988). Developmental and hormonal regulation of bovine granulosa cell function in the preovulatory follicle. Endocrinology, 123, 1668-1675.
- Steinkampf M.P., Mendelson C.R. et Simpson E.R.** (1987). Regulation by follicle stimulating hormone of the synthesis of aromatase cytochrome P450 in human granulosa cells, Molecular Endocrinology, 1, 465-471.

- Terqui M., Berthelot F. et Driancourt M.A.** (1988). Morphological and functional features of ovine follicles in perfusion with pulsatile hormone delivery. *Reprod. Nutr. Develop.*, 28, 1093-1104.
- Titeca E.** (1987) Etude des effets de l'immunisation contre l'androstènedione sur l'activité ovarienne de la brebis Texel. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de licencié en sciences biologiques, FUNDP Namur.
- Webb R. et England B.G.** (1982). Identification of the ovulatory follicle in the ewe : associated changes in follicular size, thecal and granulosa cell luteinizing hormone receptor, antral fluid steroids, and circulating hormones during the preovulatory period. *Endocrinology*, 110, 873-881.
- Webb R. et Gauld I.K.** (1984). Final maturation of the preovulatory follicle in the ewe. In : Période périovulatoire, Ed. Sarat-Baraut J. et Thibault CH., 21-31, Masson.
- Webb R., Gauld I.K. et Driancourt M.A.** (1989) Morphological and functional characterization of large antral follicles in three breeds of sheep with different ovulation rates, *J. Reprod. Fert.*, 87, 243-255.
- Williams R.H.** (1972). *Traité d'endocrinologie*, Ed. Flammarion Med. Sci., Paris.
- Yarney T.A., Sairam M.R., Bahargavi G.N., Downey B.R. et Srikanthakumar A.** (1989). Gonadotrophin-binding components in porcine follicular fluid. *J. Endoc.*, 124, 485-494.