Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Effets de la saison sur l'évolution du nombre de récepteurs à la LH et à la FSH sur les cellules de la Granulosa chez la brebis Suffolk

QUEWET, Benoit

Award date:
1993

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.

Download date: 02. May. 2026

FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTE DES SCIENCES

EFFETS DE LA SAISON SUR L'ÉVOLUTION DU NOMBRE DE RÉCEPTEURS A LA LH ET A LA FSH SUR LES CELLULES DE LA GRANULOSA CHEZ LA BREBIS SUFFOLK

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Licencié en Sciences
biologiques

QUEWET Benoît

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/72.44.20

Effets de la saison sur l'évolution du nombre de récepteurs à la LH et à la FSH sur les cellules de la granulosa chez la brebis Suffolk.

QUEWET Benoît

Résumé

Le but de ce mémoire était d'étudier l'évolution du nombre de récepteurs aux gonadotropines (LH et FSH) présent sur les cellules de la granulosa des follicules ovariens de brebis Suffolk durant une période de 17 jours suivant une synchronisation par un progestagène (FGA). Ces observations ont été réalisées pour quatre périodes différentes : le milieu, le début et la fin de la saison de reproduction ainsi que l'anoestrus.
La quantification des récepteurs à la LH et à la FSH a demandé la mise au point d'une technique radioimmunologique. Cette technique nous a révélé que :
- au cours d'un cycle oestral en milieu de saison de reproduction, le nombre de récepteurs aux hormones gonadotropes (FSH et LH) tend à augmenter pour atteindre un maximum en phase folliculaire;
- en fin de saison de reproduction ainsi qu'en anoestrus, le nombre de récepteurs aux gonadotropines est faible et ne présente pas d'augmentation à la fin de la période de 17 jours;
- au début de la saison de reproduction, le nombre de récepteurs à la FSH et à la LH montre une grande variabilité tout au long du cycle annonçant la reprise de l'évolution observée en milieu de saison de reproduction.

L'évolution du nombre de récepteurs aux gonadotropines a ensuite été comparé avec les profils de sécrétion des hormones gonadotropes et stéroïdiennes, ainsi qu'avec la stéroïdogenèse de follicules soumis à une stimulation LH-FSH. Aucun parallélisme entre les taux plasmatiques d'oestradiol, le nombre de récepteurs aux gonadotropines et la réactivité des follicules à la stimulation gonadotrope n'a pu être mis en évidence.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)

Décembre 1993

Promoteur : R. Paquay

Promoteur : J-L. Bister

J'aimerais adresser mes plus sincères remerciements à mon promoteur, le Professeur R.Paquay Directeur du Département de Physiologie Animale, ses remarques judicieuses lors de la rédaction de ce mémoire m'ayant été d'un grand secours.

Je remercie également le Dr J.L.Bister pour son aide, sa disponibilité et ses remarques judicieuses au cours de cette année.

Je voudrais adresser un très grand remerciement à Mademoiselle Bénédicte Noël pour son aide, son entière disponibilité et pour tous les conseils qu'elle m'a donnés.

Je suis aussi très reconnaissant envers les membres du personnel du Laboratoire de Physiologie Animale et du Centre de Recherches Ovines de Faux-les Tombes, de même que ceux des Laboratoires d'Immunologie, d'Histologie et de Biologie Quantitative qui m'ont apporté une assistance technique très précieuse à différents étapes de cette recherche.

Enfin, j'aimerais exprimer toute ma gratitude à mes parents et mes amis pour le soutien qu'ils m'ont témoigné tout au long de mes études.

INTRODUCTION

PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. ASPECTS GENERAUX DE LA REPRODUCTION CHEZ LA BREBIS 1
   1.1. Le cycle oestral de la brebis 1
   1.2. Description histologique de l'ovaire 1
2. LA GAMETOGENESE FEMELLE 2
   2.1. Données générales sur la gamétogenèse femelle 2
   2.2. L'ovogenèse 2
   2.3. La folliculogenèse 3
   2.4. La croissance folliculaire terminale 5
      2.4.1. Le recrutement 5
      2.4.2. La sélection des follicules dominants 6
      2.4.3. La cinétique de la croissance folliculaire terminale 7
   2.5. L'atrésie folliculaire 7
3. CONTROLE HORMONAL DU CYCLE OESTRAL CHEZ LA BREBIS 7
      3.1. L'hormone hypothalamique: la GnRH 8
      3.1.1. Structure et mode d'action 8
      3.1.2. Actions physiologiques et contrôle 8
   3.2. Les gonadotropines hypophysaires : LH et FSH 9
      3.2.1. Structure moléculaire 9
      3.2.2. Lieu et mode de sécrétion 9
      3.2.3. Polymorphisme 10
      3.2.4. Rôles 10
   3.3. Les stéroïdes sexuels 11
      3.3.1. Biosynthèse 11
      3.3.2. Profils de sécrétion 12
      3.3.3. Rôles 12
      3.3.4. Stéroïdogenèse et sensibilité des follicules aux hormones gonadotropes 13
4. LES RECEPTEURS 13
   4.1. Introduction générale 13
      4.1.1. Les petites molécules lipophiles 14
      4.1.2. Les hormones hydrosolubles 14
         4.1.2.1. Récepteurs à un seul passage transmembranaire 15
         4.1.2.2. Récepteurs à sept passages transmembranaires 15
         4.1.2.3. Récepteurs à 24 passages transmembranaires 16
      4.1.3. Les grosses molécules lipophiles 16

4.2. Structure des récepteurs aux gonadotropines....16
4.3. Interactions hormone-récepteur....17
4.4. Fonctionnement des récepteurs....18
4.5. Localisation des récepteurs....19
4.6. Rôle des récepteurs des gonadotropines....20
4.7. Interaction des récepteurs des gonadotropines avec d'autres récepteurs membranaires dans le cadre d'une régulation de leur expression en membrane....20
4.7.1. Couplage des récepteurs des gonadotropines et des récepteurs de la prolactine....20
4.7.2. Couplage avec les récepteurs de la GnRH....21
5. INFLUENCE DE LA PERIODE DE L'ANNEE SUR LA REPRODUCTION DE LA BREBIS....21
5.1. Introduction....21
5.2. Le milieu de la saison de reproduction....22
5.3. Le début et la fin de la saison de reproduction....22
5.3.1. La croissance folliculaire....22
5.3.2. Profils des sécrétions plasmatiques des gonadotropines et des stéroïdes....22
5.3.3. Stéroïdogenèse et sensibilité des follicules aux hormones Sgonadotropes....23
5.4. L'anoestrus saisonnier....24
5.4.1. Sécrétions hormonales et contrôle....24
5.4.2. La croissance folliculaire....26
5.4.3. La stéroïdogenèse des follicules....27

PARTIE II : TRAVAIL PERSONNEL

OBJECTIFS POURSUIVIS

MATERIEL ET METHODES

1. CONDITIONS EXPERIMENTALES....30
2. MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE....30
2.1. Récolte....30
2.2. Comptage et dilution des cellules....31
3. EXPERIENCE....31
3.1. Ojectifs poursuivis....31
3.2. Protocole expérimental....32
3.3. Méthodes utilisées....33
3.3.1. Techniques et traitements utilisés in vivo....33
3.3.1.1. Synchronisation des cycles....33
3.3.1.2. Endoscopie....33
3.3.1.3. Récolte et conservation des cellules de la granulosa....34
3.3.1.4. Prises de sang....34
3.3.2. Détermination du nombre des récepteurs aux gonadotropines....34
3.3.3. Techniques et traitements utilisés in vitro....35
3.3.3.1. Culture in vitro des follicules ovariens....35
3.3.4. Dosage des hormones sanguines....37
3.3.4.1. Principe du dosage radioimmunologique....37
3.3.4.2. Dosage de la LH....38
3.3.4.3. Dosage de la FSH....40
3.3.4.4. Dosage de la Progestérone....41
3.3.4.5. Dosage de l'oestradiol....42
3.3.4.6. Dosage de l'androstènedione....44
4. ANALYSES STATISTIQUES....44

MISE AU POINT DE LA METHODE DE QUANTIFICATION DES RECEPTEURS AUX GONADOTROPINES

1. INTRODUCTION ET OBJECTIFS POURSUIVIS....45
2. MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DE QUANTIFICATION DES RECEPTEURS À LA LH ET À LA FSH....46

2.1. Evaluation de l'iodination des hormones....46
2.1.1.Recherche de l'activité spécifique....46
2.1.2. Recherche du pourcentage d'hormone liable en présence d'un excès de récepteurs (fraction active)....47
2.1.2.1. Mode opératoire....47
2.1.2.2. Résultats et discussion....48
2.1.3. Quantification des liaisons non spécifiques de l'hormone marquée sur les tubes de polystyrène....48
2.1.4. Recherche de la quantité optimale d'hormone marquée à ajouter....49
2.1.4.1. Mode opératoire....49
2.1.4.2. Résultats et discussion....49
2.1.5. Recherche de la meilleure méthode de précipitation....50
2.1.5.1. Mode opératoire....50
2.1.5.2. Résultats et discussion....51
2.1.6. Spécificité de la liaison....52
2.1.6.1. Mode opératoire....52
2.1.6.2. Résultats et discussion....53
2.1.7. Recherche du meilleur temps d'incubation et de la température d'incubation optimale....53
2.1.7.1. Mode opératoire....53
2.1.7.2. Résultats et discussion....54
2.2. Conclusion....55

RESULTATS

1. EFFETS DE LA SAISON SUR L'EVOLUTION DU NOMBRE RECEPTEURS A LA FSH ET À LA LH PENDANT UNE PERIODE CORRESPONDANT A LA DUREE D'UN CYCLE OESTRAL....56
1.1. Le milieu de la saison de reproduction....56
1.1.1. Les récepteurs à la FSH....56
1.1.2. Les récepteurs à la LH....56
1.2. Le début et la fin de la saison de reproduction....57
1.2.1. Les récepteurs à la FSH....57
1.2.2. Les récepteurs à la LH....57
1.3. L'anoestrus....57
2. EFFETS DU MOMENT DE LA SAISON SUR LES PROFILS DE SECRETION DES HORMONES GONADOTROPES (LH ET FSH) ET STEROIDIENNES (P_4 ET E_2)....58

2.1. Le milieu de la saison de reproduction....58
2.2. Le début et la fin de la période de reproduction....59
2.3. L'anoestrus....60
3. LA STEROÏDOGENESE DES FOLLICULES PLACES EN CULTURE IN VITRO....62
3.1. Le milieu de la saison de reproduction....62
3.1.1. Phase folliculaire....62
3.1.2. Phase lutéale....63
3.2. Le début de la saison de reproduction....64
3.3. La fin de la saison de reproduction....64
3.4. L'anoestrus....65

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

1. DISCUSSION....66
1.1. Le milieu de la saison de reproduction....67
1.1.1. Evolution du nombre de récepteurs à la FSH et à la LH....67
1.1.2. Profils de sécrétion des différentes hormones....67
1.1.3. Stéroïdogenèse des follicules soumis à une stimulation LH-FSH..69
1.1.4. Comparaison entre les nombres de récepteurs aux gonadotropines, les concentrations plasmatiques hormonales et la stéroïdogenèse....70
1.2. Fin de la saison de reproduction....71
1.3. Anoestrus....72
1.4. Début de la saison de reproduction....73
2. CONCLUSIONS....75

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Introduction

Depuis plusieurs années, les recherches effectuées au Laboratoire de Physiologie Animale portent sur les mécanismes de croissance des follicules ovariens de brebis. Une part importante de ces recherches a été réservée à l'étude des mécanismes ovariens et endocriniens qui interviennent au cours d'un cycle complet au milieu, au début et à la fin de la saison de reproduction ainsi qu'en anoestrus saisonnier chez les brebis Texel (Jacques, 1989) et Suffolk (Noël *et al.*, 1993).

Au cours de ces expériences, les techniques d'endoscopie et de prélèvement sanguin ont été utilisées. Ces techniques sont extrêmement riches d'enseignement mais se heurtent à certaines limites. En effet, des follicules morphologiquement identiques peuvent avoir des capacités stéroïdogéniques tout à fait différentes (Jacques, 1989).

Pour pallier ces limites, une technique de culture *in vitro* de follicules ovariens entiers a été mise au point (Demuynck, 1990) et testée au laboratoire (Renard, 1991). Il s'agit d'une technique de périfusion qui permet la survie histologique et fonctionnelle des follicules pendant 24 heures ainsi qu'une étude dynamique de leurs sécrétions. Elle présente également l'avantage, par rapport aux cultures de cellules, de conserver l'intégrité des interactions thèque-granulosa qui est capitale pour un bon déroulement de la stéroïdogenèse. De plus, elle autorise la comparaison de l'activité des follicules prélevés dans des conditions différentes et l'étude des effets spécifiques d'une substance ajoutée au milieu de culture.

Pour compléter les résultats obtenus précédemment, Perrad (1992) a ensuite étudié la stéroïdogenèse et la réponse à une stimulation hormonale (LH-FSH) de follicules prélevés chez des brebis au cours des phases lutéale et folliculaire au milieu, au début et à la fin de la saison de reproduction ainsi qu'en anoestrus saisonnier. Les résultats obtenus montrent que le moment du cycle oestral ainsi que la saison influencent la stéroïdogenèse et la réponse des follicules à une stimulation gonadotrope. Pour essayer d'expliquer ces résultats, deux types d'approches ont été envisagées.

Dans un premier temps, il a été postulé que les différents états physiologiques conditionnent la teneur du fluide folliculaire en facteurs de croissance ainsi que la sensibilité des follicules vis-à-vis des mêmes facteurs. Cette approche a fait l'objet d'un autre mémoire de fin d'étude (Botspoel, 1993).

De plus, d'après la littérature il semble que la régulation de l'ensemble des récepteurs hormonaux présents dans les follicules ovariens est un des mécanismes essentiels par lequel les hormones hypophysaires contrôlent la fonction de reproduction et la stéroïdogenèse. La détermination du nombre de récepteurs au niveau des cellules

de la granulosa au cours de la croissance folliculaire terminale devrait donc permettre d'apporter un élément de compréhension du mode d'action des hormones hypophysaires au niveau des gonades. C'est dans le cadre de cette approche que se situe notre mémoire de fin d'étude. Nous sommes partis de l'hypothèse que le moment de la saison pourrait induire des modifications quantitatives des récepteurs aux gonadotropines présents sur les cellules folliculaires.

Avant de pouvoir vérifier cette hypothèse, il s'agissait de mettre au point une technique de quantification des récepteurs aux gonadotropines (LH et FSH) sur les cellules de la granulosa. Cette mise au point constitue la première partie de notre travail.

Nous avons ensuite utilisé cette technique pour quantifier les récepteurs présents sur les cellules de la granulosa récoltées par ponction des plus gros follicules présents sur les ovaires des brebis pendant 17 jours consécutifs. Cette expérience a été réalisée au milieu, au début et à la fin de la saison de reproduction ainsi qu'en anoestrus saisonnier.

Au cours des 4 mêmes périodes, des follicules ont également été prélevés jour 18 suivant la synchronisation (jour 16 du cycle) et mis en culture *in vitro* afin d'en étudier la stéroïdogenèse et la réponse à une stimulation gonadotrope. Cette réponse a ensuite été mise en relation avec le nombre de récepteurs aux hormones gonadotropes présents sur les cellules de la granulosa au même moment.

Notre travail se divise en 2 parties : la première est théorique; il s'agit d'une revue bibliographique qui reprend différents éléments de la littérature concernant la reproduction de la brebis, les récepteurs aux gonadotropines et l'influence de la saison de reproduction sur les mécanismes de croissance folliculaire et de stéroïdogenèse. La seconde reprend le travail personnel réalisé au cours de cette année et est divisée en 5 chapitres qui concernent respectivement : les objectifs poursuivis, le matériel et les méthodes utilisées, la mise au point de la technique de quantification des récepteurs à la LH et à la FSH, les résultats obtenus et leur discussion et enfin la conclusion générale.

Revue Bibliographique

1. ASPECTS GENERAUX DE LA REPRODUCTION CHEZ LA BREBIS

Les brebis ont une activité sexuelle de type polyoestrus saisonnier ce qui signifie qu'elles présentent une succession de cycles oestraux pendant une saison déterminée. La période de l'année pendant laquelle les brebis se reproduisent dépend de la photopériode, c'est-à-dire la longueur du jour par rapport à celle de la nuit. L'activité ovarienne cyclique débute lorsque la photopériode commence à décroître et cesse lorsque les jours deviennent plus longs. L'anoestrus saisonnier est la période séparant 2 saisons de reproduction (Malpaux et *al.*, 1988). La période de reproduction de la brebis Suffolk commence fin juillet-début août et se termine fin mars-début avril (Noël *et al.*, 1993).

1.1. Le cycle oestral de la brebis

Par convention, les physiologistes considèrent l'ovulation comme le début du cycle (jour 0) quelle que soit l'espèce considérée. Un cycle complet s'étend donc d'une ovulation à l'autre. Celui de la brebis dure en moyenne 17 jours et peut être divisé en 2 périodes différentes d'activité ovarienne : la phase folliculaire et la phase lutéale.

La phase lutéale s'étend du jour 1 au jour 13. Suite à l'émission de(s) l'ovule(s) par le(s) follicule(s) (jour 0), les cellules folliculaires subissent des modifications structurales et fonctionnelles qui aboutissent à la formation du corps jaune. Celui-ci sécrète de la progestérone (P_4). Le taux sanguin de P_4 augmente après l'ovulation et pendant une bonne moitié de la phase lutéale, puis garde des valeurs plus ou moins constantes jusqu'à la lutéolyse (destruction du corps jaune).

La phase folliculaire s'étend du jour 14 au jour 17 du cycle. Elle correspond à la croissance terminale ainsi qu'à la maturation des follicules ovariens et se termine par l'ovulation.

Tous ces événements qui seront décrits plus en détail ultérieurement sont influencés par des facteurs hormonaux sécrétés par l'axe hypothalamus-hypophyse-ovaire-utérus.

1.2. Description histologique de l'ovaire

(Junqueira *et al.*, 1986; Bister, 1991; Ruckebusch *et al.*, 1991)

Chez la brebis l'ovaire est un organe de forme ovoïde; ses dimensions sont de 1 à 3 cm de long et de 1 à 1,5 cm de large et 1 cm d'épaisseur.

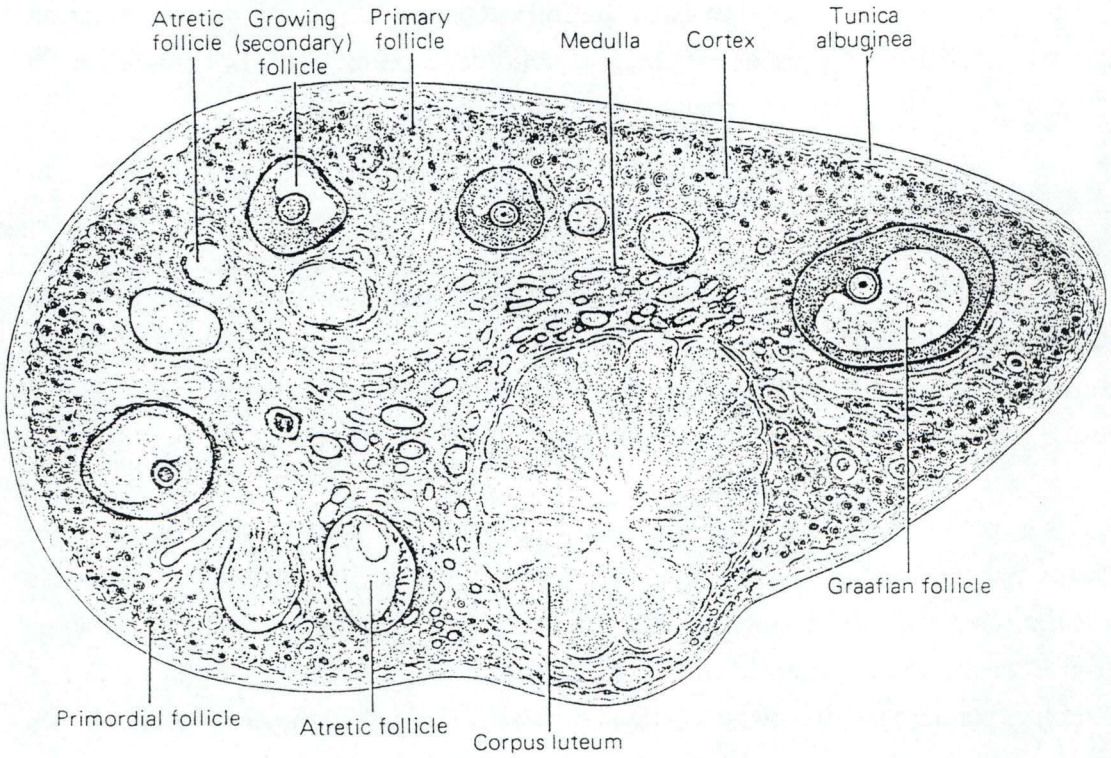


Figure 1 : Schéma représentant l'ovaire d'une femme adulte (Junqueira *et al.*, 1986).

L'ovaire est constitué de 3 régions (fig.1) :

- la **région médullaire** formée d'un tissu conjonctif lâche contenant des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que des fibres nerveuses;
- la **région corticale** qui comprend le stroma (tissu de remplissage) et de nombreux follicules aux différents stades de développement;
- la **"tunica albuginea"** ou albuginée, un tissu conjonctif fibreux qui entoure l'ovaire. Ce tissu est lui-même entouré par un épithélium pavimenteux ou cubique simple : l'épithélium germinatif.

2. LA GAMETOGENESE FEMELLE

2.1. Données générales sur la gamétogenèse femelle

Chez les mammifères femelles, la gamétogenèse est un processus discontinu : à **l'ovogenèse** (établissement du stock de follicules primordiaux) fait suite la **folliculogenèse basale;** c'est-à-dire la succession des différentes étapes du développement d'un follicule depuis le moment où il sort de la réserve constituée au cours de l'ovogenèse jusqu'au stade de follicule antral (de diamètre inférieur à 2 mm, Driancourt *et al.*,1984 et 1991).

Ensuite les follicules antraux de diamètre supérieur à 2 mm peuvent être recrutés pour entamer **la phase de croissance folliculaire terminale.** Pendant cette phase, les follicules subissent le jeu de la sélection; la plupart sont réduits à l'atrésie tandis que les autres continuent à se développer pour enfin arriver à l'ovulation.

Cette dernière étape que nous décrirons plus précisément par la suite, est fortement influencée par les hormones sécrétées par l'axe hypothalamo-hypophysaire.

2.2. L'ovogenèse

L'ovogenèse est la phase durant laquelle les ovogonies ou cellules germinales se transforment en ovocytes de 1er ordre. Ceux-ci sont entourés d'une seule couche de cellules granulosales; l'ensemble constitue le follicule primordial (Derivaux et Ectors, 1986). Le stock de follicules primordiaux est important (de 12.000 à 86.000) et n'augmente plus après la naissance (Bister, 1991).

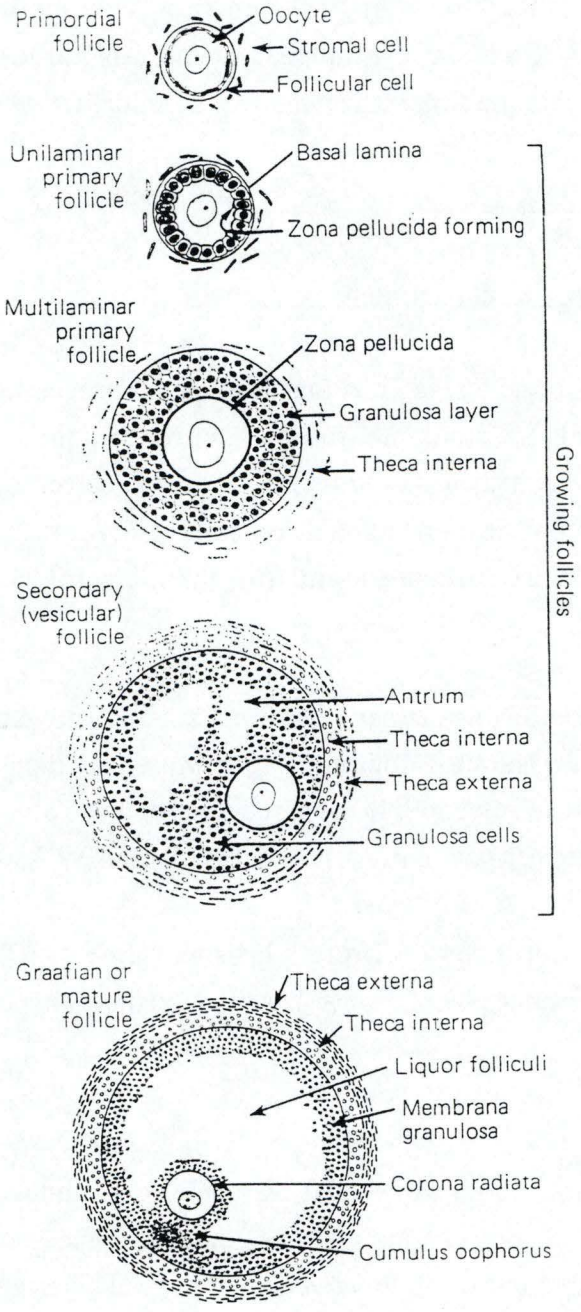


Figure 2 : Schéma représentant les différentes étapes de développement des follicules ovariens (Junqueira *et al.*, 1986)

Au départ, les cellules de la lignée germinale proviennent de l'ectoderme de l'embryon et vont se développer dans l'endoderme du sac embryonnaire (Gardner *et al.*,1985; cités par Brännström, 1988). Après un mois de vie foetale, les cellules migrent vers les futures gonades, tout en subissant une série de mitoses; ces divisions continuent jusqu'au 5ème mois de la vie foetale. Dans les gonades, les cellules se transforment et passent d'une forme amoeboïde à une forme sphérique. Elles sont dès lors appelées ovogonies (Plachot, 1989).

Sous l'action de certaines substances, les ovogonies entreprennent la méiose. L'enclenchement de celle-ci marque la transition vers le stade ovocytaire. La méiose s'arrête au stade diplotène de la première division méiotique (ovocyte de 1er ordre). La méiose ne reprendra qu'au moment de la maturation de l'ovocyte (Thibault *et al.*, 1987).

2.3. La folliculogenèse

La folliculogenèse est la transformation de certains follicules primordiaux en follicules primaires, secondaires et tertiaires (Yen et Jaffe, 1991; Ruckebusch *et al.*, 1991). Le phénomène qui pousse certains follicules primordiaux à entreprendre la folliculogenèse basale est propre à l'ovaire et est probablement sous le contrôle de cybernines (Bister, 1991).

L'évolution d'un follicule du stade primordial au stade antral est accompagnée:

- d'un accroissement du volume de l'ovocyte;
- de la formation de la zone pellucide;
- d'une transformation des cellules de la granulosa d'une forme aplatie en une forme cubique;
- d'une multiplication des cellules de la granulosa et de leur disposition en plusieurs couches autour de l'ovocyte;
- d'une organisation des cellules du stroma autour du follicule de façon à donner une thèque interne et une thèque externe (Junqueira *et al.*, 1986; Brännström, 1988).

Avant d'obtenir un follicule antral susceptible de subir la croissance terminale qui mène à l'ovulation, on passe par différents stades (fig.2, Junqueira *et al.*, 1986; Yen et Jaffe, 1991):

- Le **follicule primordial** est constitué d'un ovocyte primaire entouré d'une monocouche de cellules prégranulosales aplaties. Il mesure en moyenne 30 µm de diamètre et l'ovocyte qu'il enferme en fait 25.

- Le **follicule primaire** présente des cellules granulosales cubiques séparées de l'ovocyte par une zone pellucide formée de glycoprotéines qu'il a lui-même synthétisées. Sa taille, à ce stade, peut atteindre 60 µm.

- Le **follicule secondaire** dans lequel l'ovocyte est entouré d'une couche pluristratifiée appelée granulosa. De plus, les fibroblastes du stroma commencent à s'organiser en thèque. A ce stade, le follicule peut atteindre 130 µm.

- Le **follicule tertiaire** se caractérise par la différenciation des cellules de la thèque pour former les thèques interne et externe. La thèque externe n'est faite que de tissu conjonctif; quant à la thèque interne, elle est richement vascularisée et joue un rôle endocrine.

- Le **follicule antral ou de De Graaf** est caractérisé par la formation, entre les cellules de la granulosa, de cavités qui fusionnent pour former l'antrum. Celui-ci contient un liquide appelé fluide folliculaire sécrété par les cellules de la granulosa. A l'intérieur de la cavité, une proéminence se forme : le *cumulus oophorus;* il contient l'ovocyte entouré d'une couche de cellules granulosales différenciées appelée *corona radiata.*

Il est important de noter que la folliculogenèse basale est indépendante des gonadotropines. En effet, une ablation de l'hypophyse (Driancourt *et al.,* 1987), une immunisation contre la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone, Mc Neilly *et al.,* 1986) ou encore une inhibition chimique de l'hypophyse provoque un arrêt du développement des follicules à 2 mm de diamètre.

Le développement des follicules au delà de 2 mm requiert impérativement l'action des gonadotropines; c'est ce qui différencie la croissance folliculaire terminale de la croissance folliculaire basale.

Cependant selon Driancourt *et al.* (1991) l'indépendance stricte de la folliculogenèse basale envers l'axe hypothalamo-hypophysaire ne serait pas encore prouvée. En effet, selon Scarramuzzi *et al.* (1993), les follicules préantraux possèdent des

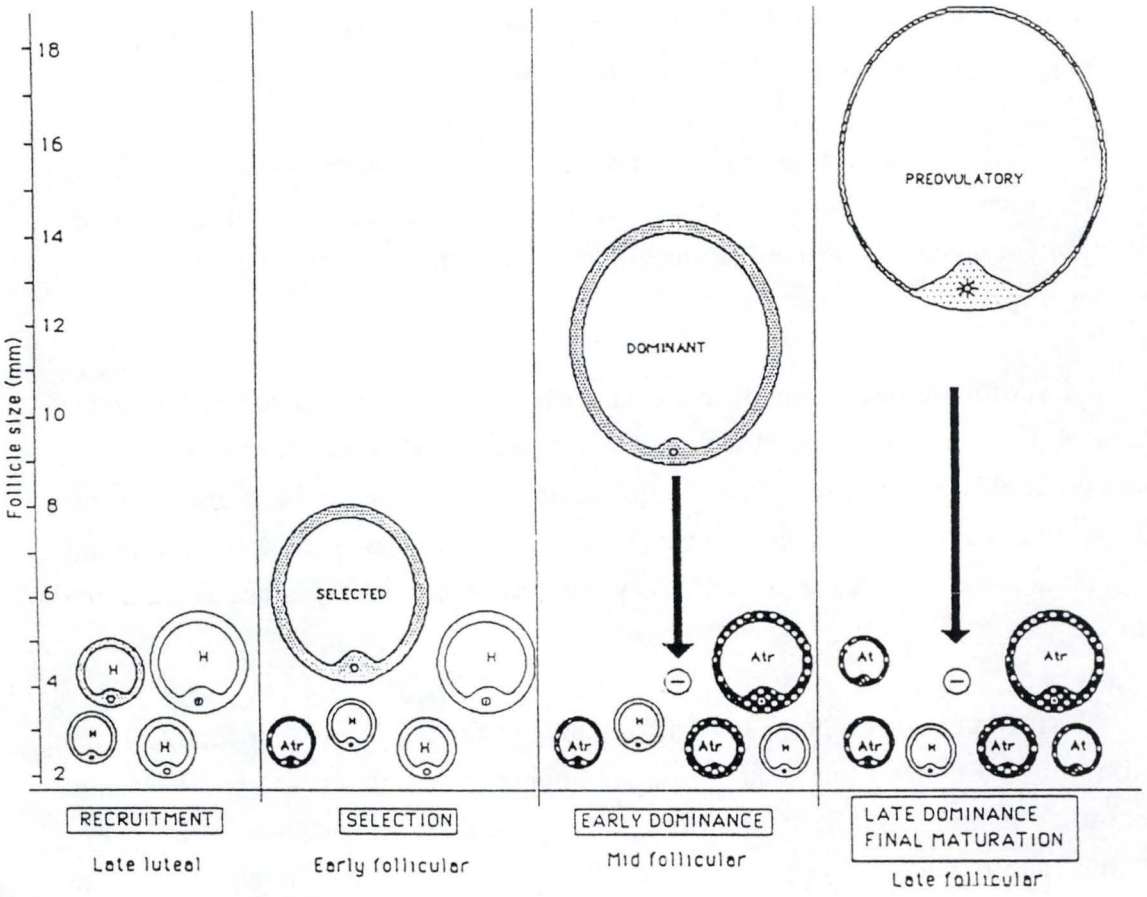


Figure 3 : Schéma représentant les différentes étapes de la croissance folliculaire terminale. H = follicule sain. Atr. = follicule atrétique (Yen et Jaffe, 1991).

récepteurs à la LH sur les cellules de la thèque et des récepteurs à la FSH sur les cellules de la granulosa. Il semblerait donc que ces follicules soient capables de croître indépendamment des gonadotropines malgré la présence de récepteurs.

2.4. La croissance folliculaire terminale

L'ovaire d'une brebis adulte contient entre 12.000 et 86.000 follicules primordiaux et 100 à 400 follicules en croissance parmi lesquels seulement 10 à 40 sont visibles à la surface de l'ovaire (Cahill *et al.*, 1979; Mc Natty *et al.*, 1982).

L'ensemble des processus de croissance d'un groupe de follicules sous l'influence des gonadotropines puis de l'émergence d'un ou plusieurs follicules ovulatoires parmi ceux-ci est communément décrit par les concepts de recrutement/sélection et dominance (fig.3, Yen et Jaffe, 1991; Di Zerega et Hodgen, 1981; Driancourt et Cahill, 1984).

Le **recrutement** est le fait que des follicules antraux de diamètre supérieur à 2 mm entament un processus de croissance rapide. La **sélection** est l'émergence parmi ces follicules recrutés de follicules de taille ovulatoire. Parmi ces follicules sélectionnés, un certain nombre d'entre-eux deviennent dominants. La majorité des follicules dominants régresse et subit l'atrésie. Seuls un ou quelques-uns d'entre-eux, qui se sont développés au cours de la phase folliculaire, entament un processus de maturation qui les conduira à l'ovulation. Seul le nombre de follicules correspondant au quota ovulatoire de l'espèce considérée échappe à l'atrésie (Driancourt *et al.*, 1984)

2.4.1. Le recrutement

Différents auteurs ont montré que seuls les follicules faisant au moins 2 mm de diamètre étaient susceptibles d'être recrutés. D'une part, le suivi de la croissance individuelle des follicules par marquage à l'encre de chine montre que le (ou les) follicule(s) qui ovule(nt) a (ont) au moins 2 mm de diamètre au moment de la lutéolyse naturelle (Driancourt *et al.*, 1984). D'autre part, la cautérisation des gros follicules n'affecte pas l'ovulation si quelques follicules de plus de 2 mm sont laissés sur l'ovaire (Tsonis *et al.*, 1984). Noël (1994) a montré que, chez la brebis Suffolk chaque vague de FSH induit le recrutement ultérieur d'un groupe de follicules. Des observations similaires ont été effectuées par Jacques (1989) sur la brebis Texel ainsi que par Fortune (1994) chez le rat. Par contre, selon Mariana (1991) il semblerait que ce soit l'amplification de

l'action de la FSH par des facteurs locaux, comme l'IGF-I, qui induise le recrutement. De plus, l'ovaire lui-même produit des facteurs capables de moduler l'action des gonadotropines : tels que le FGI (Follicular Growth Inhibitor factor) et le facteur anti-mitotique présents dans le liquide folliculaire (Driancourt *et al.*, 1985).

2.4.2. La sélection des follicules dominants

Les follicules recrutés sécrètent une quantité de plus en plus importante d'oestrogènes et d'inhibine (Webb et England, 1982). Ces hormones exercent un feed-back négatif sur la sécrétion de FSH, ce qui entraîne l'apparition d'un environnement défavorable à la croissance folliculaire. Ce processus intervient probablement dans la sélection du follicule dominant (Driancourt *et al.*, 1984).

Actuellement, deux hypothèses sont émises pour expliquer la sélection et la dominance des follicules (Fortune, 1994):

La première, **l'hypothèse de la stabilité** suggère que lorsqu'un follicule a atteint un niveau suffisant de maturation, il reste à un stade d'équilibre et est moins sensible à la diminution de la concentration en FSH qui conduit les autres à l'atrésie. Le ou les follicules destinés à ovuler seraient protégés par la présence de FSH et d'oestradiol (E_2) dans le fluide folliculaire (Ireland et Roche, 1987) ou par un autre phénomène compensatoire, par exemple, une plus grande activité ou sensibilité aux facteurs de croissance paracrines, notamment à l'IGF-1 (Noël, 1994).

La deuxième, **l'hypothèse de l'élimination active,** explique l'apparition du follicule dominant par élimination des autres follicules. La production par le follicule dominant de facteurs inhibant directement le développement des autres follicules en serait la raison (Di Zerega et Hodgen, 1981). Quelques substances pouvant être impliquées dans le processus de sélection ont été trouvées dans le liquide folliculaire des follicules dominants et dans la veine ovarienne (Di Zerega *et al.*, 1983; Driancourt *et al.*, 1985). Ces composés sont principalement des protéines à rôle anti-aromatisant, comme la FSH-RBI (FSH-Receptor Binding Inhibitor) qui empêche la fixation de la FSH sur son récepteur ou la FRP (Follicular Regulator Protein) qui supprime la réponse folliculaire aux gonadotropines circulantes (Philippon, 1988).

2.4.3. La cinétique de la croissance folliculaire terminale

Lahlou-Kassi et Mariana (1984) ainsi que Yenikoye *et al.*(1989) ont mis en évidence une croissance continue et aléatoire chez les ovins. Ceci implique la présence de gros follicules sains à n'importe quel jour du cycle. Cependant, diverses analyses de la taille des follicules sains au cours du cycle indiquent l'existence d'une distribution bimodale (Brand et de Jong, 1973) ou trimodale (Jacques 1989; Noël *et al.*, 1993).

Chez la brebis Suffolk, on relève 3 vagues de croissance folliculaire. Pendant la phase lutéale, des follicules atteignent 4 à 7 mm au cours de 2 vagues de croissance puis régressent. Le recrutement des follicules parmi lesquels se trouvent celui ou ceux qui ovuleront se produit pendant la phase folliculaire (Noël *et al.*, 1993).

2.5. L'atrésie folliculaire

Durant la phase lutéale tous les follicules sont voués à l'atrésie. La plupart des follicules de la phase folliculaire la subiront également. L'atrésie est le phénomène par lequel l'ovocyte et les cellules de la granulosa disparaissent pour laisser place à du tissu fibreux. De plus, les cellules de la thèque externe rejoignent les cellules du stroma cortical et leur noyau devient picnotiques (Yen et Jaffe, 1991).

L'atrésie est aussi marquée par une diminution de l'activité de l'aromatase qui entraîne une production moindre d'oestradiol, alors que la progestérone et l'androstènedione ont tendance à s'accumuler. Une diminution du nombre de récepteurs aux gonadotropines sur les cellules de la granulosa et de la thèque des follicules atrétiques a aussi été rapportée (Webb et Gauld, 1984).

3. CONTROLE HORMONAL DU CYCLE OESTRAL CHEZ LA BREBIS

Comme nous l'avons dit précédemment, l'ovaire et son fonctionnement dépendent de l'axe hypothalamus-hypophyse-ovaire. En effet, le cycle ovarien est sous le contrôle de nombreuses hormones parmi lesquelles certaines sont primordiales et d'origine:

- hypothalamique: GnRH: Gonadotropine Releasing Hormone;
- hypophysaire: FSH: Follicle Stimulating Hormone;
  LH: Luteinizing Hormone;
- ovarienne: oestrogènes, progestérone.

3.1. L'hormone hypothalamique: la GnRH

3.1.1. Structure et mode d'action

La GnRH est un décapeptide hypothalamique synthétisé par les neurones de l'hypothalamus, transporté par le flux axonal et stocké dans des petits granules (40 à 130 nm de diamètre) au niveau des extrémités des axones dans l'éminence médiane (Ruckebusch *et al.*, 1991).

La GnRH est sécrétée de façon pulsatile (Clarke, 1989). Le rythme de sécrétion varie au cours du cycle sexuel. D'une émission toutes les 2 à 8 heures en phase lutéale, la pulsatilité augmente en phase folliculaire et aboutit à la décharge préovulatoire d'un rythme de plusieurs pulses par heure.

L'action de la GnRH demande sa fixation sur son récepteur, présent sur les cellules gonadotropes de l'adénohypophyse, pour provoquer, via une cascade d'activations, la biosynthèse et la sécrétion de la LH et de la FSH (Yen et Jaffe, 1991).

3.1.2. Actions physiologiques et contrôle

La GnRH augmente la sécrétion de la LH et de la FSH par l'adénohypophyse; par conséquent, elle influence la production des stéroïdes sexuels par l'ovaire et donc affecte aussi la croissance folliculaire terminale et l'ovulation (Ruckebusch *et al.*, 1991).

La régulation de la synthèse et de la sécrétion de la GnRH est réalisée par la GnRH elle-même mais également par les stéroïdes ovariens (P_4, E_2) et par l'inhibine, l'activine et la follistatine (Yen et Jaffe, 1991; Caldani *et al.*, 1991).

L'élément déterminant la décharge préovulatoire de GnRH est probablement l'inversion du rapport E_2/P_4 entraîné par la lutéolyse et l'augmentation des taux d'E_2 sécrétés par les gros follicules en phase folliculaire (Jacques, 1989).

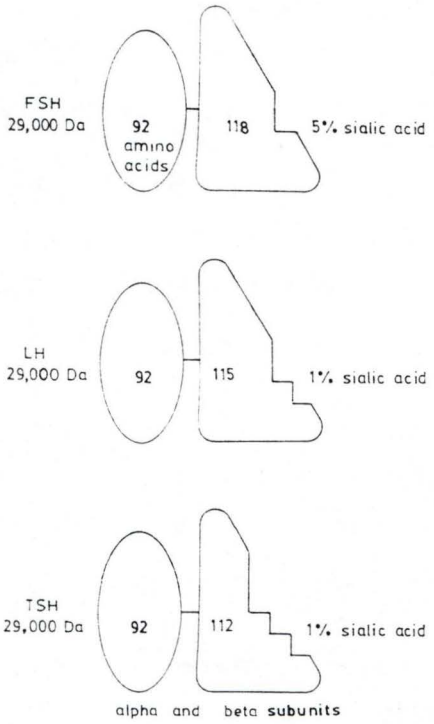


Figure 4 : Diagramme représentant la similarité des sous-unités α des 3 glycoprotéines adénohypophysaires (FSH, LH et TSH). La spécificité de chaque hormone est due à la sous-unité β (Ruckebusch *et al.*, 1991).

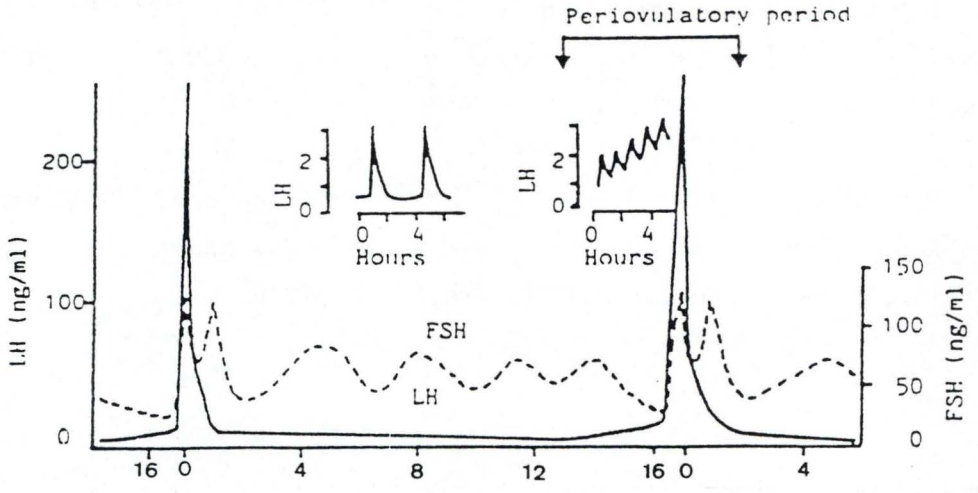


Figure 5: Evolution des profils hormonaux (LH et FSH) au cours du cycle oestral chez la brebis (jour 0 = jour de l'oestrus ou du pic de LH; Haresein *et al.*, 1984; cités par Jacques, 1989).

3.2. Les gonadotropines hypophysaires : LH et FSH

3.2.1. Structure moléculaire

La LH et la FSH sont des hormones glycoprotéiques constituées de l'assemblage de deux sous-unités α et ß. Au sein d'une même espèce, la sous-unité α est commune à la LH, à la FSH ainsi qu'à la TSH et à la CG; la spécificité biologique et immunologique est donc portée essentiellement par la sous-unité ß (fig.4, Ruckebusch *et al.*, 1991).

La séquence en acides aminés de chacune des sous-unités est connue depuis une quinzaine d'années et ce pour plusieurs espèces, notamment humaine, porcine, bovine, équine et ovine. La sous-unité α comprend 92 aminoacides chez l'homme, 96 chez le boeuf et présente une homologie de séquence considérable entre les différentes espèces. Chez l'homme, les sous-unités ß de la LH (121 aa) et de la CG (145 aa) présentent 85% homologie dans les 114 premiers acides aminés. Ceci explique pourquoi ces deux hormones interagissent avec le même récepteur (Ronin, 1989).

La position des résidus de demi-cystine (10 pour α, 12 pour ß) est hautement conservée pour toutes ces hormones hypophysaires ou placentaires et cela chez toutes les espèces. Ceci suggère une forte ressemblance de la conformation du dimère αβ entre ces hormones.

Les hormones glycoprotéiques comportent une quantité variable d'hydrates de carbone et un nombre de sites de glycosylation différent. Ainsi, la LH ne contient que 1% d'acide sialique tandis que la FSH en contient 5%; cette différence de glycosylation entraîne une différence de temps de demi-vie. Celle-ci est de 20 minutes pour la LH et de quelques heures pour la FSH (Derivaux et Ectors, 1986).

3.2.2. Lieu et mode de sécrétion

La FSH est sécrétée par l'adénohypophyse; son profil de sécrétion présente durant le cycle oestral trois vagues d'une durée de 5 à 6 jours chacune (fig.5,Haresign *et al.*, 1984)). Une sécrétion importante de FSH, dont le taux atteint trois fois le taux de base se produit avant l'oestrus et est suivie 36 heures plus tard par une seconde élévation moins marquée appelée "rebound" de FSH ou décharge post-ovulatoire (Haresign *et al.*, 1984). Les 2 élévations sont considérées comme faisant partie de la même vague de FSH

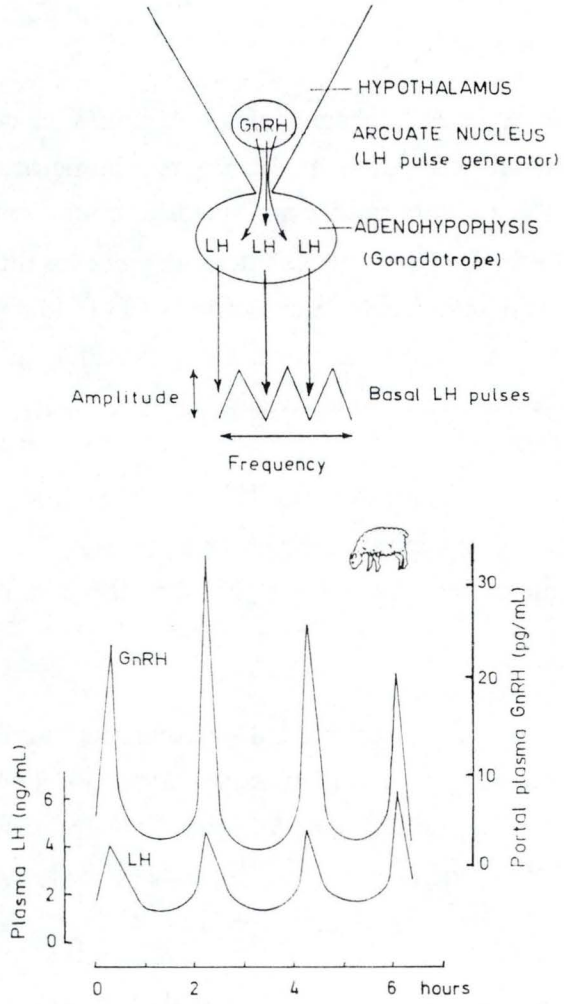


Figure 6 : Correspondance entre les pulses de LH et les décharges de GnRH (Ruckebusch *et al.*, 1991).

(Bister et Paquay, 1983).

L'émission de la LH se présente sous forme de pulses, de courte durée et de basse fréquence qui correspondent directement aux pulses de GnRH (fig.6, Ruckebusch et *al.*, 1991). En phase préovulatoire, la pulsatibilité augmente et la sommation de plusieurs pulses successifs très rapprochés donne le pic préovulatoire de LH. Cette décharge dure entre 8 et 20 heures et suit le pic de GnRH (Mandiki, 1991).

3.2.3. Polymorphisme

Le polymorphisme des gonadotropines a rapidement été associé à des variations d'activité biologique, c'est-à-dire à la capacité d'être reconnues par leurs récepteurs spécifiques et de stimuler la production d'AMPc. A ce propos, le rôle des motifs glucidiques dans la transduction a été particulièrement bien mis en évidence. En effet, 7 isoformes de la LH de point isoélectrique (PI) différents donnent des productions d'AMPc variant d'un facteur 10 entre la forme la plus basique et la forme la plus acide. Or, il est admis que la variation du PI (8,8-5,9) de chacune des formes est directement reliée à leur teneur en acide sialique (Ronin, 1989). Les formes basiques ont une demi-vie plus courte que les formes acides (Wilson et Foster, 1992). En ce qui concerne la FSH, 6 isoformes ont été mises en évidence.

3.2.4. Rôles

(Derivaux et Ectors, 1986; Yen et Jaffe, 1991)

La LH :

- provoque la reprise de la méiose de l'ovocyte au niveau des follicules primordiaux;
- contribue à la maturation folliculaire;
- induit l'ovulation;
- transforme les cellules granulosales en cellules thécales;
- stimule la biosynthèse de la P_4, de la Δ_4 et 1'E_2;
- induit la production de P_4 par le corps jaune.

La FSH:

- contribue à la croissance des follicules jusqu'au stade antral;
- stimule l'apparition des récepteurs à la LH sur les cellules thècales et granulosales pour permettre la lutéinisation;

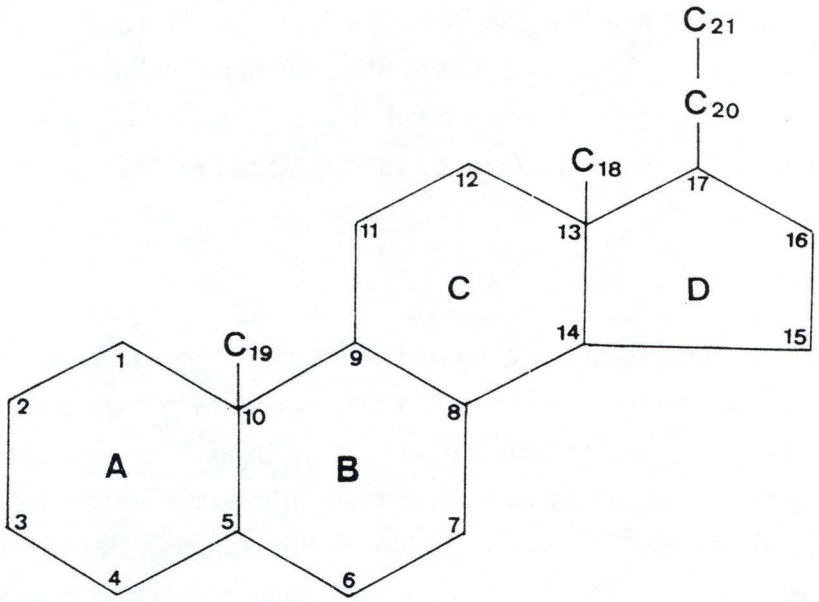


Figure 7 : Le noyau stérane (Derivaux et Ectors, 1986).

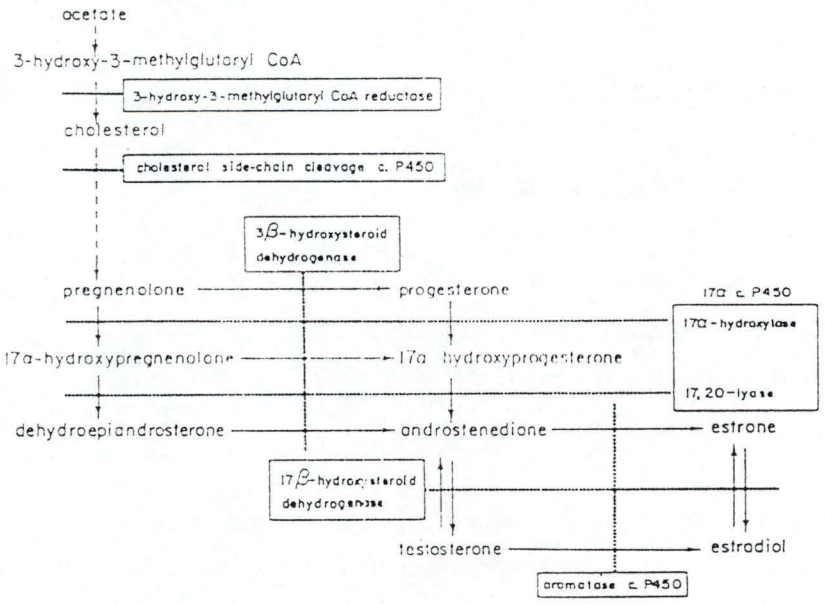


Figure 8 : Schéma général de la synthèse des stéroïdes (Brännström, 1988).

- provoque l'élaboration de la ß-déshydrogénase, enzyme nécessaire à la transformation du prégnénolone en progestérone;
- active l'aromatisation des androgènes sécrétés par la thèque interne en oestradiol.

3.3. Les stéroïdes sexuels

3.3.1. Biosynthèse

Les stéroïdes ovariens sont communément regroupés en progestagène, androgènes et oestrogènes. Ils sont tous issus de la transformation du cholestérol ce qui explique qu'ils ont la même structure de base: le noyau stérane (fig.7, Derivaux et Ectors, 1986).

La première étape de la synthèse, commune à tous les stéroïdes, est la transformation du cholestérol (27 Carbones) en Δ5 prégnénolone (21 Carbones). Cette réaction demande deux hydroxylations suivies de la coupure de la chaîne en C20. Ces étapes sont contrôlées par un complexe enzymatique comportant un cytochrome P-450 spécifique: "le P-450 side-chaine-cleavage" (Yen et Jaffe, 1991).

La Δ5-prégnénolone pénètre par diffusion dans les cellules capables d'initier la stéroïdogenèse: les cellules thécales et les cellules granulosales. Là, elle se transforme en progestérone (P_4) sous l'action de la 3 ß-hydroxystéroïde-déshydrogénase et de la Δ5-Δ4 isomérase (O'Malley et Strodt, 1991).

Une partie de la P_4 ainsi produite est rassemblée au niveau de la thèque où, grâce à la 17-20-α-hydroxylase, elle est transformée en 17-α-hydroxyprogestérone qui à son tour subit l'action de la 17-20-desmolase et devient l'androstènedione (Δ_4) (fig.8, Brännström, 1988; Yen et Jaffe, 1991).

La transformation de la Δ_4 en oestradiol se fait au niveau de la granulosa et nécessite l'élimination du C19 et l'aromatisation du noyau A par un complexe enzymatique nommé aromatase cytochrome P-450 couplé à une flavoprotéine (Darnell *et al.*,1989; Ruckebusch *et* al., 1991; Yen et Jaffe ,1991).

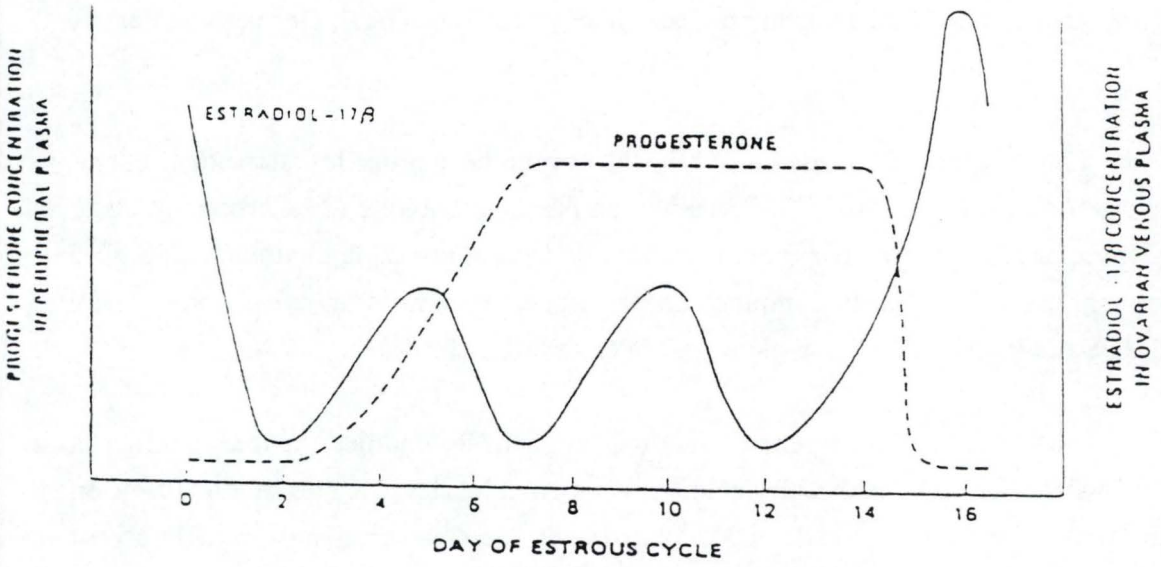


Figure 9 : Profils de sécrétion des stéroïdes au cours d'un cycle oestral (Robertson, 1977; cité par Jacques, 1989).

3.3.2. Profils de sécrétion

Après l'ovulation, les cellules folliculaires se modifient pour former le corps jaune, structure sécrétrice de **progestérone**. Au début de la phase lutéale, le corps jaune sécrète de plus en plus de progestérone pour arriver après 7 jours à un taux de l'ordre de 3 ng/ml dans le plasma périphérique. Cette concentration reste constante jusqu'au moment de la lutéolyse, c'est-à-dire la destruction du corps jaune qui s'accompagne d'une diminution brutale des taux de P_4 (fig.9, Robertson, 1977; cité par Jacques, 1989; Driancourt *et al.*, 1984).

Les variations du taux plasmatique des **oestrogènes** ont été décrites entre autre par Bister et Paquay (1983) ainsi que par Jacques (1989). Durant, la phase lutéale, deux vagues sont observées, elles atteignent un maximum respectivement entre le $2^{ème}$ et le $4^{ème}$ et entre le $7^{ème}$ et le $8^{ème}$ jour du cycle. Trois jours avant l'oestrus, les niveaux périphériques d'oestradiol augmentent pour atteindre un maximum la veille de l'oestrus puis diminuent progressivement. La concentration d'E_2 fluctue donc de façon trimodale et les maxima sont détectés un peu après l'apparition des follicules sélectionnés (Noël, 1994).

3.3.3. Rôles

(Derivaux et Ectors, 1986; Goldring *et al.*, 1987; Yen et Jaffe, 1991).

Chez la femelle en cycle, la P_4 quand elle est émise en concentration importante (phase lutéale) possède un effet inhibiteur sur la sécrétion de la GnRH, de la LH et de la FSH (Derivaux et Ectors, 1986). Selon d'autres auteurs (Pearce et Oldham, 1988), la P_4 agirait directement sur l'hypophyse en inhibant la sécrétion mais pas la synthèse de LH. La P_4 peut donc inhiber les mécanismes de la croissance folliculaire terminale ainsi que l'ovulation en agissant au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

Cependant, Fortune et Vincent (1983) ainsi que Armstrong *et al.* (1987) ont montré que la P_4 était également capable d'agir directement sur l'ovaire en induisant l'atrésie des follicules recrutés pour la croissance folliculaire terminale au niveau de la stéroïdogenése, la P_4 est un régulateur partiel de la synthèse des androgènes; elle inhibe l'activité de la 17-20-α-hydroxylase (Armstrong *et al.*, 1987). De plus, la P_4 est capable d'induire une perte de sensibilité des follicules à la LH et à la FSH en ce qui concerne les sécrétions d'E_2 (Fortune et Vincent, 1983; Noël, 1994). La P_4 sécrétée par le corps jaune exerce donc un effet inhibiteur à différents niveaux du système hypothalamo-hypophyso-ovarien.

L'E_2 agit également à tous les niveaux de cet axe. En phase lutéale, il exerce une action inhibitrice sur la production des hormones hypophysaires, mais lorsque son émission atteint une certaine valeur et que le taux de P_4 chute suite à la lutéolyse, le phénomène de "Feed-back" s'inverse, devient positif et stimule l'émission de GnRH. Ces variations entraînent la libération brutale de LH et de FSH (pics préovulatoires menant à l'ovulation. L'oestradiol limite la conversion de Δ5-prégnénolone en P_4, mais peut également augmenter sa propre production en stimulant l'activité aromatasique induite par la FSH (Fortune et Vincent, 1983).

3.3.4. Stéroïdogenèse et sensibilité des follicules aux hormones gonadotropes

Perrad (1992) a observés que suite à une stimulation par les gonadotropines (LH et FSH), des follicules placés en culture *in vitro* ne montraient pas de variation du taux desécrétion de P_4 et que les sécrétions de Δ_4 et E_2 augmentent. Ces observations tendent à prouver que la LH et la FSH stimulent les trois grandes étapes de la biosynthèse des stéroïdes dans le sens d'une production accrue de E_2.

4. LES RECEPTEURS

4.1. Introduction générale (Darnell *et al.*, 1989).

Les récepteurs protéiques sont très importants en ce qui concerne la communication intercellulaire. On les trouve soit à la surface, soit dans le cytoplasme des cellules cibles et ils montrent une grande affinité pour un messager particulier. Lorsque ce messager entre en interaction avec son récepteur, il entraîne une séquence de réactions qui modifie l'activité cellulaire et la fonction de la cellule.

La réponse cellulaire dépend du type de récepteur concerné et du ligand qui s'y fixe; on peut donc avoir différentes possibilités:

- soit une cellule possède 2 types de récepteurs (ou plus) qui donnent deux réponses (ou plus) pour le même ligand.
- soit deux types cellulaires différents possèdent des récepteurs différents pour le même ligand, chaque récepteur provoquant une réponse qui lui est propre.
- soit le même type de récepteur se trouve à la surface de cellules différentes et y provoque des réponses différentes.

Lors de la fixation du ligand sur son récepteur, le ligand peut être transformé ou dégradé par les cellules cibles, ou il peut n'avoir comme rôle que de se lier au récepteur pour provoquer une réponse cellulaire au cours de laquelle il n'est pas métabolisé.

Les récepteurs sont caractérisés par la **spécificité de liaison à leur** ligand et par la **spécificité effectrice** relative à la variation d'énergie due au fonctionnement cellulaire qui s'en suit.

Les récepteurs peuvent interagir avec trois grandes catégories d'hormones différentes: les petites molécules liposolubles (ex: stéroïdes et thyroxine), les hormones hydrosolubles (ex: LH, FSH, insuline) et les grosses molécules lipophiles (ex: prostaglandines).

4.1.1. Les petites molécules lipophiles

Les petites molécules lipophiles peuvent diffuser à travers les membranes et se fixer à des récepteurs cytosoliques ou nucléaires; à partir du moment où le complexe récepteur-ligand est constitué les effets peuvent persister pendant des heures ou même des jours.

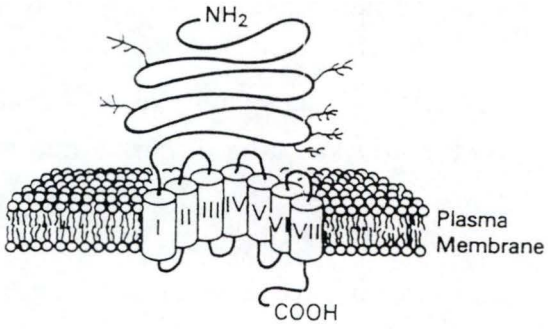
Les mécanismes d'action des hormones stéroïdiennes passent donc par des récepteurs intracellulaires. Ces hormones sont de petites molécules hydrophobes dérivées du cholestérol qui sont solubilisées par liaison réversible à des transporteurs sanguins spécifiques. Lorsqu'elles se détachent de leurs transporteurs, elles diffusent à travers la membrane plasmique des cellules cibles et se fixent réversiblement à des récepteurs protéiques spécifiques de ces hormones situés dans le cytoplasme ou le noyau.

La fixation du stéroïde à son récepteur permet une transformation allostérique du récepteur qui peut alors se lier à certaines séquences de l'ADN pour activer la transcription de certains gènes.

4.1.2. Les hormones hydrosolubles

Les hormones hydrosolubles sont des protéines hydrophiles incapables de traverser les membranes lipidiques qui constituent pour elles des barrières hydrophobes impossibles à franchir. Ces hormones sont donc obligées de se fixer à des récepteurs

a)



b)

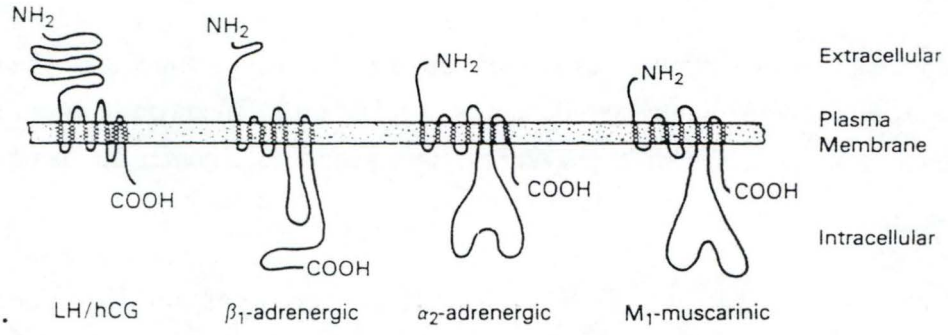


Figure 10: (a) Structure des récepteurs à sept passages transmembranaires; (b) Famille des récepteurs à sept passages transmembranaires (Yen et Jaffe, 1991).

logés à la surface des cellules cibles pour pouvoir exercer l'effet escompté.

L'activation ou l'inhibition engendrée par la fixation de l'hormone sur son récepteur est généralement de très courte durée et les effets de ces messagers sont immédiats.

Ces récepteurs membranaires sont des glycoprotéines présentant toujours trois domaines: un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire. Ces protéines présentent toujours la même orientation dans la membrane plasmique; c'est-à-dire que le NH_2 terminal se trouve à l'extérieur de la cellule tandis que le COOH reste cantonné dans le cytosol.

4.1.2.1 Récepteurs à un seul passage transmembranaire

Certains récepteurs semblent transmettre plus directement le signal à la cellule; ce sont des récepteurs catalytiques. Parmi ceux-ci, les mieux caractérisés dans les cellules animales sont des enzymes transmembranaires à traversée unique, **les protéines kinases spécifiques de la tyrosine,** dont le domaine catalytique n'est exposé que sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique.

La liaison du ligand active le transfert d'un Pi (Phosphate inorganique) de l'ATP (Adénosine Triphosphate) au groupement hydroxyle d'un résidu tyrosine de certaines protéines dans les cellules cibles; lesquelles se retrouvent ainsi activées et peuvent donner la réponse cellulaire correspondant à la stimulation (cascade de kinases).

Les récepteurs pour l'insuline et pour certains facteurs de croissance comme le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et le facteur de croissance épidermique (EGF) font partie de cette famille de récepteurs. La phosphorylation peut aussi toucher des résidus sérine ou, plus rarement, des résidus thréonine.

4.1.2.2. Récepteurs à sept passages transmembranaires

Les récepteurs à sept passages transmembranaires, liés aux protéines G, activent ou inactivent indirectement des enzymes liées à la membrane plasmique ou des canaux ioniques via des protéines de régulation liées au GTP qui s'auto-inactivent par une lente hydrolyse de leur GTP (fig.10, Yen and Jaffe, 1991).

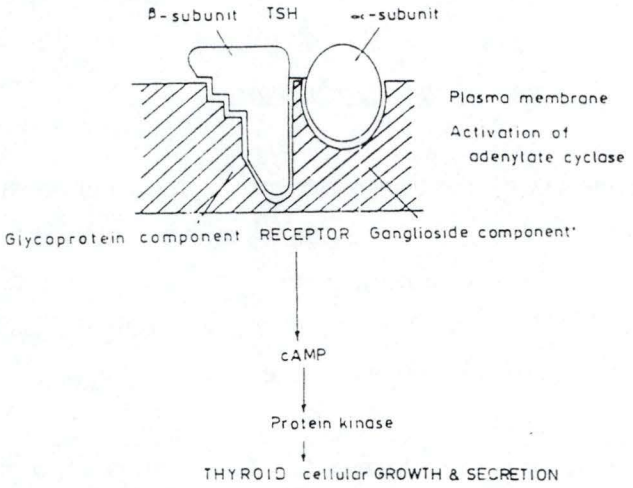


Figure 11 : Représentation du complexe hormone-récepteur pour la TSH; les complexes formés par la LH et la FSH et leurs propres récepteurs sont du même type (Ruckebusch *et al.*, 1991).

Certains récepteurs liés aux protéines G activent ou inactivent l'adénylate-cyclase, modifiant ainsi la concentration en AMPc; c'est le cas de certaines hormones (dont la LH et la FSH) et de médiateurs chimiques (comme l'adrénaline).

D'autres activent une phospholipase C spécifique des phosphoinositides qui hydrolysent le phosphatidylinositol biphosphate (PiP2) en deux messagers intracellulaires: l'inositol triphosphate (IP3) et le diacyl-glycérol (DAG). L'IP3 permet une augmentation de la concentration en Ca++ dans le cytosol et le DAG, qui reste dans la membrane plasmique, active la protéine kinase C qui phosphoryle différentes protéines nécessaires à la réponse cellulaire (fig. 11, Ruckebusch *et al.*, 1991).

4.1.2.3. Récepteurs à 24 passages transmembranaires

Les récepteurs à 24 passages transmembranaires sont des récepteurs liés aux canaux ioniques dont l'ouverture est régulée par un transmetteur; ils sont principalement impliqués dans la transmission d'un signal synaptique rapide entre les cellules électriquement excitables.

4.1.3. Les grosses molécules lipophiles

Les grosses molécules lipophiles sont incapables de traverser les membranes plasmiques parce qu'elles sont trop volumineuses. C'est le cas des prostaglandines qui pour exercer leurs actions se fixent sur des récepteurs situés dans la membrane plasmique.

4.2. Structure des récepteurs aux gonadotropines

Le message hormonal porté par les gonadotropines est transmis à leurs cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs glycoprotéines membranaires spécifiques. Les poids moléculaires des récepteurs à la LH et à la FSH ovines ont été déterminés par électrophorèse de ces hormones radioiodées complexées ou non avec leurs récepteurs.

C'est ainsi qu'après migration on obtient, pour la FSH, deux bandes; l'une correspondant à un PM (poids moléculaire) de 104.000 (l'hormone et son récepteur) et l'autre à un PM de 34.000 (l'hormone). De la même manière, on obtient pour la LH un pattern électrophorétique présentant 3 bandes; la première à 14.000 (une sous-unité de la LH), la deuxième à 34.000 (l'hormone) et la troisième à 184.000 (complexe hormone-

récepteur) (Yarney et Sairam, 1991).

On en déduit que le récepteur de la FSH a un PM de plus ou moins 70.000 (104.000 - 34.000) et que le récepteur de la LH a un PM de plus ou moins 150.000 (184.000 - 34.000) (Yarney et Sairam, 1991).

Cette glycoprotéine se présente sous forme dimérique dans la membrane plasmique. Après un récent clonage des ADNc des récepteurs porcin et de rat à la LH on a pu déterminer qu'ils sont constitués d'une chaîne polypeptidique de 669-674 résidus d'acides aminés dont la moitié N-Terminale forme la portion extracellulaire glycosylée responsable de la liaison à l'hormone et dont la moitié C-Terminale formerait sept passages transmembranaires ainsi qu'une courte portion intracellulaire. La même opération fut réalisée avec l'ADNc du récepteur à la FSH de rat. Celui-ci présente une structure globale semblable à celle des récepteurs à la LH; les deux récepteurs présentant 50% de similitude de séquence protéique dans leur portion réceptrice extracellulaire sont identiques à 80% en ce qui concerne le domaine transmembranaire (Thibault et Levasseur, 1991).

4.3. Interactions hormone-récepteur

Les récepteurs de la FSH ne font pas de discrimination entre la FSH ovine et celle d'autres mammifères (caprins, bovins, équins) tandis que les récepteurs de la LH marquent une forte préférence pour la LH ovine et bovine; les interactions avec d'autres préparations de LH sont très faibles et n'entraînent que des réponses peu importantes (Yarney et Sairam, 1991). Il est connu depuis longtemps que chez la femme la LH et l'hCG se lient au même récepteur et produisent le même effet biologique. Toutefois, l'affinité du récepteur pour la LH est beaucoup plus faible que pour l'hCG et les courbes dose-réponse réalisées *in vitro* vis-à-vis de la production d'AMPc ou de stéroïdes le prouvent (Ronin, 1989). Les dernières études réalisées suggèrent que les propriétés de structure et de liaisons des récepteurs de la FSH du mouton sont similaires à celles observées chez les récepteurs de la FSH d'autres mammifères. Par contre, les récepteurs à la LH apparaissent être différents d'une espèce à l'autre car, bien que leurs poids moléculaires et leurs structures soient très proches, ils montrent une grande spécificité pour leur ligand (Yarney et Sairam, 1991).

Les gonadotropines s'associent à leurs récepteurs via leur portion polypeptidique; l'arbre de glycosylation n'intervient pas puisque après une

« SPÉCIFICITÉ NÉGATIVE » DE L'INTERACTION DES HORMONES GLYCOPROTÉIQUES AVEC LEURS RÉCEPTEURS

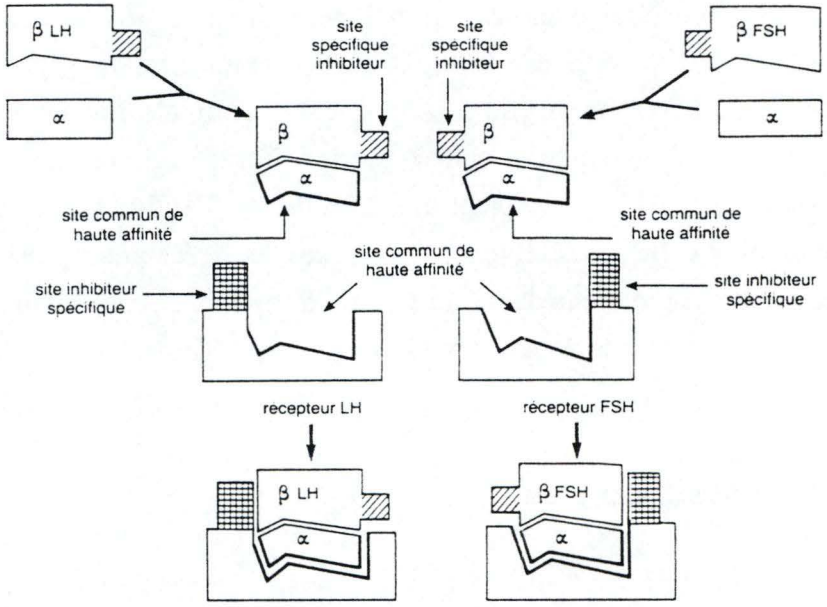


Figure 12 : Spécificité négative de l'interaction des hormones glycoprotéiques avec leurs récepteurs (Thibault et Levasseur, 1991).

déglycosylation, ces hormones sont toujours capables de se lier spécifiquement à leurs récepteurs. L'hypothèse formulée pour expliquer le mécanisme régissant la spécificité des hormones gonadotropes se présenterait comme suit :

- les différentes sous-unités ß portent les sites d'interaction aux différents récepteurs dans des conformations natives non-fonctionnelles;
- la liaison de la sous-unité α induit un changement conformationnel des sous-unités ß qui prennent leur structure tridimensionnelle active.

Une hypothèse complémentaire de la précédente est que chaque sous-unité contiendrait une partie du site de liaison aux récepteurs; les sous-unités ß en fourniraient la partie spécifique.

Dans le modèle présenté par Thibault et Levasseur (fig 12; 1991), les propriétés d'affinité et de spécificité sont structurellement séparées; les premières sont assurées par la sous-unité α, les secondes par la sous-unité ß. Les sites inhibiteurs spécifiques des sous-unités ß ainsi que ceux des récepteurs en contact avec cette même sous-unité conditionnent la spécificité de la liaison en inhibant la liaison d'une sous-unité α, donc d'une hormone, aux récepteurs d'autres hormones.

Dans ce modèle l'interaction des sous-unités α et ß a deux fonctions distinctes et complémentaires:

- elle induit la conformation active de la sous-unité α qui ne se lie pas aux récepteurs à l'état libre;
- elle discrimine, par inhibition spécifique, les types de récepteurs sur lesquels l'association de la sous-unité α active est autorisée.

4.4. Fonctionnement des récepteurs

La liaison de l'hormone (LH ou FSH) à son récepteur entraîne un changement de conformation qui permet au récepteur de s'associer à la protéine G qui est constituée de trois sous-unités (α, ß et γ). La G α (sous-unité α) possède un site de fixation au GTP et la G ß/γ est capable de s'associer au récepteur.

Lorsque la protéine G se lie au récepteur, le GDP présent sur la G α (forme inactive) est remplacé par un GTP (forme active) et entraîne la dissociation de la protéine en G α et G ß/γ . La sous-unité α ainsi activée entre en interaction avec l'adénylate

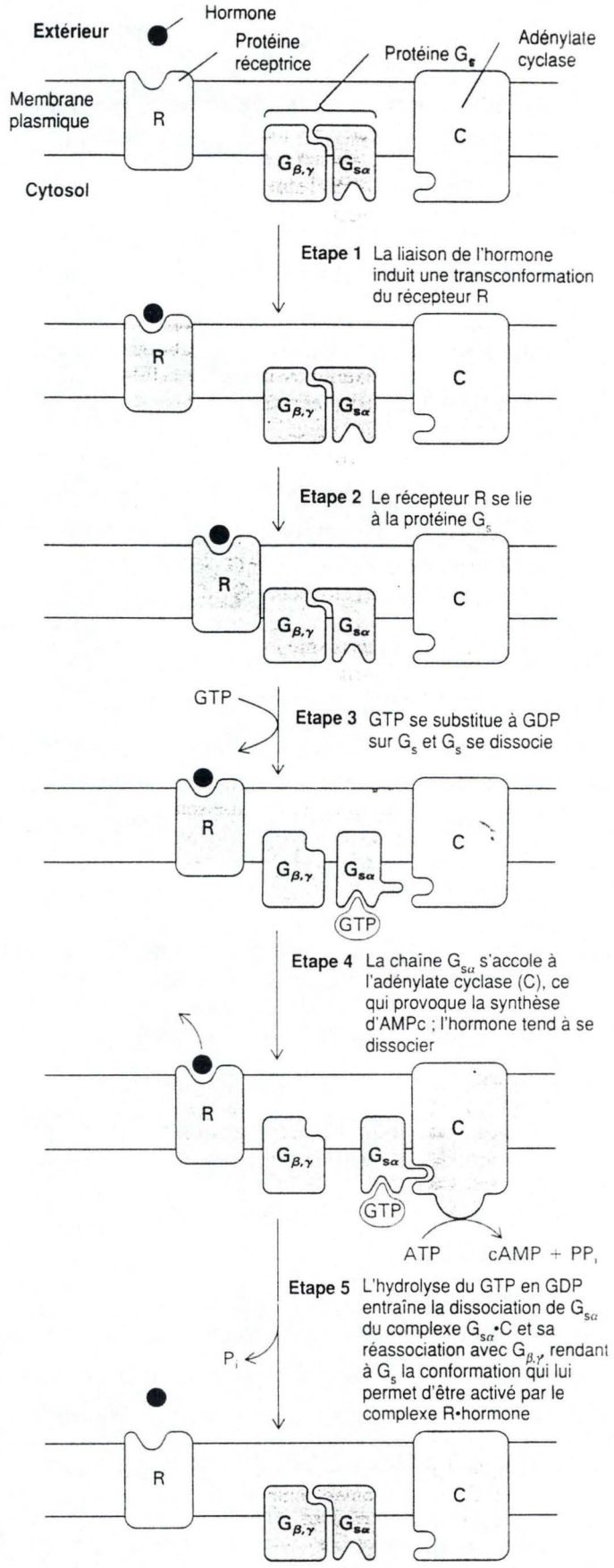


Figure 13 : Fonctionnement des récepteurs couplés à la protéine G (Darnell *et al.*, 1989).

cyclase et stimule la synthèse d'AMPc par hydrolyse du GTP en GDP. La G α étant désactivée, elle rejoint la G ß/γ et reconstitue la protéine G. L'AMPc ainsi produit, active une protéine kinase qui catalyse la phosphorylation de protéines ce qui permet d'engendrer la réponse cellulaire (fig.13, Darnell *et al.*, 1989; Catt et Dufau, 1991).

4.5. Localisation des récepteurs

La dépendance des follicules antraux de diamètre supérieur à 2 mm vis à vis des gonadotropines se traduit par la présence de récepteurs à la FSH et à la LH sur les cellules de la thèque et /ou de la granulosa ((fig 14; Webb and Gauld, 1984; Mariana et al., 1991)

Chez la brebis, les récepteurs à la FSH sont exclusivement présents au niveau des cellules de la granulosa (Mariana *et al.*, 1991). Leur nombre est constant pendant l'entièreté de la croissance folliculaire terminale. Par contre, la réponse des follicules à la FSH mesuré par la production d'AMPc augmente fortement avec la taille, ce qui suggère que dans les gros follicules des mécanismes, qui font suite à l'activation des récepteurs, amplifient l'action de la FSH (fig 15, Mariana *et al.*, 1991).

La fixation de la FSH sur son récepteur entraîne la stimulation de l'aromatase par l'intermédiaire de l'AMPc ainsi que l'expression de nouveaux gènes, la mise en membrane de nouveaux récepteurs de surface (notamment prolactine, LH, EGF et IGF) et la multiplication des cellules de la granulosa (Hsueh *et al.*, 1984; cités par Ronin,1989; Monget, 1993). La FSH stimule la production de ses propres récepteurs par les cellules de la granulosa. Cette action semble être favorisée par l'E_2 (Jia *et al.*, 1985)

Les récepteurs à la LH sont dans un premier temps exclusivement présents sur les cellules de la thèque des follicules de 2 mm de diamètre (Webb et Gauld, 1984). Ils apparaissent ensuite en concentration élevée sur la granulosa des follicules de diamètre supérieur à 4 mm (Tsonis *et al.*, 1984; Webb et Gauld, 1984). Le nombre de récepteurs à la LH sur les cellules de la granulosa augmente avec le diamètre des follicules et est corrélé avec une production accrue d'E_2 (fig 15, Mariana *et al.*, 1991). L'acquisition de récepteurs à la LH sur ces cellules est une indication de la maturité du follicule et de sa capacité de répondre au pic préovulatoire de LH.

La FSH stimule l'acquisition de récepteurs à la LH sur les cellules de la thèque interne et sur les cellules de la granulosa (Jia et al., 1985). La LH est également capable de stimuler l'apparition de ses propres récepteurs sur les deux types de cellules (Jia et

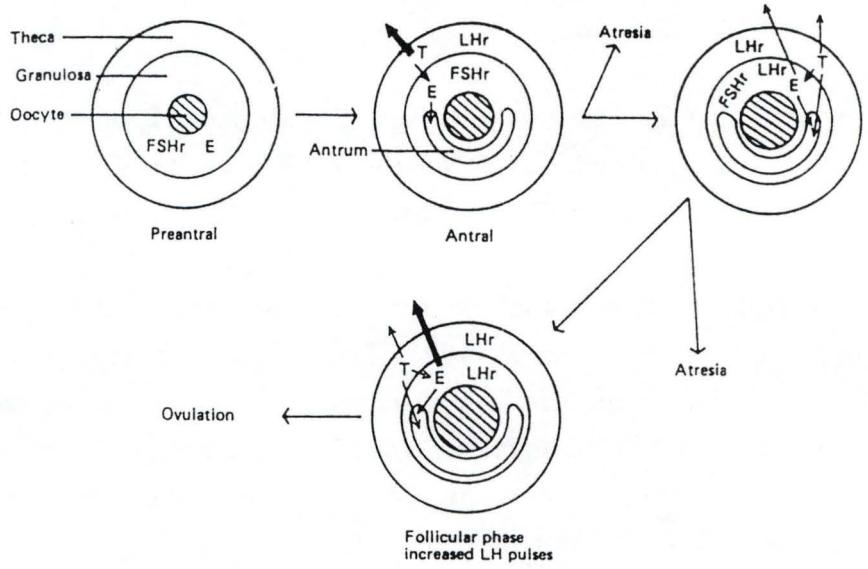


Figure 14 : Localisation des récepteurs aux gonadotropines au cours du cycle (Webb et Gauld, 1984).

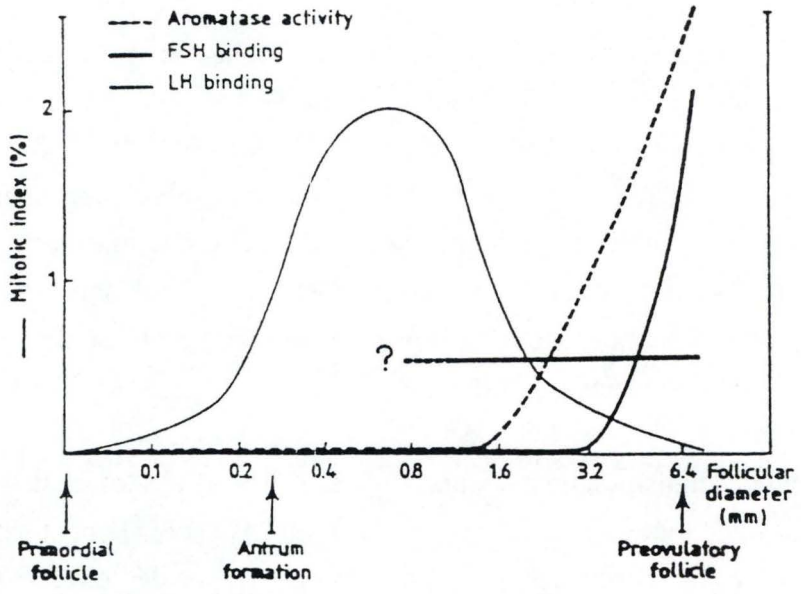


Figure 15 : Evolution de l'index mitotique, de l'activité aromatase et de la liaison aux gonadotropines dans les cellules granulosales au cours de la croissance folliculaire chez la brebis (Mariana *et al.*, 1991)

Hsueh, 1984). Après l'ovulation le nombre de ces récepteurs diminue pour atteindre un minimum dans les jours qui suivent (Ronin, 1989).

Enfin, on peut aussi trouver des récepteurs à la LH au niveau du corps jaune où ils sont responsables de l'activation de la sécrétion de P_4 (Bramley *et al.*, 1987). On peut encore trouver les récepteurs des gonadotropines au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse.

4.6. Rôle des récepteurs des gonadotropines

Les hormones gonadotropes jouent un rôle essentiel dans la régulation de la biosynthèse des stéroïdes sexuels. La FSH stimule la synthèse du cytochrome P-450scc (Goldring et al., 1987) et l'aromatisation des androgènes en oestrogènes par le complexe aromatase.

La fixation de la LH à son récepteur provoque la production d'androgènes probablement en stimulant la transcription du gène codant pour la 4-5 α-réductase. Cet effet est bloqué par l'oestradiol qui inhibe la 17-20α-hydroxylase et la 17-20 desmolase sans pour autant modifier le récepteur de la LH. En effet, ce stéroïde agirait plutôt au niveau transcriptionnel en exerçant un bloquage irréversible de la stimulation par la LH (Fukuda *et al.*, 1979; cités par Ronin, 1989).

4.7. Interaction des récepteurs des gonadotropines avec d'autres récepteurs membranaires dans le cadre d'une régulation de leur expression en membrane

La régulation des récepteurs hormonaux gonadiques est un mécanisme essentiel par lequel les hormones hypophysaires contrôlent le cycle oestral.

4.7.1. Couplage des récepteurs des gonadotropines et des récepteurs de la prolactine

La lutéinisation implique la participation de la FSH et de la prolactine pour induire l'augmentation du nombre de récepteurs de la LH tandis que la FSH, seule, provoque l'apparition des récepteurs de la prolactine. Un taux de prolactine élevé entraîne une diminution du nombre des récepteurs de la LH. Une concentration infraphysiologique a un effet opposé. Ainsi un traitement à la prolactine ovine entraîne une inhibition de l'ovulation et de la formation du corps jaune donnant de cette manière une population de

follicules atrétiques (Ronin, 1989)

4.7.2. Couplage avec les récepteurs de la GnRH

L'administration de GnRH ou d'agoniste de la GnRH entraîne, selon les cas, un retard d'ovulation, une maturation sexuelle retardée ou une interruption de grossesse. On a longtemps attribué ces effets à un mécanisme de "Down régulation"; c'est-à-dire que l'injection de GnRH, en entraînant la sécrétion de LH aurait pour conséquence une diminution du nombre de récepteurs de la LH, de la quantité de gonadotropines et une réduction de la stéroïdogenése (Schwall et Erickson, 1984).

Or, les mêmes observations ont été faites chez des animaux hypophysectomisés et, de plus, l'utilisation d'un agoniste radioiodé de GnRH a permis la détection de sites de fixation de la GnRH sur les membranes de tissus ovariens de rat .

Apparemment, des récepteurs à la GnRH ou à une molécule analogue à la GnRH (car le taux de GnRH dans le sang est trop faible pour provoquer une réponse biologique dans un tissu très éloigné de l'hypothalamus) seraient négativement couplés aux récepteurs des gonadotropines et de la prolactine, et inhiberaient la production d'oestrogènes et de progestérone par les tissus ovariens.

5. INFLUENCE DE LA PERIODE DE L'ANNEE SUR LA REPRODUCTION DE LA BREBIS

5.1. Introduction

L'activité sexuelle de la brebis est de type polyoestrus saisonnier ce qui signifie qu'elle présente une succession de cycles oestraux pendant une saison déterminée. Entre deux périodes de reproduction la brebis se trouve en anoestrus.

Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons à l'anoestrus saisonnier et à l'activité cyclique que nous avons subdivisé en trois périodes: le début, le milieu et la fin de la période de reproduction.

5.2. Le milieu de la saison de reproduction

Le milieu de la saison de reproduction est caractérisé par des cycles oestraux complets tels qu'ils ont été décrits dans les chapitres 1, 2 et 3.

5.3. Le début et la fin de la saison de reproduction

Le début et la fin de la saison de reproduction ont étà largement étudiés au Laboratoire de Physiologie Animale car si les brebis sont mises à la reproduction très tôt ou très tard dans la saison de reproduction, on peut obtenir trois agnelages en deux ans avec une seule induction de l'ovulation par traitement hormonal.

5.3.1. La croissance folliculaire

Pendant la durée du cycle oestral, en début et en fin de saison de reproduction, on observe toujours trois vagues de croissance folliculaire avec une concordance par rapport au milieu de la saison de reproduction en ce qui concerne les jours moyens d'apparition des follicules recrutés, sélectionnés et dominants (Noël *et al.*, 1993).

La taille maximale atteinte par les follicules, leur vitesse de croissance ainsi que le taux d'ovulation sont, selon Jacques (1989), identiques quel que soit le moment de la saison de reproduction . Par contre Scaramuzzy et Radford (1983) soulignent que le taux d'ovulation est maximum en début de saison de reproduction et diminue ensuite progressivement pour atteindre un minimum juste avant le passage en anoestrus.

5.3.2. Profils des sécrétions plasmatiques des gonadotropines et des stéroïdes

La sécrétion des hormones sexuelles est encore mal connue pour le début et la fin de la saison de reproduction; nous avons rassemblé ci-après les données disponibles.

Le début de l'activité sexuelle cyclique montre généralement chez les brebis Texel (Bister, 1980) et Clun Forest (Walton et *al.*, 1977) 2 pics de sécrétion de la LH: un pic ovulatoire normal et un autre pic de même amplitude qui le précéde de 5 à 7 jours.

La sécrétion de la FSH ne montre aucune variation suite à l'entrée en période de reproduction, si ce n'est l'apparition de pics ovulatoires concomitants à ceux de LH

(Bister, 1980).

La concentration en P_4 augmente suite au développement de corps jaunes qui font suite à l'ovulation. Le profil de sécrétion de E_2 reste identique à celui observé en milieu de la saison de reproduction puisqu'il suit les vagues de croissance folliculaire (Bister, 1980).

Selon Rawlings *et al.* (1977) les cycles se terminent par un pic de LH très faible le jour présumé de l'ovulation. Celle-ci se produit néanmoins et est précédée par une hausse normale du taux d'E_2 et par un comportement d'oestrus. La production de P_4 par le corps jaune qui apparaît après l'ovulation est normale.

Legan et Karsch (1979) ont effectué des observations assez différentes : le dernier pic de LH est faible, de l'ordre de 10 fois le niveau de base. Il n'est pas accompagné de l'augmentation classique de la concentration d'E_2 et de P_4.

5.3.3. Stéroïdogenèse et sensibilité des follicules aux hormones gonadotropes

Les derniers résultats obtenus au laboratoire de Physiologie Animale (Perrad, 1992) montrent que les follicules prélevés à des périodes différentes du cycle et de la saison de reproduction n'ont pas le même potentiel stéroïdogénique et ne répondent pas de la même manière aux stimulations par les gonadotropines. Ainsi, au début de la saison de reproduction, la stéroïdogenèse et la réponse aux stimulations gonadotropes s'effectuent de la même façon qu'au milieu de la saison de reproduction; c'est-à-dire que, suite aux stimulations hormonales, le taux de P_4 ne varie pas et que les sécrétions de Δ_4 et E_2 augmentent. Ces observations tendent à prouver que la LH et la FSH stimulent les trois grandes étapes de la biosynthèse des stéroïdes dans le sens d'une production accrue de E_2.

Roy et Greenwald (1989) ont montré que la LH favorise la production de P_4 tandis que d'autres auteurs (Fansul et al., 1984) montrent une action positive de la FSH sur la sécrétion de P_4. Cette augmentation du taux de P_4 n'apparaît pas car durant cette même période l'apport de LH active 17-20-α-hydroxylase au niveau des cellules thécales, ce qui permet la transformation de la P_4 en Δ_4 (Fortune et Vincent, 1983; Renard, 1991); de la même manière la FSH active le complexe aromatase qui est responsable de la transformation de Δ_4 en E_2 (Kessel *et al.*,1987; Renard, 1991). Cette dernière action peut également être amplifiée par la LH (Webb *et al.*, 1992).

En ce qui concerne la fin de la saison de reproduction, les expériences réalisées par Perrad (1992) ont révélé des accumulations de P_4 et Δ_4 et de faibles sécrétions de E_2. Les taux de P_4 sont beaucoup plus élevés qu'au milieu de la saison de reproduction, tout en restant inférieurs aux taux sécrétés par les corps jaunes (8 ng/ml). Ces résultats suggèrent que le complexe aromatase est inactivé en phase folliculaire et entraîne donc un bloquage de la transformation de Δ_4 en E_2. Ces résultats pourraient être dûs au fait que le pic de LH apparaît plus tôt en fin de saison de reproduction. Au jour 16, les follicules seraient déjà en phase de lutéinisation (Fortune et Vincent, 1983). Les follicules restent cependant aptes à répondre à un apport de LH et de FSH par une augmentation des sécrétions de Δ_4 et d'E_2 (Perrad, 1992; Noël et al., 1992).

5.4. L'anoestrus saisonnier

L'anoestrus saisonnier est une adaptation aux variations climatiques de l'endroit où vit la race considérée. Il permet la naissance des jeunes lorsque les conditions climatiques sont favorables et lorsque la nourriture est abondante. Ainsi, dans nos régions la brebis se reproduit en automne et agnèle au printemps. Les agneaux naissent donc à la poussée de l'herbe et dans des conditions météorologiques propices à leur survie (Bister, 1991).

5.4.1. Sécrétions hormonales et contrôle

La photopériode est le principal facteur environnemental qui contrôle le passage d'un état physiologique apte à la reproduction à un état d'anoestrus saisonnier. Comme nous l'avons déjà dit, la période de reproduction apparaît en juillet/septembre lorsque la luminosité décroît et l'anoestrus saisonnier s'installe en avril/juin quand la duré du jour s'allonge.

La photopériode intervient dans le contrôle de la sécrétion d'hormones : la mélatonine et la prolactine. En effet, le taux de prolactine chez la brebis est directement proportionnel à la durée du jour alors que celui de mélatonine est inversément proportionnel.

Bien que ces deux hormones soient sous le contrôle de la photopériode; Piraux (1990) a mis en évidence que seule la mélatonine était responsable de l'entrée en période de reproduction. En effet, une inhibition de l'émission de prolactine ne permet pas un

redémarrage des cycles alors qu'un implant sous-cutané de mélatonine augmente la sécrétion en LH et avance le début de la saison de reproduction.

Selon certains auteurs, la mélatonine induirait un changement de la sensibilité de l'axe hypothalamo-hypohysaire au rétro-contrôle exercé par les stéroïdes ovariens (Legan et al., 1985; Martin et al., 1988). La cessation des phénomènes cycliques proviendrait de la perte du mécanisme de "feed-back" positif exercé par l'E_2 sur l'hypothalamus (Legan et al., 1985) alors que le phénomène de "feed-back" négatif serait renforcé (Martin et al., 1988). Ceci se concrétise par une diminution de la fréquence des pulses de GnRH et donc une diminution de la sécrétion de LH (Legan et al., 1985). Par contre, d'autres auteurs suggèrent que la sensibilité de l'axe hypothalamo-hypophysaire aux stéroïdes ne serait pas modifié pendant l'anoestrus mais que les concentrations en E_2 seraient trop faibles pour pouvoir déclencher le phénomène de rétro-contrôle positif (Haresein et al., 1984).

En anoestrus, la pulsabilité de la LH est d'environ 1 pulse toutes les 8 heures (Mandiki, 1991), alors que durant un cycle normal on peut avoir 1 pulse toutes les 2 à 4 heures. Donc, l'administration de LH ou de GnRH entraîne l'achèvement de la phase finale du développement du follicule préovulatoire, la génération suffisante de E_2 pour induire le pic de LH et l'ovulation (Mc Neilly *et al.*, 1991).

Il est à noter que la présence de LH ou de GnRH n'est pas suffisante; il faut également un taux adéquat de FSH; en effet, l'administration de FSH, en même temps qu'un traitement pulsatile à la LH, augmente le taux d'ovulation (Mc Neilly *et al.*, 1991).

Lorsqu'on traite des brebis en période d'anoestrus avec de la LH-RH (LH-Releasing Hormone), on induit une grande sécrétion de LH et de FSH qui méne à l'ovulation chez le quart des brebis traitées. On constate cependant que les corps jaunes induits pendant l'anoestrus grâce à la LH-RH, produisent moins de progestérone que ceux obtenus en saison de reproduction .

Ces observations suggèrent que, chez les ovins, la formation des récepteurs à la LH au niveau du corps jaune est largement indépendante du développement de la capacité de sécréter de la progestérone bien que l'augmentation du nombre de récepteurs pour la LH apparaît être le facteur majeur dans la régulation de la sécrétion de progestérone par le corps jaune. Il n'existe donc pas une relation directe entre la liaison de la LH sur les cellules lutéales et la sécrétion de P_4 (Mc Neilly *et al.*, 1981).

La sécrétion des gonadotropines dépend de la présence des stéroïdes qui peuvent agir en feed-back, cette dépendance varie au cours de l'année mais reste toujours présente; même pendant l'anoestrus saisonnier (Goodman et Karsch, 1980). Durant cette période, les brebis Suffolk ne présentent pas d'ovulation alors que d'autres espèces peuvent présenter des phases anovulatoires entrecoupées de période d'ovulation. C'est la sensibilité des mécanismes de feed-back de l'E2 qui explique cette différence (Pearce et Oldman, 1988).

En ce qui concerne la sécrétion de la FSH, les avis quant à une variation saisonnière sont partagés. Certains auteurs ont montré qu'il n'existe aucune différence significative au niveau des concentrations plasmatiques de FSH durant une année (Haresein et al., 1984; Jacques, 1989). Par contre, d'autres affirment qu'il existe des variations saisonnières de la quantité de FSH sécrétée; ainsi Montgomery *et al.* (1988) pensent qu'une augmentation de la concentration en FSH au début de la saison de reproduction permet le retour à une activité sexuelle cyclique.

5.4.2. La croissance folliculaire

Sachant qu'il faut plus ou moins 6 mois pour qu'un follicule primordial arrive au stade de follicule de De Graaf, il est évident que les follicules qui ovulent en période de reproduction ont subi la folliculogenèse basale en anoestrus saisonnier (Cahill et Mauléon, 1980; Webb *et al.*, 1992).

Cahill et Mauléon (1980) ont aussi montré que le nombre de follicules préantraux augmente en anoestrus et chute en saison de reproduction tandis que la population de follicules antraux subit une évolution inverse.

Ces auteurs ont encore mis en évidence que la vitesse de croissance folliculaire ne montre aucune différence significative entre la saison de reproduction et la période d'anoestrus (Cahill et Mauléon, 1980). Ces résultats ont été confirmés par Jacques (1989) qui a observé que le nombre de follicules préovulatoires est identique en anoestrus saisonnier (léger ou profond) et en période de reproduction. Ces données s'opposent à celles obtenues par Mc Natty et al (1985) qui ont observé un ralentissement de la croissance folliculaire en anoestrus profond. Selon certains auteurs (Craplet et Thibier, 1980) il faut également faire une distinction entre l'anoestrus vrai qui se caractérise par une absence d'ovulation et de comportement oestral, et l'anoestrus faux durant lequel il peut y avoir des ovulations dites sourdes car n'étant pas associées à un comportement

oestral.

Noël *et al.* (1993) et Jacques (1989) ont également observé, en anoestrus, des vagues de croissance folliculaire terminale d'une durée semblable à celles obtenues au cours du cycle; ainsi que des nombres moyens de follicules recrutés, sélectionnés et dominants proches de ceux rencontrés en période de reproduction. Les follicules suivent donc le même schéma de développement bien qu'aucun ne parvient à l'ovulation. Des constatations similaires ont été effectuées chez la jument pendant l'anoestrus de gestation (Genther *et al.*, 1989).

5.4.3. La stéroïdogenèse des follicules

L'analyse des concentrations en stéroïdes dans la circulation sanguine montre que la stéroïdogenèse continue durant l'anoestrus saisonnier. Le potentiel de stéroïdogenèse d'un follicule peut être estimé en mesurant la production d'E_2 *in vitro; si* celle-ci est supérieure à 500 pg E_2/ ml/h, le follicule sera appelé "oestrogène-actif" (Webb *et al.*, 1992).

Les expériences de Weeb *at al.* (1992) ont montré que les mécanismes contrôlant le taux d'ovulation restent fonctionnels durant l'anoestrus saisonnier. Premièrement la capacité des follicules à produire plus de 500 pg E_2/ ml /h *in vitro* et le nombre moyen de follicules producteurs de E_2 par brebis restent identiques à ceux observés en période de reproduction. Deuxièmement, le nombre de follicules ovulant en réponse à une dose ovulatoire de hCG est typique du taux d'ovulation de l'espèce considérée. Troisièmement, l'hypertrophie ovarienne compensatoire arrive aussi durant l'anoestrus saisonnier; le nombre de follicules E_2-actifs est doublé 7 jours après une ovarectomie unilatérale en période d'anoestrus.

Par contre, les expériences réalisées par Perrad (1992) montrent que les sécrétions d'E_2 par les follicules prélevés en anoestrus sont nettement inférieures à celles obtenues au milieu de la saison de reproduction. Les follicules restent cependant capables de répondre à un apport de LH et de FSH par une hausse des taux de Δ_4 et d'E_2. Ces résultats indiqueraient une déficience fonctionnelle du complexe aromatase en anoestrus; ce qui confirme les résultats obtenus par Jacques (1989) et Renard (1991).

Par contre, l'hypothèse de Mc Natty *et al.* (1985) suppose que l'activité aromatase est similaire à celle obtenue au cours de la saison de reproduction et qu'un

manque de précurseurs entraîne une diminution de la production d'E_2; il n'y a pas de réduction de la production de Δ_4 ni de P_4.

Travail

Personnel

Objectifs

Poursuivis

Les résultats obtenus précédemment au laboratoire montrent que le moment du cycle oestral ainsi que la saison influencent la stéroïdogenèse et la réponse des follicules à une stimulation hormonale. Pour essayer d'expliquer ces résultats, deux types d'approches ont été envisagées.

La première postule que les différents états physiologiques conditionnent la teneur du fluide folliculaire en facteurs de croissance ainsi que la sensibilité des follicules vis-à-vis des mêmes facteurs. Cette approche a fait l'objet d'un mémoire de fin d'étude (Botspoel, 1993).

La seconde hypothèse est basée sur le fait que, selon la littérature, la régulation de l'ensemble des récepteurs hormonaux présents dans les follicules ovariens est un des mécanismes essentiels par lequel les hormones hypophysaires contrôlent la fonction de reproduction et la stéroïdogenèse. Déterminer le nombre de récepteurs présents sur les cellules de la granulosa au cours de la croissance folliculaire terminale pourrait permettre d'apporter des éléments nécessaires à la compréhension du mode d'action des hormones hypophysaires au niveau des gonades. C'est dans le cadre de cette approche que se situe notre mémoire de fin d'étude. Nous sommes partis de l'hypothèse que l'état physiologique est responsable de modifications quantitatives des récepteurs aux gonadotropines présents sur les cellules folliculaires.

Le premier but a été de mettre au point une technique de quantification des récepteurs à la LH et à la FSH présents sur les cellules de la granulosa de follicules ovariens de brebis.

Cette technique a ensuite été utilisée afin d'étudier l'influence du moment de la saison de reproduction et de l'anoestrus sur le nombre de récepteurs à la LH et à la FSH présents à la surface des cellules de la granulosa de follicules pendant la durée d'un cycle oestral. Parallèlement à la quantification des récepteurs, nous avons étudié les profils plasmatiques de sécrétion de la LH, de la FSH, de l'oestradiol et de la progestérone. Au cours de chaque période étudiée, des follicules ont également été prélevés au jour 16 du cycle (18 jours après l'arrêt du traitement aux progestagènes en anoestrus) et mis en culture *in vitro* afin d'en étudier la stéroïdogenèse et la réponse à une stimulation gonadotrope.

Matériel et Méthodes

1. CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Les ovaires nécessaires à la mise au point de la technique de quantification des récepteurs aux gonadotropines (LH et FSH) proviennent de l'abattoir d'Anderlecht.

Les brebis Suffolk utilisées pour les expériences font partie du troupeau du Centre de Recherche Ovine de Faulx-les-Tombes. Selon le moment de l'année et les nécessités des expériences, les animaux sont laissés en prairie avec de l'herbe comme seul aliment ou rentrés en bergerie avec des rations adaptées à leur besoin d'entretien. Les conditions naturelles de photopériode sont toujours respectées.

Les manipulations *in vivo* ont été effectuées au Centre de Recherche Ovine de Faux-les-Tombes. La mise au point de la technique de dosage des récepteurs à la LH et à la FSH, l'utilisation de cette technique ainsi que les dosages hormonaux, les cultures *in vitro* et le traitement des données ont été effectués au Laboratoire de Physiologie Animale des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix à Namur.

2. MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE

2.1. Récolte

Les ovaires sont récoltés une fois par semaine à l'abattoir d'Anderlecht. Le nombre d'ovaire obtenu par récolte est très variable selon le moment de l'année. De plus, la qualité des ovaires est inégale et varie selon l'état physiologique (anoestrus, phase folliculaire ou lutéale du cycle), l'âge ou l'état corporel de la brebis. Un tri des ovaires doit donc être réalisé avant le ponctionnement des follicules. Etant donné qu'il s'agissait d'une mise au point, nous n'avons réalisé aucune distinction quant à la race des brebis utilisées (Suffolk, Texel ou autres).

Après prélèvement, les ovaires sont placés dans du milieu de culture (M199) maintenu à 4°C et transportés jusqu'au laboratoire. Tous les follicules de 4 à 6 mm de diamètre sont ponctionnés; le contenu de l'antrum folliculaire, c'est-à-dire les cellules de la granulosa et le fluide folliculaire, est prélevé par aspiration à l'aide d'une fine aiguille reliée à un tube de polystyrène maintenu sous-vide grâce à une pompe à eau. L'appareillage est ensuite rincé avec du tampon PBS.

Les cellules sont récupérées par centrifugation pendant 10 minutes à 1000 g. Le culot de cellules est lavé 2 fois avec du PBS (pour enlever le fluide folliculaire) et resuspendu dans 200 µl de tampon PBS en vue du comptage.

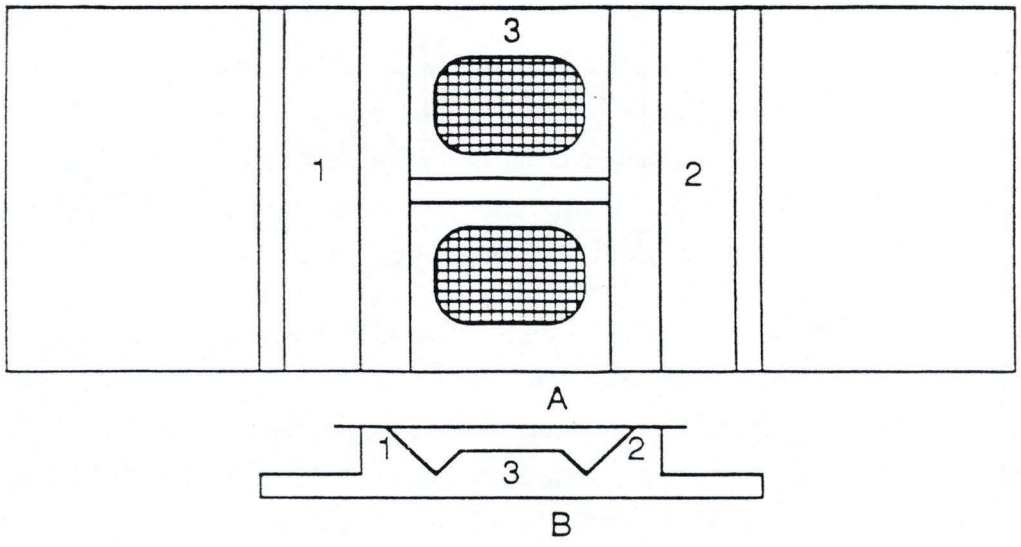
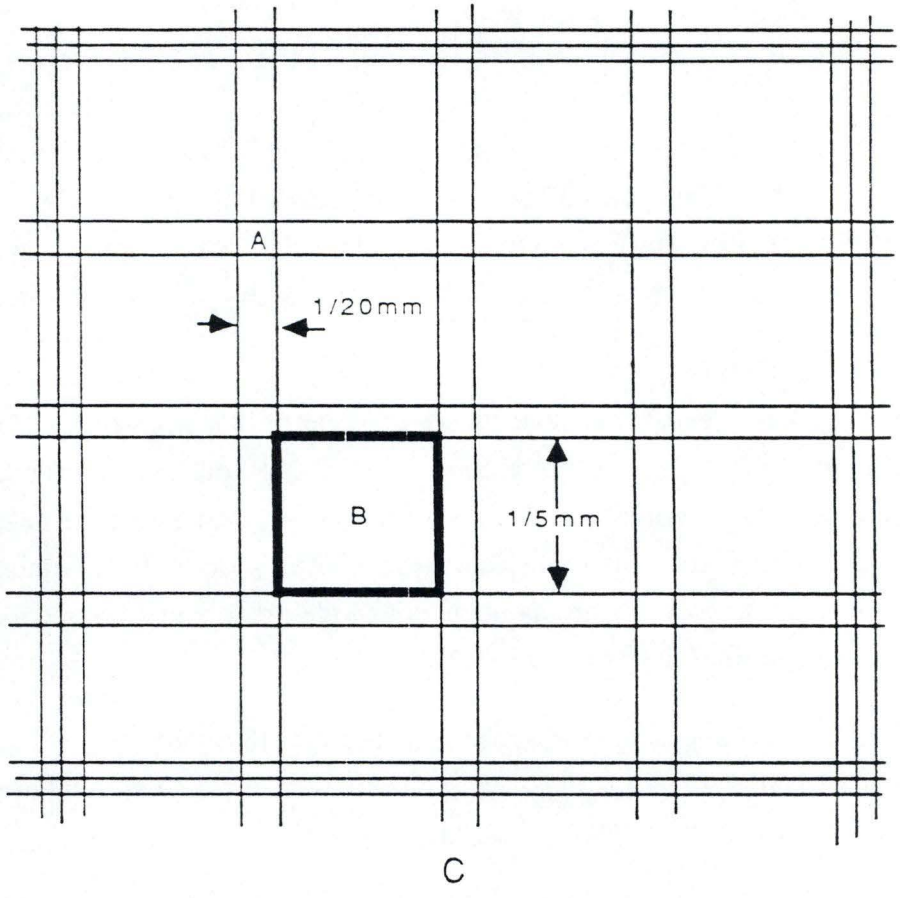


Figure 16 : La cambre de Burker : (A) vue du dessus, (B) vue latérale. 1 et 2 : support de la lame couvre-objet, 3 : plateau dans lequel sont gravés les quadrillages.



Figue 17 : Schéma d'un des grands carrés du quadrillages.

2.2. Comptage et dilution des cellules

Le comptage des cellules se réalise grâce à une cellule de Burker (fig. 16). Il s'agit d'une épaisse lame de verre portant deux quadrillages gravés dans la masse comme celui de la figure 17. On humecte les bords 1 et 2 et on y dépose un couvre-objet. La distance entre les quadrillages et le couvre-objet est de 1/10 mm. Le volume couvert par la surface A est donc de 1/4000 mm^3 et celui déterminé par la surface B est de 1/250 mm^3. Pour remplir la cellule, une petite goutte de suspension cellulaire est déposée sur le bord du quadrillage et pénètre sous la lamelle couvre objet par capillarité.

Le comptage des cellules est effectué dans 25 carrés de type B. On fait défiler méthodiquement les carrés ligne par ligne et on compte les cellules situées dans le carré ou à cheval sur les bords supérieurs et gauches. En tenant compte de la dilution des cellules et du volume situé entre un carré B et le couvre-objet, on calcule le nombre de cellules / mm^3 grâce à la formule suivante :

$$\frac{\text{somme des cellules pour les 25 carrés}}{25} \times 250 \times 200 \text{ cellules / mm}^3$$

Une fois le comptage effectué, on procède à une dilution dans du tampon PBS de manière à obtenir une suspension cellulaire contenant 10^6 cellules/200µl; cette concentration sera utilisée pour toute la mise au point de la méthode de quantification des récepteurs aux gonadotropines qui sera décrite ultérieurement.

3. EXPERIENCE

3.1. Objectifs poursuivis

Le premier objectif de l'expérience était de quantifier les récepteurs à la LH et à la FSH présents sur les cellules de la granulosa des follicules ovariens de brebis, pendant 17 jours consécutifs (c'est-à-dire la durée d'un cycle oestral), à différents moments de la saison de reproduction et en anoestrus. Lors de chaque période considérée, les résultats obtenus ont été mis en relation avec les profils de sécrétion plasmatique de la LH , de la FSH, de la P_4 et de l'E_2.

Nous avons aussi étudié la stéroïdogenèse et la réponse à une stimulation de LH-FSH de follicules prélevés au jour 16 du cycle et placés en culture *in vitro* afin de vérifier s'il existait un parallélisme entre le nombre de récepteurs à la LH et à la FSH

présents sur les cellules de la granulosa et la réponse des follicules à une stimulation par la LH puis par la FSH.

3.2. Protocole expérimental

L'expérience a débuté en février 1993 et s'est terminée en octobre 1993 avec 32 brebis Suffolk adultes, 8 pour chaque période.

Quatre essais sont réalisés à quatre périodes différentes:

- en fin de saison de reproduction (février -mars 1993);
- en anoestrus saisonnier (avril-mai 1993);
- en début de saison de reproduction (juillet 1993);
- au milieu de la saison de reproduction (octobre 1993).

Afin de permettre les comparaisons, il est nécessaire que toutes les brebis soient au même stade du cycle au début des essais. Ceci n'est possible que par une synchronisation des cycles. Les brebis sont pré-synchronisées avec une éponge vaginale de fluorogestone acétate (FGA) pendant 14 jours. L'ovulation apparaît ± 58 heures après le retrait de l'éponge et nous travaillons sur le cycle suivant la synchronisation.

Lors des 4 essais, nous réalisons quotidiennement pendant 17 jours (durée d'un cycle) des endoscopies sur 4 brebis. Chaque jour, le plus gros follicule présent à la surface de l'ovaire est ponctionné afin de récolter le fluide folliculaire et les cellules de la granulosa. Celles-ci sont ensuite séparées de la phase liquide du fluide folliculaire par centrifugation et conservées par congélation. Les récepteurs à la FSH et à la LH présents sur les cellules de granulosa sont ensuite quantifiés selon la technique que nous avons mise au point.

Pendant les 17 jours, des prises de sang quotidiennes sont également effectuées sur les 4 brebis afin d'étudier les profils de sécrétion de la FSH, de la LH, de la P_4 et de l'E_2.

Au cours de chaque période, les ovaires des 4 brebis sont prélevés après abattage au jour 16 suivant la synchronisation. Les follicules de 4 mm de diamètre sont placés en culture *in vitro* afin d'étudier leur stéroïdogenèse et leur réponse à une stimulation gonadotrope (LH-FSH). Pour étudier le fonctionnement des follicules mis en culture, il est primordial que ceux-ci soient sains. Or, il est impossible de déterminer visuellement leur état physiologique, c'est-à-dire s'ils sont en phase de croissance ou en atrésie. Pour pallier ce problème, nous avons réalisé des endoscopies 2 jours avant le

Période de l'année	Pose d'éponges de FGA	Retrait des éponges	Endoscopies et prises de sang quotidiennes	Endoscopie pour la localisation des follicules en croissance	Abattage des brebis et mise en culture des follicules
Fin de la saison de reproduction	05/02/93	19/02/93	Du 22/02/93 au 11/03/93	08/03/93	10/03/93
Anoestrus saisonnier	02/04/93	16/04/93	Du 19/04/93 au 06/05/93	03/05/93	05/05/93
Début de la saison de reproduction	18/06/93	02/07/93	Du 05/07/93 au 21/07/93	18/07/93	20/05/93
Milieu de la saison de reproduction	17/10/93	01/10/93	Du 04/10/93 au 21/10/93	11/10/93 (Ph.Lutéale) 18/10/93 (Ph.Foll.)	13/10/93 (Ph.Lutéale) 20/10/93 (Ph.Foll.)

Tableau 1 : calendrier expérimental.

prélèvement, afin de localiser et de mesurer l'ensemble des follicules présents sur les ovaires. Nous avons considéré comme sain tout follicule ayant présenté une croissance pendant la période de 48 heures précédant l'abattage.

Le calendrier expérimental est résumé dans le tableau 1.

3.3. Méthodes utilisées

3.3.1. Techniques et traitements utilisés *in vivo*

3.3.1.1. Synchronisation des cycles

La synchronisation des cycles est, comme précisé dans les plans expérimentaux, réalisée par le recours à un progestagène.

La synchronisation par le progestagène se fait via la pose d'éponges de polyuréthane imprégnées de 40 mg d'un dérivé de la progestérone, le Fluorogestone Acétate (FGA), commercialisée par Intervet, AKZO, sous le nom de Chronogest®. L'éponge fixée au bout d'un tube en PVC est introduite jusqu'au fond du vagin et laissée en place grâce à un mandrin placé dans le tube. Avant chaque pose d'éponge, le tube en PVC est soigneusement nettoyé dans une solution désinfectante. Le retrait se pratique simplement en tirant légèrement vers le bas la ficelle qui sort de la vulve et à laquelle est fixée l'éponge. Le retrait se fait le matin du 14ème jour après la pose.

3.3.1.2. Endoscopie

L'endoscopie est l'examen d'un organe interne à l'aide d'une sonde optique. Le déroulement pratique peut se résumer comme suit. La brebis est immobilisée en décubitus dorsal sur une table inclinable, l'arrière-train est soulevé un peu plus haut que la tête de façon à faciliter l'observation des ovaires grâce au tassement des viscères contre le diaphragme. La paroi abdominale est rasée et désinfectée avec de l'Hibitane®. Deux anesthésies locales à la Xylocaïne® sont pratiquées aux endroits prévus pour la pose de l'endoscope et du palpeur, c'est-à-dire à 10 cm de part et d'autre de la ligne médiane et à une quinzaine de cm de la naissance du pis, en évitant soigneusement la veine mammaire. Les instruments introduits après perforation au trocart sont un endoscope Wolf muni d'une fibre de verre souple qui le relie à une source lumineuse de 150 Watts et un palpeur gradué permettant la manipulation des ovaires et la mesure de la taille des follicules. De l'air filtré est insufflé par un petit compresseur, afin de soulever la paroi abdominale et le péritoine.

Le tractus génital est ainsi livré à l'oeil de l'observateur. Une observation rapide permet de déterminer l'ovaire (gauche ou droit) et la face observée (externe ou interne). Ensuite, le plus gros follicule présent à la surface de l'ovaire est ponctionné à l'aide d'une seringue à tuberculine munie d'une fine aiguille de 7 cm de long introduite au niveau de l'aisselle de la brebis. A la fin de l'opération, les instruments sont retirés et désinfectés à l'alcool. Les incisions sont désinfectées et refermées par une agrafe de Michel.

C'est aussi par endoscopie que s'effectue le relevé de la taille et de la localisation de tous les follicules présents à la surface des ovaires des 4 brebis abattues en vue de la culture des follicules.

3.3.1.3. Récolte et conservation des cellules de la granulosa

Après ponction, les cellules sont séparées du fluide folliculaire par centrifugation à 1000 g pendant 10 minutes; on resuspend ensuite le culot dans du tampon PBS (45 gr NaCl, 38,5 gr $Na_2 HPO_4$, 3,75 gr KH_2PO_4, 0,5 gr azide de Na pour 5 litres de tampon PBS) contenant 20 % de glycérol. Après homogénisation, on congèle à - 70°C jusqu'à la quantification des récepteurs aux gonadotropines.

3.3.1.4. Prises de sang

Les prélèvements sanguins sont effectués au niveau de la veine jugulaire. On gonfle d'abord la veine en appliquant un garrot à la base du cou et on y introduit une aiguille stérile. Le sang est recueilli dans des tubes héparinés de manière à éviter la coagulation et immédiatement centrifugé (3000 tours/minute pendant 15 minutes) afin de séparer les éléments figurés du plasma. Le plasma est stocké dans des tubes de polystyrène et congelé à - 20°C jusqu'au moment du dosage des différentes hormones (FSH, LH, P_4 et E_2) puis aussitôt recongelé.

3.3.2. Détermination du nombre des récepteurs aux gonadotropines

Cette quantification des récepteurs à la FSH et à la LH s'effectue par des techniques radioimmunologiques qui ont demandées une mise au point qui s'est effectuée au laboratoire de Physiologie Animale et qui est décrite dans la partie "Mise au point de la méthode de quantification".

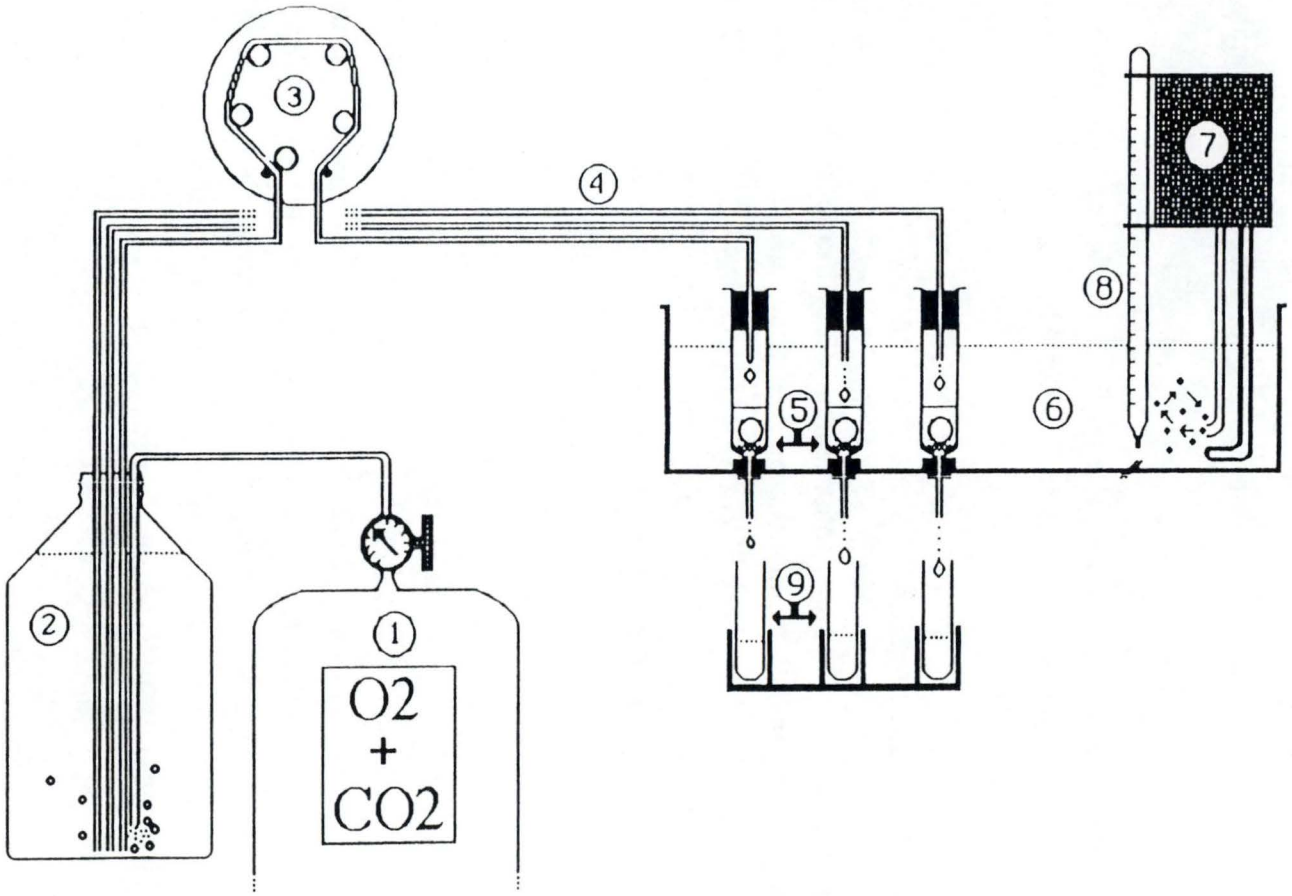


Figure 18 : Système de périfusion. 1 : mélange gazeux O_2 (95%) + CO_2 (5%), 2 : milieu de culture, 3 : pompe péristaltique, 4 : tuyau en tygon, 5 : chambres de culture, 6 : bain termostatisé.

3.3.3. Techniques et traitements utilisés *in vitro*

3.3.3.1. Culture in vitro des follicules ovariens

a) Préparation du milieu de culture

Notre choix s'est porté sur le milieu 199 commercialisé par la firme GIBCO (N° 079-00011P). C'est un milieu couramment utilisé dans le cadre de cultures cellulaires. Il est acheté sous forme de poudre à dissoudre dans de l'eau ultrapure (déminéralisée et désionisée). Selon les recommandations de la firme GIBCO, du $NaHCO_3$ (Merck 6329, PM 84,01) est ajouté à raison de 2,2 g/l de milieu. Le pH est vérifié et porté si nécessaire à 7,2 par ajout de HCl 1N ou de NaOH 1 N.

Le milieu est ensuite filtré grâce à une pompe péristaltique simple (Millipore, N° XX80 202 30) équipée de filtres millipores (type HA de 0,45 et 0,22 mm) et récolté dans des bouteilles préalablement autoclavées. On ajoute de la gentamycine (50 ng/ml, Gibco, N° 043-05750D) à raison de 1 ml/l de milieu.

b) Dissection des follicules avant la mise en culture

Les follicules de diamètre compris entre 4 et 7 mm sont obtenus en disséquant soigneusement les ovaires à l'aide de matériel de microdissection tout en étant maintenus à température suffisamment basse pour les préserver de toutes dégradations.

Grâce à cette technique, la séparation des follicules du stroma ovarien se réalise sans trop de difficultés. Nous avons cependant observé à plusieurs reprises des plages de pycnoses localisées au niveau de la granulosa qui témoignent sans doute d'une blessure des follicules au cours de la dissection.

c) Description du système de culture

La technique de culture choisie est la périfusion (fig.18). Elle présente, selon la littérature, plusieurs avantages qui permettent de se rapprocher le plus possible des conditions physiologiques à savoir :

- le milieu est continuellement renouvelé et il n'y a donc pas d'accumulation de métabolites;
- l'étude des sécrétions peut être faite selon un mode cinétique;
- les stimulations hormonales ou autres peuvent être réalisées de façon continue ou pulsatile.

La survie des follicules est réalisée dans de petites chambres périfusées par du milieu spécifique (M199) et maintenues à 37°C dans un bain thermostatisé.

Le fond d'un bassin destiné à contenir l'eau thermostatisée est percé de trous dans lesquels s'adaptent des bouchons de caoutchouc. Des seringues à usage unique de 5 ml sont plantées dans ces bouchons par des aiguilles qui les traversent de part en part. Ces seringues servent de chambres de culture. Elles sont tapissées dans le fond par un filtre qui sert de support aux follicules et fermées hermétiquement par un bouchon de caoutchouc percé d'une aiguille par où le milieu est injecté.

L'hermétisme du système permet une périfusion dans un niveau constant de milieu de culture (environ 0,5 ml). La thermostatisation et l'homogénéisation du bain-marie sont assurées par une pompe thermostatique "Thermomix 1441".

La périfusion du milieu de culture est réalisée grâce à une pompe péristaltique "Watson-Marlow 501" qui produit un débit approximatif de 0,1 ml par minute dans chaque chambre par des tubes en Tygon. Ces tubes plongent dans le bain-marie pour réchauffer le milieu avant qu'il ne soit injecté goutte-à-goutte dans les chambres.

Le milieu est oxygéné par barbotage d'un mélange gazeux d'O_2 (95%) + CO_2 (5%), qui permet également de maintenir le pH du milieu à 7,4. Le milieu périfusé est recueilli par fractions dans des tubes dressés dans des portoirs sous les chambres.

d) Réalisation des cultures

Les cultures *in vitro* des follicules ovariens se sont déroulées de la façon suivante et ce pour chaque expérience :

- h 0.00 : mise en culture des follicules;
- h 0.30 - h 6.00 : récolte du milieu de culture perifusé toutes les 30 minutes en vue d'étudier le potentiel stéroïdogénique des follicules;
- h 1.30 - h 2.00 : stimulation des follicules par la LH;
- h 2.00 - h 3.00 : stimulation des follicules par la FSH.

Lors des stimulations hormonales nous ajoutons au milieu de culture de la LH (NIADDK-oLH-I-3) ou de la FSH (NIAMDD-oFSH-RP1) fournies par le NIH (National Institute of Hormonology, USA) à la concentration voulue, c'est-à-dire 10 ng/ml pour la LH et 15 ng/ml pour la FSH.

Le milieu périfusé s'écoule régulièrement et est recueilli par fractions à intervalle de temps déterminé (30 minutes). Les prélèvements, d'un volume de 3 ml sont ensuite stockés à -20°C en vue du dosage ultérieur des stéroïdes (P_4, Δ_4 et E_2) émis dans le milieu de culture.

3.3.4. Dosage des hormones sanguines

3.3.4.1. Principe du dosage radioimmunologique

La détermination des concentrations plasmatiques des différentes hormones étudiées (LH, FSH, P_4 et E_2) ainsi que celle des concentrations hormonales dans le milieu périfusé (P_4, Δ_4 et E_2) sont réalisées par le dosage radioimmunologique (RIA) selon les techniques décrites par Bister (1980).

Le principe du dosage RIA est basé sur la compétition entre une quantité connue d'hormone radioactive (H^*) et une quantité variable d'hormone froide se trouvant dans l'échantillon à analyser, vis-à-vis d'un antisérum (As) qui leur est spécifique.

L'hormone froide (H^o) peut se lier avec l'antisérum spécifique et la réaction peut s'écrire de la manière suivante:

$$H^o + As \text{ -----> } (H^o - As) + H^o$$

En ajoutant à ce système de l'hormone marquée (H^*), on obtient une nouvelle équation qui est:

$$(H^o - As) + H^* \text{ -----> } H^o + H^* + (H^o - As) + (H^* - As)$$

La quantité d'hormone marquée liée à l'antisérum spécifique est d'autant plus faible que la quantité d'hormone froide de l'échantillon est élevée. En séparant l'H^* liée à l'antisérum de l'H^* libre, on peut par mesure de la radioactivité de l'une des fractions, calculer la quantité d'H^o.

Une courbe standard réalisée simultanément dans les mêmes conditions avec des quantités connues d'hormone froide sert de référence.

Calcul des résultats

Selon le modèle mathématique couramment appliqué aux dosages RIA, la radioactivité de la fraction liée peut être déterminée par l'équation:

$$A = A_o \frac{Cm}{Cm + Cf} + BG$$

A : radioactivité de la fraction liée (en cpm) pour une certaine concentration d'hormone froide;
A_o : radioactivité maximale (en cpm) de la fraction liée;
BG : radioactivité non spécifique (Back Ground), en l'absence d'As;
Cm : concentration en hormone marquée;
Cf : concentration en hormone froide.

Cette équation est ajustée aux données expérimentales de la courbe standard et les valeurs mesurées (en cpm), sont transformées en concentrations hormonales.

3.3.4.2. Dosage de la LH

Les gonadotropines peuvent être dosées par RIA : on réalise un dosage homologue où la compétition vis-à-vis de l'antisérum se fait entre LH froide et LH marquée à l'I^{125} toutes deux d'origine ovine.

a) Les réactifs

La LH ovine purifiée (NIADDK-oLH-I-3) et l'antisérum spécifique (NIADDK-anti-oLH-1) nous sont aimablement fournis par le National Institute of Health (NIH).

La courbe standard est réalisée en en utilisant la LH purifiée à des concentrations croissantes de 0; 1,6; 2; 4; 6; 12,5; 25; 50; 75; 100 ng/ml. Les dilutions sont réalisées dans un tampon phosphate 0,06 M de pH 7,5 appelé tampon Wide. Ce tampon est préparé au départ d'une solution stock 0,6M elle même préparée à partir de 7,5 g de KH_2PO_4 (PM = 136,09) et 77,9g de NaH_2PO_4 (PM = 141,96) par litre d'eau distillée.

Le traceur radioactif est obtenu de la façon suivante. Toute l'opération se passe dans la fiole conique dans laquelle l'iode 125 a été expédiée. On tampone l'I^{125} avec 25µl de tampon Wide et on ajoute ensuite 40 µl de LH (4 µg). La réaction est initiée par

l'adjonction de 20 µl de chloramine T et arrêtée après 30 secondes par l'adjonction de 25 µl de disulfite de sodium. Le contenu de la fiole est ensuite prélevé et chromatographié sur une colonne de 15 cm de haut et 1 cm de diamètre remplie de Séphadex G50 médium tamponé au phosphate 0,06 M, PH 7,55 + 9 g NaCl/litre et préalablement saturé par 2 ml d'albumine bovine, fraction V, Sigma, à 2%. Des fractions d'un millilitre sont recueillies et leur radioactivité est mesurée de façon à repérer le pic de radioactivité correspondant à l'activité de l'hormone marquée. Ces tubes sont ensuite portés à une dilution finale de 20.000 cpm/50 µl.

L'antisérum est dilué dans du tampon Wide selon les conseils du NIH de manière à obtenir une dilution finale de 1/1.500.000 dans les tubes.

La séparation de la phase liée et de la phase libre est réalisée par la méthode du double anticorps. Il s'agit de la précipitation du complexe hormone-anticorps par liaison d'un immunosorbant. Dans notre cas, il s'agit d'une solution d'ARGG (Anti-Rabbit Gamma Globuline) fournie par le Laboratoire d'Hormonologie de Marloie. Le plasma du mouton immunisé est dilué à raison de 1 ml pour 25 ml de tampon Egg-White (Ce tampon est préparé par adjonction de 5 g d'albumine d'oeuf par litre de tampon Wide. On ajoute ensuite 2 g d'azide de Na par litre pour empêcher la prolifération bactérienne).

b) Manipulation

Le dosage se réalise dans des tubes en cristal de polystyrène d'une contenance de 3 ml. Cinquante µl d'hormone froide de concentration connue pour l'établissement de la courbe standard ou 50 µl de plasma pour les échantillons à analyser sont déposés dans les tubes. Cinquante µl d'antisérum y sont introduits, le mélange est ensuite homogénisé au vortex. La réaction antigène-anticorps s'équilibre durant un premier temps d'incubation fixé à 4 heures. Cette incubation, comme les suivantes, se fait à température ambiante. Cinquante µl d'hormone marquée sont ensuite ajoutés dans chaque tube. Une nouvelle homogénisation au vortex est réalisée. Une nuit d'incubation permet au nouvel équilibre de s'établir. L'hormone marquée entre en compétition avec l'hormone froide préalablement fixée sur les anticorps. Finalement, 250 µl d'immunosorbant sont additionnés et le tout est incubé pendant 4 h. La séparation de la fraction liée et de la fraction libre est possible par centrifugation pendant 15 minutes à 3000 rpm. Le surnageant est éliminé au moyen d'une pompe à vide reliée à une pipette pasteur. De plus, chaque dosage est accompagné d'une estimation de l'activité résiduelle due à la fixation spécifique de la LH* sur l'ARGG (Back Ground : BG). Cette analyse est réalisée comme celles des échantillons mais le

plasma et l'antisérum sont remplacés par du tampon. Nous ajoutons aussi au comptage un tube ne contenant que 50 µl d'H* de façon à mesurer l'activité totale (Total Count : TC).

La mesure de la radioactivité est effectuée par un analyseur gamma à passeur d'échantillons (1277 Gammamaster commercialisé par LKB Wallac). Le comptage des échantillons est programmé d'après les rayonnements qu'ils émettent dans les fenêtres d'énergie 24 à 33 du spectre d'émission obtenu avec l'I^{125}. Nous obtenons ainsi un rendement assez élevé (50%) tout en éliminant au maximum les émissions parasites. Le temps de comptage est fixé à 1 minute, ce qui, en fonction du nombre de coups enregistrés par minute (cpm), donne une précision de comptage suffisante (erreur < 5%). Les résultats s'inscrivent sur une imprimante Citizen 120 D et sont stockées sur microordinateur Mac Classic.

La sensibilité du dosage est de 0,07 ng/ml. Les coefficients de variation sont respectivement 7,5% et de 10,5% pour la sensibilité intra et interdosage.

3.3.4.3. Dosage de la FSH

a) Les réactifs

La FSH ovine purifiée (NIAMDD-oFSH-RP1) et l'antisérum spécifique (NIAMDD-anti-oFSH1) nous sont aimablement fournis par le NIH.

La courbe standard est réalisée en utilisant l'oFSH à des concentrations croissantes de 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 10; 20; 40 et 50 ng/ml. Les dilutions sont faites dans du tampon Wide.

L'antisérum FSH est diluée selon les conseils du NIH de manière à obtenir une dilution finale de 1/80.000 dans les tubes.

Pour l'obtention de la FSH marquée, l'oFSH, diluée à raison de 4 µg/40µl, est employée pour le marquage à l'I^{125} par oxydation à la chloramine T. La méthode de marquage est la même que celle décrite pour la LH. L'hormone marquée est portée à une dilution finale de 20.000 cpm/50 µl.

Le dosage et le comptage sont réalisés selon les mêmes procédures que ceux de la LH. La sensibilité du dosage est de 0,08 ng/ml. Les coefficients de variation sont respectivemnt de 5,5% et 10,5% pour la sensibilité intra et interdosage.

3.3.4.4. Dosage de la Progestérone

Les concentrations en stéroïdes dans le plasma et dans le milieu de perifusion sont déterminées par un dosage RIA où la compétition vis-à-vis de l'antisérum se fait entre hormone froide et hormone marquée au H^3.

a) Les réactifs

La progestérone plasmatique est extraite par de l'hexane (Merck 4367) avec un coefficient d'extraction compris entre 90 et 100%

Les standards utilisés ont été préparés par pesée précise et dilution de progestérone cristalline (MERCK 24614). La courbe standard est réalisée à partir de 100 ml de solutions contenant 0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 et 10 ng de P_4/ml.

L'antisérum (As) provient du Laboratoire d'Hormonologie de Marloie. Il a été obtenu par immunisation de lapins contre de la P4-3CMO-BSA. L'As lyophilisé est reconstitué par 10 ml d'eau distillée.

La progestérone tritiée [1,2,6,7-H^3] P_4 (AMERSHAM TRK-413) a une activité spécifique de 80 Ci/mmole (2,96 TBq/mmol) et une concentration initiale de 1 mCi/ml toluène. L'hormone marquée est portée à une dilution finale de 7000 CPM/100 µl dans du tampon Wide.

b) Manipulation

Le mode opératoire du dosage de la P4 peut se résumer de la façon suivante :

1. Extraction

- Extraire la P_4 contenue dans 200 µl de plasma, de milieu de perfusion ou de standard par 2 ml d'Hexane P.A., puis agitation pendant 2 minutes au vortex.
- Laisser reposer afin ques les deux phases soient bien séparées.
- Prélever de 1 ml de surnageant.
- Evaporer à sec dans une étuve sous vide à 40°C.

2. Fixation Ag-Ac

- Après évaporation, addition de
  - 50 µl de tampon Wide.

- 100 µl de P_4 tritiée.
- 50 µl d'AsP_4.

- Vortexer et incuber une nuit à 4°C.

3. Séparation

- Addition de 500 µl de Dextran-Charcoal (650 mg de Charcoal Norit A Serva et 65 mg de Dextran T70 Pharmacia, dans 300 ml de tampon Wide) à 4°C.
- Agitation et incubation pendant 10 minutes à 4°C.
- Centrifugation pendant 10 minutes à 0°C et à 2800 rpm.

4. Comptage

- Prélèvement de 250 µl de surnageant (phase liée) et addition de 2,5 ml d'Ecoscint A (liquide scintillant produit par la firme National Diagnostics).
- Agiter et compter 3 minutes au compteur ß (Beckman LS 1801) .

La sensibilité du dosage est de 0,03 ng/ml. Les coefficients de variation sont respectivement de 5% et 8,5% pour la sensibilité intra et interdosage.

3.3.4.5. Dosage de l'oestradiol

a) Les réactifs

L'oestradiol plasmatique ainsi que celui contenu dans le milieu de culture est extrait par du diéthyl éther P.A. (MERCK 921) avec un coefficient d'extraction compris entre 90 et 100%.

L'oestradiol radioactif est tritié (2-4-6-7 H^3 E_2; Amersham TRK-S22) d'activité spécifique de 101,3 Ci/mmole (3,75 TBq/mmole) et de concentration radioactive de 1 mCi/ml de toluène. L'hormone marquée est portée à une dilution finale de 7000cpm/100µl.

L'antisérum (AS) provient du Laboratoire d'Hormologie de Marloie. Il a été obtenu par immunisation de lapins contre l'$E_{17ß}$ couplé à l'albumine sérique bovine ($E_{17ß}$-6CMO-BSA). L'As lyophilisé est reconstitué par 10 ml d'eau distillée.

Les standards utilisés ont été préparés par pesée précise et dilution d'oestradiol cristalline (MERCK 24614). La courbe standard est réalisée à partir de 100 µl de solutions contenant 0; 2,5; 5; 10; 20; 50; 100; 200; 500; 1000; 2000; 3000 pg/ml de E_2.

b) Manipulation

Le mode opératoire du dosage de l'E_2 peut être résumé de la façon suivante :

1. Extraction

- Extraction de l'E_2 contenue dans 200 µl de plasma, de milieu de perfusion ou de standard par 2 ml de diéthyl ether P.A., puis agitation pendant deux minutes au vortex.
- Congélation à -20°C pendant minimum 2 heures.
- Récupération de la totalité de la phase liquide.
- Evaporation à sec dans une étuve sous vide à 40°C.

2. Fixation Ag-Ac

- Après évaporation, addition de
  - 50 µl de tampon Wide.
  - 100 µl de E_2 tritiée.
  - 50 µl d'As E_2.
- Vortexer et incuber une nuit à 4°C.

3. Séparation

- Addition de 500 µl de Dextran-Charcoal à 4°C.
- Agitation et incubation pendant 10 minutes à 4°C.
- Centrifugation pendant 10 minutes à 0°C et à 2800 rpm.

4. Comptage

- Prélèvement de 250 µl de surnageant (phase liée) et addition de 2,5 ml d'Ecoscint A.
- Agiter et Compter 3 minutes au compteur ß.

La sensibilité du dosage est de 0,56 10^{-3} ng/ml. Les coefficients de variation sont respectivement de 8% et 11% pour la sensibilité intra et interdosage.

3.3.4.6. Dosage de l'androstènedione

a) Les réactifs

L'androstènedione est extraite par de l'hexane (Merck 4367) avec un coefficient d'extraction compris entre 90 et 100%

Les standards utilisés ont été préparés par pesée précise et dilution d'androstènedione cristalline (MERCK 24603). La courbe standard est réalisée à partir de 100 µl de solutions contenant 0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 et 10 ng de Δ_4/ml.

L'antisérum (As) provient du Laboratoire d'Hormonologie de Marloie. Il a été obtenu par immunisation de lapins contre de la 4 androsten-6ß-al-3,17-dione HMS BSA. L'As lyophilisé est reconstitué par 10 ml d'eau distillée.

L'androstènedione tritiée [1,2,6,7-H^3] $\Delta 4$ (AMERSHAM TRK-454) a une activité spécifique de 80 Ci/mmole (2,96 TBq/mmol) et une concentration initiale de 1 mCi/ml toluène. L'hormone marquée est portée à une dilution finale de 7000 CPM/100 µl dans du tampon Wide.

b) Manipulation

Le dosage de l'androstènedione est réalisé de la même façon que celui de la progestérone. La sensiblité du dosage est de 0,03 ng/ml. Les coefficients de variations sont respectivement de 7,5% et 10,5% pour la sensibilité intra et interdosage.

4. ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats obtenus au cours des cultures *in vitro* ont été traités selon le modèle de l'analyse de la variance à 4 critères de classification (anova 4). Les critères utilisés sont la saison (fixe), les brebis (aléatoire et hiérarchisé à saison), les follicules (aléatoire et hiérarchisé à brebis) et les prélèvements (fixe).

L'existence de différences significatives entre les moyennes a été vérifiée par le test de Scheffé.

Mise au point de la méthode de quantification

1. INTRODUCTION ET OBJECTIFS POURSUIVIS

Rappelons que le but de notre travail est de quantifier les récepteurs à la LH et à la FSH présents sur les cellules de la granulosa des follicules ovariens de brebis.

La technique de quantification des récepteurs aux gonadotropines n'avait jamais été utilisée au laboratoire. Dans un premier temps il s'agissait donc de la mettre au point. Pour ce faire, nous nous sommes inspirés des travaux de Bramley *et al.* (1987) qui ont décrit la mise au point de techniques radioimmunologiques pour la quantification des récepteurs à la FSH, à la PRL et à l'hCG sur des cellules de la granulosa de porc.

Pour les récepteurs à la FSH, la technique mise au point par Bramley *et al.* (1987) peut être résumée de la façon suivante :

- compter et diluer les cellules de façon à obtenir 10^6 cellules / 200 µl de tampon PBS (Phosphate Buffer Saline);
- incuber les cellules avec 200 µl de FSH radioactive à une concentration de 200.000 cpm / 200 µl pendant 24 heures à 37°C;
- séparer l'hormone libre de celle liée aux récepteurs présents sur les cellules de la granulosa grâce à l'adjonction de 800 µl de Polyéthylène Glycol (PEG) suivie d'une centrifugation à 1000 g pendant 10 minutes;
- aspirer le surnageant qui contient l'hormone libre grâce à une pompe à vide et passer le culot cellulaire au compteur gamma.

De cette façon on obtient la quantité totale d'hormone liée aux récepteurs. Il faut cependant faire la distinction entre quantité totale d'hormone liée, liaison spécifique et liaison non spécifique. **La liaison totale** est la quantité totale d'hormone marquée récupérée dans le culot après aspiration du surnageant. **La liaison spécifique** est définie comme étant la quantité d'hormone marquée fixée sur les récepteurs qui lui sont propres. **La liaison non spécifique** est la quantité d'hormone marquée fixée soit sur les parois du tube soit sur d'autres récepteurs. La liaison spécifique est donc égale à la liaison totale moins la liaison non spécifique.

La liaison non spécifique sur les parois du tube doit être calculée au début de chaque expérience. La liaison non spécifique due à la fixation de l'hormone marquée sur autre chose que sur les récepteurs qui lui sont spécifiques peut être calculée en

mesurant la quantité d'hormone marquée non déplaçable lorsqu'on ajoute une quantité très importante d'hormone froide.

Avant d'utiliser cette technique, il convenait de vérifier si les conditions sélectionnées par Bramley *et al.* (1987) étaient optimales pour la quantification des récepteurs à la FSH dans nos conditions expérimentales et pouvaient être appliquées à la quantification des récepteurs à la LH. Pour ce faire nous avons réalisé différents essais dont les buts étaient de déterminer :

- l'activité spécifique des hormones radioiodées;
- le pourcentage d'hormone marquée liable en présence d'un excès de récepteurs (fraction active);
- la quantité optimale d'hormone marquée à ajouter;
- la méthode optimale de précipitation;
- la spécificité de la liaison;
- la recherche du meilleur temps d'incubation et de la température d'incubation optimale.

Les différents essais ont été réalisés en parallèle pour les récepteurs à la LH et ceux à la FSH.

Les cellules que nous avons utilisées pour ces différents essais ont été récoltées, comptées et diluées à partir d'ovaires prélevés à l'abattoir d'Anderlecht (point 2 du "Matériel et méthodes").

2. MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DE QUANTIFICATION DES RÉCEPTEURS À LA LH ET À LA FSH

2.1. Evaluation de l'iodination des hormones

2.1.1.Recherche de l'activité spécifique

La technique d'iodination de la LH et de la FSH est identique à celle décrite dans la partie "matériel et méthodes" pour les dosages radioimmunologiques des concentrations en LH et FSH dans le plasma. Les hormones destinées à être marquées à l'iode^{125} sont la NIAMDD-ovine-LH I-1 et la NIAMDD-ovine FSH-I-1 fournies par le "National Institute of Health".

Après marquage, il convient de vérifier l'activité spécifique de l'hormone; celle-ci est définie comme étant la radioactivité obtenue par unité de masse d'un composé contenant un atome radioactif.

Le marquage est effectué par oxydation, grâce à la chloramine T, d'un groupement Thyrosine d'une protéine de LH ou de FSH ce qui permet la fixation de l'I^{125} sur ce groupement. Quatre microgrammes d'hormone sont marqués à l'aide de 1 ml d'I^{125} (37,0 MBq). L'élution sur colonne de Séphadex permet de séparer la partie d'I^{125} fixée sur la protéine (LH ou FSH) de l'autre partie d'I^{125} qui s'est fixée sur d'autres petites protéines provenant pour la plupart du temps de la dénaturation de l'hormone que l'on désire marquée.

Environ 50% de la radioactivité placée sur la colonne de chromatographie se retrouve dans la partie protéique recueillie : ± 18 MBq pour 4 µg soit 4,5 MBq/µg (4,5 Kbq/ng).

Pour obtenir l'activité spécifique de l'hormone marquée on procède donc de la façon suivante : on divise les 4 µg d'hormone marquée par le volume d'élution, on mesure ensuite la radioactivité (en CPM) correspondant à 100 µl du tampon d'élution et on transforme la valeur obtenue en Mcurie/pg.

Les activités spécifiques obtenues sont, suivant les marquages, comprises entre 50 à 100 cpm/pg quel que soit le marquage. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Ireland et Roche (1982).

2.1.2. Recherche du pourcentage d'hormone liable en présence d'un excès de récepteurs (fraction active)

2.1.2.1. Mode opératoire

Pour déterminer la fraction active de l'hormone marquée, c'est-à-dire la quantité maximale d'hormone que l'on peut espérer voir se lier aux récepteurs propres à cette hormone, nous avons fait incuber 200 µl d'H* (200.000 cpm) pendant 24 h à 37°C avec des suspensions cellulaires contenant un nombre de cellules de plus en plus élevé (allant de 10^4 à 10^{10} cellules pour 200 µl).

2.1.2.2. Résultats et discussion

Les figures 19 et 20 présentent les quantités de **FSH** et de **LH** marquées liées aux récepteurs pour des quantités de cellules croissantes allant de 10^4 à 10^{10} cellules.

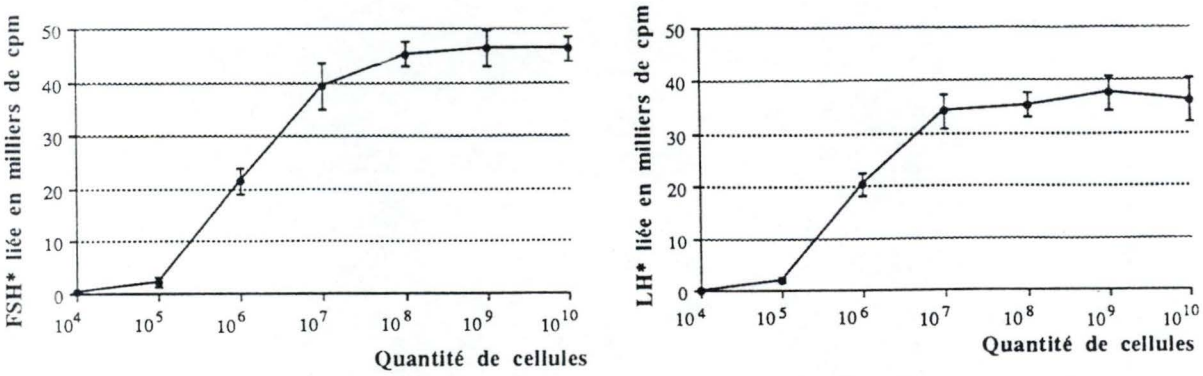


Figure 19 et 20 : Quantités de FSH et de LH marquées liées aux récepteurs pour des quantités croissantes de cellules (moyenne ± écarts-types, n = 5).

Pour la FSH, la fixation maximale est de 46.000 cpm ce qui donne une fraction active de 23%. En ce qui concerne la LH, on observe une fixation maximum de 36.000 cpm correspondant à 18% de la quantité d'hormone radioiodée de départ (200.000 cpm).

Ces valeurs sont inférieures à celles obtenues par Ireland et Roche (1982) qui observent des fractions actives comprises entre 30 et 50% pour la FSH et hCG.

2.1.3. Quantification des liaisons non spécifiques de l'hormone marquée sur les tubes de polystyrène.

On incube 200 µl d'hormone marquée avec 200 µl de tampon P.B.S. pendant 24h à 37°C.

On aspire ensuite le surnageant et on passe le tube au compteur gamma.

Cette expérience répétée à 20 reprises montre qu'au maximum 3000 cpm d'hormone marquée (LH ou FSH) se fixent sur les parois du tube. Ceci correspond à 1,5% de la quantité totale d'hormone marquée ajoutée dans chaque tube au départ.

Ireland et Roche (1987) ont également obtenu une fixation inférieure à 3%, dans tous les cas. Nos valeurs sont donc bonnes et on peut admettre que les changements de fixation reflètent bien des modifications dans la capacité des cellules de granulosa à lier de l'hormone radioactive et pas une fixation non spécifique sur les parois des tubes en polystyrène.

2.1.4. Recherche de la quantité optimale d'hormone marquée à ajouter

2.1.4.1. Mode opératoire

Il s'agit de déterminer si, comme le suggèrent Bramley et al. (1987), 200.000 cpm est bien la quantité optimale d'hormone marquée à ajouter pour obtenir le taux de liaison maximum. Pour ce faire, on incube une quantité fixe de cellules avec des quantités croissantes d'hormone marquée et on mesure la quantité d'hormone liée aux récepteurs à chaque concentration.

Après récolte et ponction des follicules, on réalise un pool avec les cellules de la granulosa et on dilue de façon à obtenir 10^6 cellules /200 µl qui est la concentration maximale en cellules que nous pouvons obtenir par ponction de 4 follicules; c'est-à-dire ce dont nous espèrons disposer lors de la quantification des récepteurs pour les différents états physiologiques considérés.

On incube alors pendant 24 heures à 37°C 200 µl de tampon PBS contenant 10^6 cellules avec 200 µl d'hormone marquée aux concentrations suivantes :

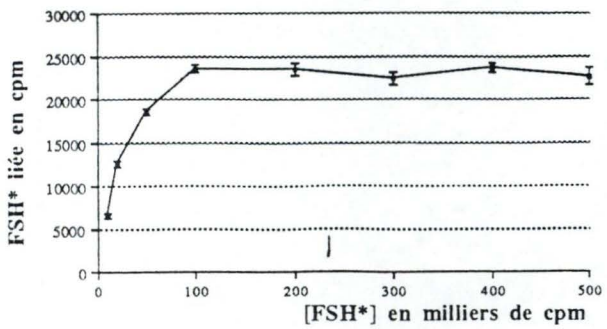
1) 10.000 cpm
2) 20.000 cpm
3) 50.000 cpm
4) 100.000 cpm
5) 200.000 cpm
6) 300.000 cpm
7) 400.000 cpm
8) 500.000 cpm

Après adjonction de 800 µl de PEG et centrifugation, on mesure la quantité d'hormone marquée fixée aux récepteurs par passage du culot cellulaire au compteur gamma.

Pour chaque concentration en hormone radioactive nous avons réalisé 4 réplicats.

2.1.4.2. Résultats et discussion

Les figures 21 et 22 présentent les quantités de **FSH** et de **LH** marquées liées aux récepteurs en fonction des quantités de **FSH** et de **LH** marquées ajoutées.



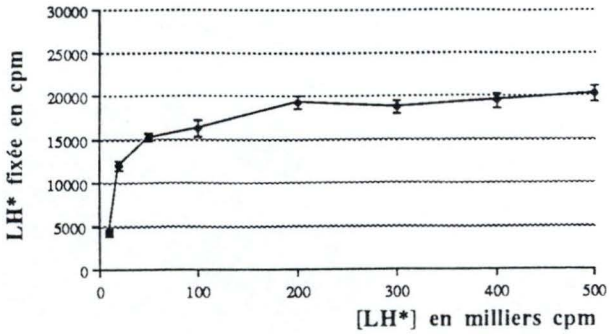


Figure 21 et 22 : Quantités de FSH et de LH marquées liées aux récepteurs en fonction des quantités de FSH et de LH marquées ajoutées.

La quantité maximale de FSH marquée fixée sur les récepteurs est de 23.000 cpm. Cette valeur maximale est obtenue à partir de 100.000 cpm

La quantité de LH marquée fixée aux cellules augmente progressivement en fonction de la quantité de LH marquée ajoutée au départ, et ce jusque 200.000 cpm. La quantité maximum d'hormone fixée aux récepteurs est de 20.000 cpm.

Les graphiques montrent donc qu'à partir d'une concentration de 100.000 cpm pour la FSH et de 200.000 cpm pour la LH, on a apparition de plateaux sur les graphes; ceux-ci signifient qu'il y a saturation des récepteurs par l'hormone marquée. Bien que la saturation semble se réaliser à des concentrations plus faibles d'hormone radioiodée pour les récepteurs à FSH que pour ceux à la LH, nous utiliserons, pour des raisons pratiques, les deux hormones à une même concentration de 200.000 cpm.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Bramley et al. (1987) pour la quantification des récepteurs à l'hCG et à la FSH.

Ireland et Roche (1982) utilisent 300.000 cpm de FSH marquée tandis que Labarbera et Ryan (1981) ajoutent 250.000 cpm de FSH marquée à leur suspension cellulaire.

2.1.5. Recherche de la meilleure méthode de précipitation

2.1.5.1. Mode opératoire

Après avoir laissé incuber les cellules avec l'hormone marquée, il faut séparer l'hormone fixée aux récepteurs de l'hormone restée libre dans le surnageant. Pour ce

faire, on fait précipiter les cellules et on aspire le surnageant de manière à éliminer toutes les molécules d'hormone non-liées.

Plusieurs méthodes de séparation sont utilisées dans la littérature :

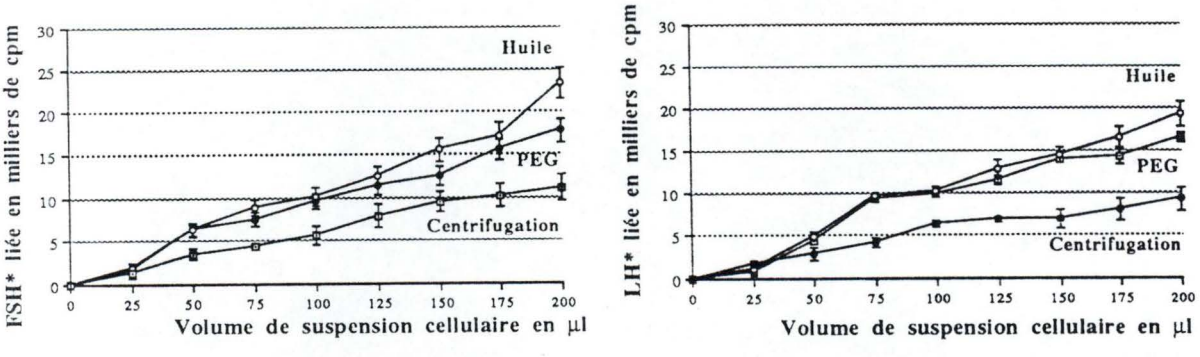
- la centrifugation à 2500 g pendant 10 minutes (Bramley *et al.*, 1987),
- la centrifugation avec séparation des phases cellulaire et liquide avec du PEG (Polyéthylène Glycol) (Bramley *et al.*, 1987),
- une séparation des deux phases par un mélange d'huile d'olive et de DBPHT (dibutylphtalate) suivie d'une centrifugation à 1000 g pendant 10 minutes (Mager, communication personnelle).

Nous avons testé ces différentes méthodes dans le but d'obtenir le meilleur taux de récupération cellulaire ce qui nous évitera de sous-estimer le nombre de récepteurs. Pour cela, on réalise des pools de cellules qui après comptage ont été dilués de manière à obtenir une concentration de 10^6 cellules pour 200 µl.

- 25 µl -------> 125.000 cellules
- 50 µl -------> 250.000 "
- 75 µl -------> 375.000 "
- 100 µl -------->500.000 "
- 125 µl -------->625.000 "
- 150 µl -------->750.000 "
- 175 µl -------->875.000 "
- 200 µl -------->1.000.000 "

2.1.5.2. Résultats et discussion

Les figures 23 et 24 présentent les quantités de **FSH** et de **LH** marquées (200.000 cpm/ 200 µl) liées aux récepteurs en fonction de la méthode de précipitation et du volume de suspension cellulaire utilisé (en µl).



Figures 23 et 24 : Quantités de FSH et de LH marquées (200.000 cpm/ 200 µl) liées aux récepteurs en fonction de la méthode de précipitation et du volume de suspension cellulaire utilisé (en µl).

Que se soit pour les récepteurs à la LH ou à la FSH, c'est avec l'huile d'olive additionnée de dibutylphtalate et avec le PEG que les niveaux de récupération sont les plus élevés. Par contre, la centrifugation seule donne une valeur beaucoup plus faible et entraîne une sous-estimation de la quantité de récepteurs par élimination d'une plus grande partie de l'hormone liée suite à l'aspiration d'une grande partie des cellules. Ces résultats confirment ceux obtenus par Bramley *et al.*. (1987) qui avaient montré que la précipitation par le PEG est plus efficace qu'une simple centrifugation. Ces mêmes auteurs avaient également testé la filtration sur Millipore; cette technique leur avait donné des résultats identiques à ceux obtenus avec le PEG.

Dans notre cas, nous utiliserons le mélange huile d'olive/ DBPHT puisqu'il semblerait qu'il donne un taux de récupération légèrement supérieur à celui du PEG.

2.1.6. Spécificité de la liaison

2.1.6.1. Mode opératoire

La spécificité de la liaison peut être analysée en mesurant la proportion d'H* liée à son récepteur en présence d'une quantité croissante d'H° analogue ou d'H° pouvant entrer en concurrence. La liaison est spécifique, si elle peut être déplacée par l'hormone froide correspondante et pas par les autres hormones. Ainsi, si la liaison est totalement spécifique, la FSH* sera déplacée de son récepteur par la FSH° et pas par la LH° ni par l'hCG°; de la même manière la LH* sera déplacée par la LH° et pas par la FSH° et l'hCG°.

Pour la FSH nous avons donc mis en présence :

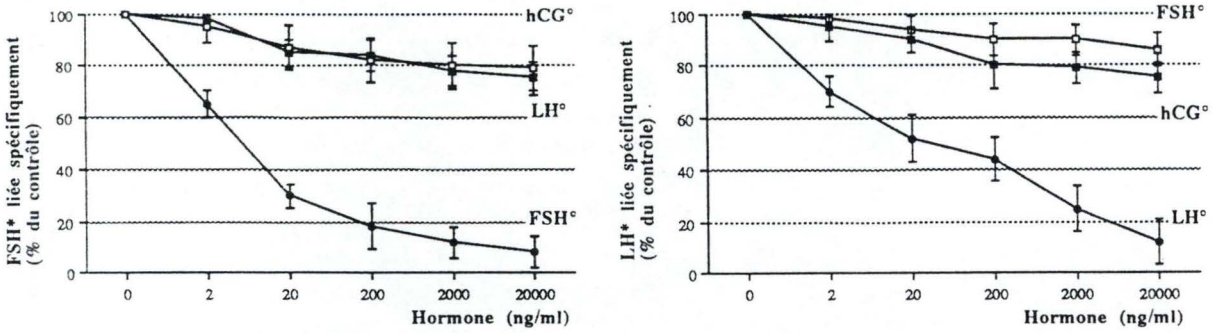
- Une suspension cellulaire contenant 10^6 cellules/ 200 µl.
- 200 µl de FSH* (200.000 cpm /200 µl).
- Une quantité de LH°, de FSH° ou d'hCG° équivalente à :

2 ng, 20 ng, 200 ng, 2000 ng, 20.000 ng.

Nous avons utilisé le même protocole pour étudier la spécificité de liaison de la LH.

2.1.6.2. Résultats et discussion

Les figures 25 et 26 présentent les quantités de **FSH** et de **LH** marquées (en % du contrôle qui est la concentration 0 en hormone froide) liées aux récepteurs en fonction de concentrations croissantes de FSH°, de LH°ou d'hCG°.



Figures 25 et 26 : Quantités de FSH et de LH marquées liées aux récepteurs en fonction de concentrations croissantes de FSH°, de LH°ou encore d'hCG°.

Au départ, nous avons une fixation de 25.000 cpm de FSH*, comme lors des essais précédents. Cette activité, obtenue en présence de FSH* seule est considérée comme le maximum de fixation (100%). La liaison de la FSH* à son récepteur est déplacée par la FSH° et faiblement par la LH° et l'hCG°. La FSH* est déplacée au maximum de 20% par 20.000 ng/ml d'hCG° et de FSH°.

En ce qui concerne la LH on peut observer la même spécificité des récepteurs pour leur propre hormone. Ici, 10 % (20.000 cpm) de la quantité totale de FSH* (200.000 cpm) est liée aux récepteurs lorsqu'il n'y a pas d'hormone froide. De plus, la LH* est plus ou moins déplacée de 20 % par 20.000 ng/ml d'hCG° et de FSH°.

2.1.7. Recherche du meilleur temps d'incubation et de la température d'incubation optimale

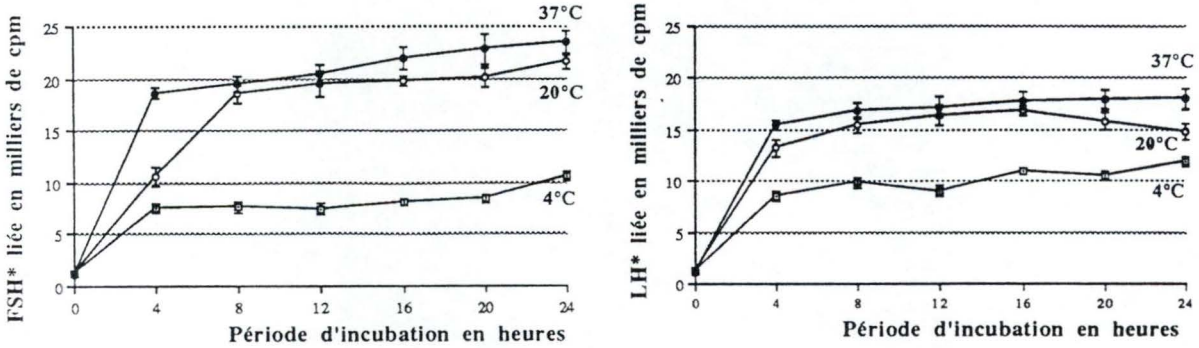
2.1.7.1. Mode opératoire

Le but de cet essais est de mettre en évidence la meilleure durée d'incubation et la température d'incubation idéale pour obtenir la meilleure estimation possible du nombre de récepteurs.

A partir d'un pool de cellules obtenu en ponctionnant les follicules des ovaires récoltés à l'abattoir, nous avons réalisé 36 aliquots contenant 10^6 cellules / 200 µl. Nous avons alors mesuré la quantité d'hormone marquée fixée aux récepteurs pour trois températures (4°C, Ireland et Roche, 1982; 20°C, Labarbera et Ryan, 1981; 37 °C, Bramley et al., 1987) et cela toutes les 4 heures pendant 24 H.

2.1.7.2. Résultats et discussion

Les figures 27 et 28 présentent les quantités de **FSH** et de **LH** marquées fixées aux récepteurs (200.000 cpm/200 µl) en fonction du temps (0 à 24 heures) et de la température d'incubation (4, 20 ou 37°C).



Figures 27 et 28 : Quantités de FSH et de LH marquées (200.000 cpm / 200 µl) fixées en fonction du temps d'incubation (0 à 24 heures) et de la température d'incubation (4, 20 ou 37°C).

Pour les récepteurs à la FSH, comme pour les récepteurs à la LH, la meilleure température d'incubation est de 37C°. Les cellules ayant incubé à une température de 20°C montrent elles aussi une bonne fixation de l'hormone marquée. Une incubation à 4°C est à proscrire puisqu'elle donne des résultats qui semblent sous-estimer la quantité de récepteurs présents à la surface des cellules de la granulosa.

En ce qui concerne le durée d'incubation, on obtient un bon taux de fixation après 4 heures; par la suite ce taux reste stable ou augmente encore légèrement. Pour des raisons de facilité, nous laisserons incuber les suspensions cellulaires pendant 24 heures.

En conclusion, que ce soit pour la LH ou pour la FSH le temps d'incubation sera de 24 heures et la température d'incubation de 37°C .

2.2. Conclusion

Suite aux différents essais que nous avons réalisés et largement en accord avec les procédures décrites par Bramley et al. (1987), les conditions expérimentales que nous avons retenues pour la quantification des récepteurs à la FSH et à la LH sont les suivantes :

- une suspension cellulaire de (ou proche de) 10^6 cellules / 200 µl;
- une concentration en hormone marquée de 200.000 cpm / 200 µl;
- un temps d'incubation de 24 heures;
- une température d'incubation de 37°C;
- une précipitation dans un mélange huile d'olive/DBPHT (20 / 80);

Résultats

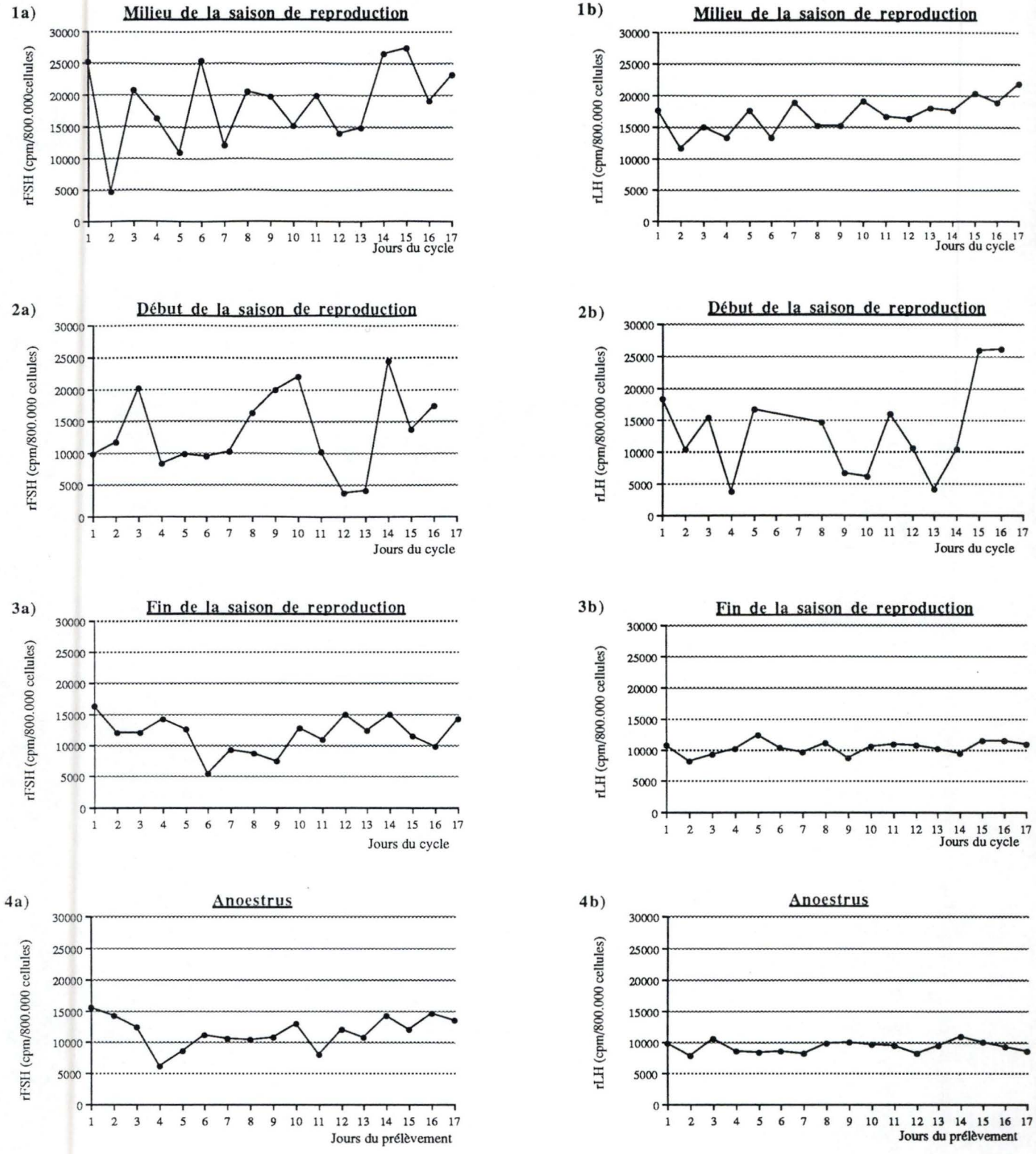


Figure 29 : Quantité de LH (a) et de FSH (b) radioiodées fixées sur les récepteurs des cellules de la granulosa des follicules ovariens de brebis, en fonction du jour de prélèvement et pour des suspension cellulaire contenant 800.000 cellules/200 µl au milieu (1), au début (2) et à la fin (3) de la saison de reproduction et en anoestrus (4).

1. EFFETS DE LA SAISON SUR L'EVOLUTION DU NOMBRE DE RECEPTEURS A LA FSH ET A LA LH PENDANT UNE PERIODE CORRESPONDANT A LA DUREE D'UN CYCLE OESTRAL

Au cours des quatre périodes considérées, parallèlement aux prises de sang quotidiennes, nous avons également ponctionné chaque jour le plus gros follicule présent à la surface des ovaires des 4 brebis. Ceci a été réalisé afin de récolter des cellules de la granulosa en vue d'étudier l'effet de la saison sur l'évolution du nombre de récepteurs aux gonadotropines.

Signalons que le nombre de cellules récoltées en ponctionnant les follicules par endoscopie était largement inférieur à 10^6/200 µl qui est la quantité de cellules utilisée lors de la mise au point de la technique. Pour obtenir un nombre suffisant, nous avons donc dû réaliser chaque fois un pool avec les cellules récoltées sur les quatre brebis endoscopiées. De cette façon, nous avons pu rassembler 800.000 cellules/200 µl de tampon PBS pour chaque jour de prélèvement et cela pour les quatre périodes étudiées; ce qui nous a permis de réaliser une quantification des récepteurs à la FSH et à la LH.

La figure 29 présente les quantités de FSH (a) et de LH (b) radioiodées fixées sur les récepteurs des cellules de la granulosa en fonction du jour de prélèvement par des suspensions contenant 800.000 cellules/200 µl au milieu (1), au début (2), à la fin (3) de la saison de reproduction et en anoestrus (4).

1.1. Le milieu de la saison de reproduction

1.1.1. Les récepteurs à la FSH

La quantité de FSH radioiodée fixée sur les récepteurs présents dans une suspension cellulaire de 800.000 cellules/200µl (fig.29.1a) montre une grande variabilité (de 5.000 à 25.000 cpm) et une tendance à l'augmentation semble apparaître en cours de cycle.

1.1.2. Les récepteurs à la LH

La quantité de LH marquée fixée par une suspension cellulaire contenant 800.000 cellules/200 µl (fig.29.1b) augmente progressivement à partir du jour 2 (12.000 cpm) pour atteindre une valeur maximale de 22.000 cpm au jour 17.

1.2. Le début et la fin de la saison de reproduction

1.2.1. Les récepteurs à la FSH

Au début de la saison de reproduction, le profil de fixation de FSH (fig.29.2a) montre comme au milieu de la saison de reproduction de très grandes variations (les valeurs sont comprises entre 5.000 et 25.000 cpm); mais aucune évolution apparente ne peut être relevée.

A la fin de la saison de reproduction, le profil de fixation de la FSH sur les récepteurs (fig.29.3b) montre moins de fluctuations que durant les deux autres périodes, les quantités de FSH fixées fluctuent entre 12.000 et 15.000 cpm ce qui est inférieur à ce qui est observé au milieu de la saison de reproduction.

1.2.2. Les récepteurs à la LH

Au début de la saison de reproduction, la quantité de LH radioiodée fixée sur les cellules récoltées quotidiennement (fig.29.2b) montre, comme pour la FSH, une grande variabilité (les valeurs sont en effet comprises entre 5.000 et 25.000 cpm).

En fin de saison de reproduction, le profil de fixation de la LH marquée sur les récepteurs (fig. 29.3b) montre peu de variation et reste cantonné à 10.000 cpm ce qui est inférieur à ce qui est observé au milieu de la saison de reproduction.

1.3. L'anoestrus

En anoestrus, les profils de fixation de la FSH et de la LH sur leurs récepteurs (fig.29.4a et 4b) fluctuent très peu autour d'une valeur moyenne de respectivement 10.000 et 12.000 cpm au cours de la période de 17 jours suivant le traitement aux progestagènes. Les profils et les valeurs sont comparables à ceux obtenus en fin de saison de reproduction.

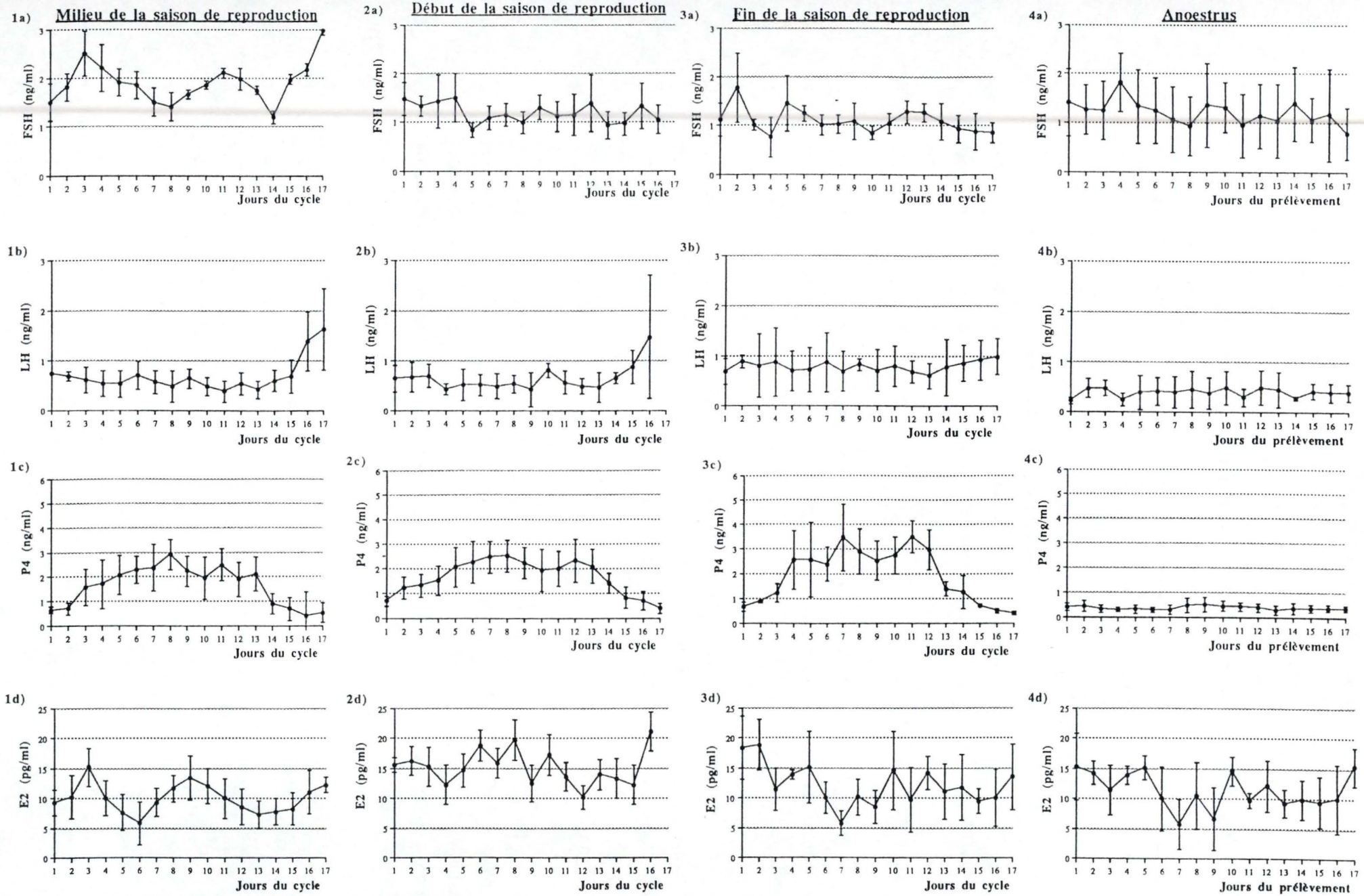


Figure 30 : Profils de sécrétion plasmatiques moyens (moyenne ± écart-type, n = 4) de la FSH (a), de la LH (b), de la progestérone (c) et de l'oestradiol (d) pendant 17 jours au milieu (1), au début (2), à la fin (3) de la saison de reproduction et en anoestrus (4).

2. EFFETS DU MOMENT DE LA SAISON SUR LES PROFILS DE SECRETION DES HORMONES GONADOTROPES (LH ET FSH) ET STEROÏDIENNES (P_4 ET E_2)

Rappelons que chaque hormone considérée, c'est-à-dire la FSH, la LH, la P_4 et l'E_2, a été dosée sur des prélèvements sanguins quotidiens réalisés sur 4 brebis durant 17 jours lors de chacune des 4 périodes étudiées, c'est-à-dire au milieu, au début et à la fin de la saison de reproduction ainsi qu'en anoestrus. Afin que toutes les brebis soient au même stade du cycle au début des prélèvements, elles ont été présynchronisées par une éponge vaginale imprégnée de 40 mg de FGA (Fluorogestone Acétate).

La figure 30 représente les profils de sécrétion plasmatique moyens (moyenne ± écarts-types, n = 4) de la FSH (a), de la LH (b), de la progestérone (c) et de l'oestradiol (d) pendant 17 jours au milieu (1), au début (2), à la fin (3) de la saison de reproduction et en anoestrus (4).

2.1. Le milieu de la saison de reproduction

a) La FSH

Les niveaux plasmatiques de FSH (fig.30.1a) montrent des élévations préférentielles à 3 moments du cycle oestral chez toutes les brebis analysées. La variabilité individuelle est surtout importante dans la première moitié du cycle (Jour 1 au Jour 8). Les 2 premières vagues de FSH ont lieu pendant la phase lutéale (période d'activité du corps jaune, caractérisée par des taux élevés de P_4) et durent 6 à 7 jours chacune. La troisième vague commence pendant la phase folliculaire (Jour 14) et se termine au début du cycle suivant; elle présente un maximum le jour de l'ovulation (Jour 17). Les concentrations moyennes de FSH dans le sang (fig.30.1a) sont comprises entre 1 et 1,5 ng/ml pour les valeurs les plus basses (minima atteints dans le creux des trois vagues de sécrétion) et dépassent 2 ng/ml pour les concentrations les plus élevées (sommets des vagues) pour atteindre un maximum de 3 ng/ml le jour de l'ovulation.

b) La LH

Rappelons que la LH est émise de façon pulsatile avec une demi-vie plasmatique d'environ 20 minutes. Généralement, la LH est dosée sur des prises de sang sériées réalisées toutes les 20 minutes pendant 12 heures. Les profils présentés ici et basés sur une prise de sang quotidienne n'ont donc qu'une valeur indicative.

Au milieu de la saison de reproduction, la LH fluctue autour d'une valeur moyenne de 0,76 ng/ml pendant les 14 premiers jours du cycle (fig.30.1b). A partir du jour 15, les taux s'élèvent légèrement pour atteindre une valeur maximale de 4,30 ng/ml au jour 16. A ce moment du cycle, la variabilité individuelle est très importante. Ceci est dû au fait que pour certaines brebis la prise de sang a été réalisée pendant le pic préovulatoire de LH, alors que pour les autres elle a été faite avant ou après.

c) La progestérone

La concentration moyenne de P_4 dans le sang (fig.30.1c) augmente progressivement le lendemain de l'ovulation (J1) pour atteindre une valeur maximale le jour 8 puis diminue ensuite pour revenir au niveau basal au jour 16 (la veille de l'ovulation). Les concentrations sont de l'ordre de 0,6 ng/ml pendant la période pré-ovulatoire tandis que les taux moyens atteints en phase lutéale sont de 2 ng/ml; la différence est bien sûr hautement significative($P \leq 0,01$).

d) L'oestradiol

Comme celle de la FSH, l'émission des oestrogènes (fig.30.1d) se présente sous forme d'ondes avec 3 maxima de concentration plasmatique au cours du cycle. Les 2 premières vagues ont lieu pendant la phase lutéale et la troisième pendant la phase folliculaire. Les taux d'E_2 fluctuent autour d'une valeur moyenne de 10 pg/ml.

2.2. Le début et la fin de la période de reproduction

a) La FSH

Au début (fig.30.2a) et **à la fin** (fig.30.3a) **de la saison de reproduction**, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'existence de fluctuations régulières dans l'émission de FSH. Les valeurs moyennes obtenues sont comprises entre 1 et 1,5 ng/ml pendant toute la durée du cycle et sont inférieures à celles observées au milieu de la saison de reproduction. Au cours des 2 périodes, nous n'observons pas d'augmentation des taux de FSH le jour de l'ovulation (J17).

b) La LH

Au début de la saison de reproduction (fig.30.2b), la LH fluctue autour d'une valeur moyenne de 0,80 ng/ml. Comme au milieu de la saison, nous observons une augmentation des taux au jour 16 du cycle avec une variabilité individuelle très

importante. **A la fin de la saison de reproduction** (fig.30.3b), la LH fluctue autour d'une valeur moyenne de 0,90 ng/ml pendant l'entièreté du cycle et le pic pré-ovulatoire n'est pas apparent. La variabilité individuelle est très importante pendant toute la durée du cycle comme en témoignent les grands écarts-types.

c) La progestérone

Au début (fig.30.2c) et **à la fin** (fig.30.3c) **de la saison de reproduction**, nous observons des profils de sécrétion de progestérone comparables à ceux obtenus au milieu de la saison.

d) L'oestradiol

Au début de la saison de reproduction (fig.30.2d), les taux plasmatiques d'E_2 fluctuent de façon irrégulière autour d'une valeur moyenne supérieure (15 pg/ml) à celle obtenue au milieu de la saison de reproduction (10 pg/ml). **En fin de la saison de reproduction** (fig.30.3d), les sécrétions plasmatiques d'E_2 fluctuent également de façon irrégulière autour d'une valeur moyenne de 12 pg/ml. Les écarts-types sont très importants.

2.3. L'anoestrus

a) La FSH

Les taux de FSH (fig.30.4a) fluctuent irrégulièrement au cours de la période d'observation et ne montrent pas de vagues de sécrétion comme pendant le milieu de la saison de reproduction. Les taux moyens sont fortement variables d'une brebis à l'autre comme en témoignent les écarts-types importants.

b) La LH

La concentration en LH (fig.30.4b) fluctue autour de 0,5 ng/ml pendant toute la durée des observations; ce qui est inférieur aux taux observés en milieu de saison de reproduction. De plus, comme à la fin de la saison de reproduction, on n'observe pas de pic pré-ovulatoire au jour 16.

c) La progestérone

Nous observons des taux très faibles de P_4 (± 0,6 ng/ml) caractéristiques de l'absence de corps jaune chez toutes les brebis (fig.30.4c).

d) L'oestradiol

Le profil de sécrétion d'E_2 (fig.30.4d) fluctue irrégulièrement autour d'une valeur moyenne de 10 pg/ml, comme au milieu de la saison de reproduction, mais ne montre pas les vagues de sécrétion observées durant cette même période.

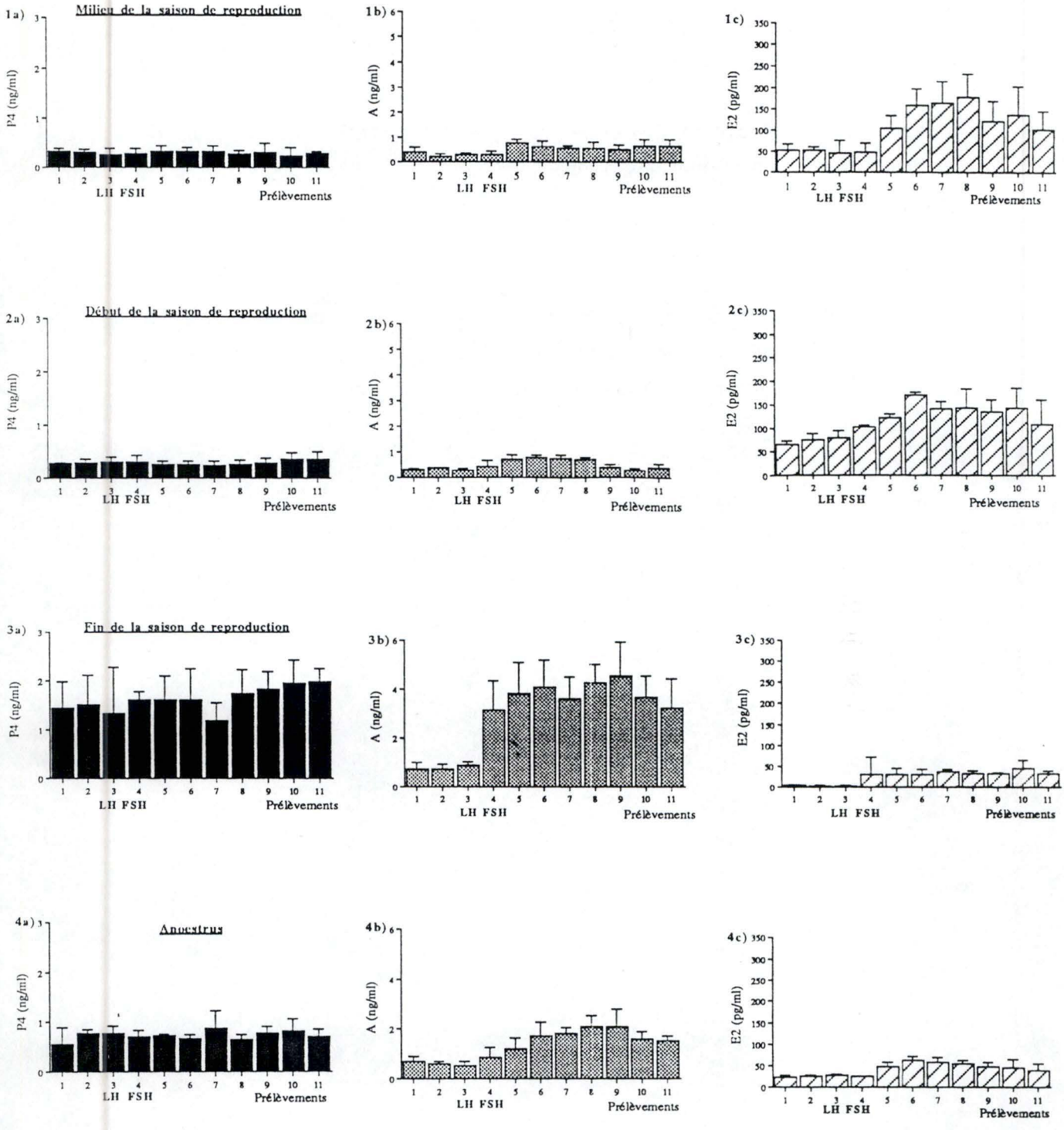


Figure 31 : Profils de sécrétion moyens (moyennes ± écarts-types, n=5) de la progestérone (a), de l'androstènedione (b) et de l'oestradiol (c) en fonction du temps pour des follicules prélevés au jour 16 du cycle suivant le retrait de l'éponge de FGA au milieu (1), au début (2) et à la fin (3) de la saison de reproduction et en anoestrus (4).

3. LA STEROÏDOGENESE DES FOLLICULES PLACES EN CULTURE *IN VITRO*

Les résultats présentés dans ce paragraphe sont communs à ceux décrits dans le mémoire de Botspoel (1993).

L'objectif de cette expérience est d'étudier la stéroïdogenèse et la réactivité de follicules ovariens prélevés sur des brebis se trouvant dans des états physiologiques différents. Nous avons étudié la stéroïdogenèse et la réactivité à une stimulation LH-FSH de follicules provenant de brebis au début, au milieu et à la fin de la saison de reproduction ainsi qu'en anoestrus saisonnier. Au cours de chaque essai, 5 follicules prélevés 18 jours après la synchronisation par une éponge de FGA (c'est-à-dire au jour 16 du cycle durant la saison de reproduction) ont été mis en culture et 11 prélèvements de milieu de perfusion, d'une durée de 30 minutes chacun ont été récoltés et analysés afin d'en déterminer les concentrations en stéroïdes (P_4, Δ_4 et E_2). Les follicules ont été stimulés avec de la o-LH (10 ng/ml) pendant 20 minutes à partir du 3ème prélèvement et avec de la o-FSH (15 ng/ml) pendant une heure à partir du 4ème prélèvement. En milieu de saison de reproduction, la même étude a été réalisée sur des follicules prélevés au jour 9 du cycle (phase lutéale) suivant la synchronisation par une éponge de FGA.

La figure 31 représente les profils moyens de sécrétion (moyennes ± écarts-types, n=5) des 3 stéroïdes (progestérone, androstènedione et oestradiol) en fonction du temps (prélèvements) pour des follicules prélevés 18 jours après le retrait de l'éponge de FGA au milieu, au début et à la fin de la saison de reproduction (c'est-à-dire en phase folliculaire en saison de reproduction) ainsi qu'en anoestrus.

La figure 32 représente les profils moyens de sécrétion (moyennes ± écarts-types, n=5) des 3 stéroïdes (progestérone, androstènedione et oestradiol) en fonction du temps (prélèvements) pour des follicules prélevés au jour 9 (phase lutéale) et au jour 16 (phase folliculaire) du cycle au milieu de la saison de reproduction.

3.1. Le milieu de la saison de reproduction

3.1.1. Phase folliculaire

En phase folliculaire, l'observation des taux de progestérone (fig. 31.1a) indique que les sécrétions des follicules fluctuent autour d'une valeur moyenne de 0,30 ng/ml. Nous n'observons aucune réponse à la stimulation LH-FSH.

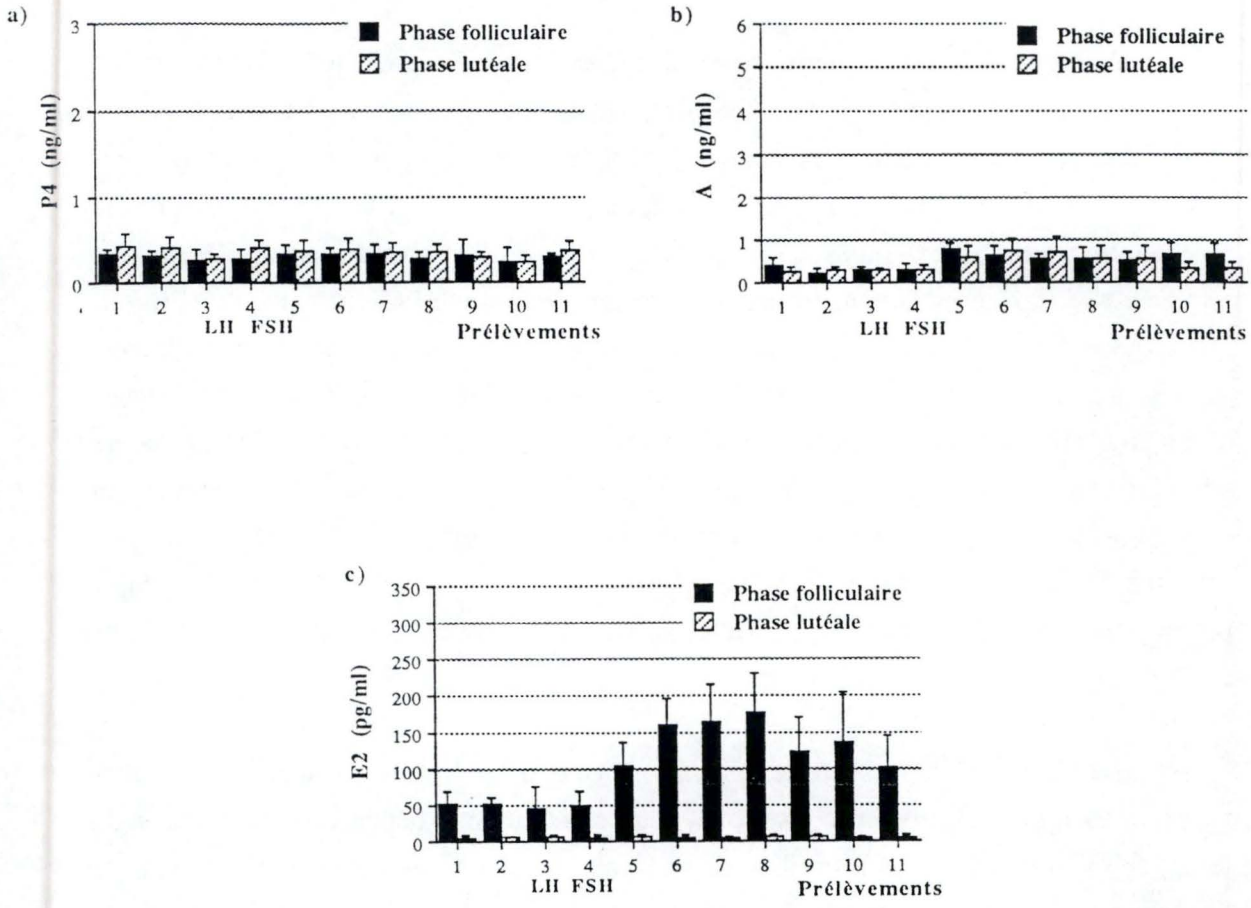


Figure 32 : Profils de sécrétion moyens (moyennes ± écarts- types, n=5) des 3 stéroïdes (progestérone, androstènedione et oestradiol) en fonction du temps (prélèvements) pour des follicules prélevés au jour 9 (phase lutéale) et au jour 16 (phase folliculaire) du milieu de la saison de reproduction.

Avant la stimulation, les taux d'androstènedione (fig.31.1b) sont de l'ordre de 0,40 ng/ml. Ils augmentent progressivement à partir du 5ème prélèvement, soit 60 minutes après la double stimulation, pour atteindre une valeur maximale de 0,90 ng/ml. Ils se maintiennent significativement plus élevés jusqu'à la fin de la culture.

Les niveaux moyens d'oestradiol (fig.31.1c) sont de 50 pg/ml avant les stimulations. Les follicules répondent à l'apport de LH et de FSH par une augmentation des taux d'E_2 qui passent à un maximum de 180 pg/ml au prélèvement 8. Cette hausse est significative ($P < 0,05$) du 5ème au 11ème prélèvements.

La phase folliculaire du milieu de la saison de reproduction est donc caractérisée par des niveaux de P_4 peu variables et par une augmentation significative des taux de Δ_4 et de E_2 après la stimulation LH-FSH.

Dans la suite de la présentation, nous comparerons chaque fois les résultats obtenus à ceux de la phase folliculaire du milieu de la saison de reproduction qui est la période la plus couramment étudiée et qui peut donc servir de référence.

3.1.2. Phase lutéale

L'observation des taux de progestérone (fig.32.a), obtenus en phase lutéale du cycle, indique que les sécrétions des follicules fluctuent autour d'une valeur moyenne de 0,29 ng/ml. Il n'y a donc pas de différence significative avec les taux de progestérone observés en phase folliculaire.

Les taux d'androstènedione (fig.32.b) sont de l'ordre de 0,30 ng/ml avant les stimulations hormonales. Ensuite, à partir du 5ème prélèvement, il se produit une augmentation significative ($p < 0,05$) qui porte ces taux à un maximum de 0,75 ng/ml au 6ème prélèvement. Comme lors de la phase folliculaire, ils se maintiennent significativement plus élevés jusqu'à la fin de la culture.

Les niveaux moyens d'oestradiol (fig.32.c) sont de 5 pg/ml (soit nettement moindre qu'en phase folliculaire) et restent stables durant toute la culture. Les follicules ne répondent donc pas à la stimulation gonadotrope par une augmentation de la concentration en oestradiol comme on a pu l'observer en phase folliculaire.

La phase lutéale du milieu de la saison de reproduction est donc caractérisée par des niveaux de P_4 et de Δ_4 comparables à ceux observés en phase folliculaire et

répondant de la même façon à la stimulation gonadotrope. Par contre, les taux d'E_2 sécrétés en phase lutéale, sont significativement inférieurs à ceux observés pendant la phase folliculaire et n'augmentent pas suite à la stimulation LH-FSH.

3.2. Le début de la saison de reproduction

Au début de la saison de reproduction, les taux de progestérone (fig.31.2a) varient très peu autour d'une valeur moyenne de 0,25 ng/ml proche de celle révélée au milieu de la saison (0,30 ng/ml); ils ne sont pas influencés par les stimulations gonadotropes.

Avant les stimulations, les follicules sécrètent de l'androstènedione (fig.31.2b) à un taux se situant en moyenne à 0,40 ng/ml, comparable à celui obtenu au milieu de la saison de reproduction. Ils répondent à la double stimulation par une augmentation significative des taux de Δ_4 aux prélèvements 5, 6, 7 et 8. Les valeurs redescendent ensuite à un niveau comparable à celui du début de la culture.

Les niveaux moyens de sécrétion d'oestradiol (fig.31.2c) sont avant stimulation (65 pg/ml) légèrement supérieurs à ceux obtenus au milieu de la saison de reproduction (50 pg/ml). Les follicules répondent à la double stimulation gonadotrope par une augmentation significative des sécrétions d'E_2 aux prélèvements 6, 7, 8, 9 et 10.

Au début de la saison de reproduction, la stéroïdogenèse et la réponse aux hormones gonadotropes sont donc comparables à celles observées au milieu de la saison.

3.3. La fin de la saison de reproduction

A la fin de la saison de reproduction, les taux de progestérone (fig.31.3a) varient très peu autour d'une valeur moyenne de 1,7 ng/ml et ne sont pas influencés par les traitements. Ils sont donc significativement supérieurs ($P < 0,01$) à ceux obtenus au milieu de la saison (0,30 ng/ml), mais les hormones gonadotropes n'ont toujours pas d'effet stimulateur.

Les valeurs moyennes initiales d'androstènedione (fig.31.3b) sont de l'ordre de 0,8 ng/ml. On observe une élévation 30 minutes après le début de la double stimulation ($4^{ème}$ prélèvement). Cette augmentation se maintient à des valeurs de l'ordre de 4 ng/ml tout au long de la culture. Avant et après les stimulations, les taux sont

significativement plus importants que ceux observés au milieu de la saison de reproduction.

Les taux initiaux d'oestradiol (fig.31.3c) sont très faibles et significativement moins importants ($P < 0,01$) pour les follicules prélevés en fin de saison de reproduction (8 pg/ml) que pour ceux prélevés au milieu de saison (50 pg/ml). Les gonadotropines stimulent significativement les sécrétions d'E_2 du 4ème au 11ème prélèvements. Les taux restent cependant beaucoup plus faibles ($P < 0,01$) qu'au milieu de la saison.

En fin de saison de reproduction, nous observons des accumulations de P_4 et de Δ_4 et des faibles sécrétions d'E_2, ce qui indique une diminution de la capacité d'aromatisation. Les follicules conservent cependant leur capacité de réponse aux stimulations gonadotropes par une hausse des sécrétions de Δ_4 et d'E_2.

3.4. L'anoestrus

En anoestrus, les niveaux moyens de progestérone (fig.31.4a) sont de 0,80 ng/ml. Ils sont significativement plus élevés que ceux obtenus au milieu de la saison de reproduction (0,30 ng/ml). La stimulation LH-FSH n'a aucun effet sur la sécrétion de P_4.

La sécrétion moyenne d'androstènedione (fig.31.4b) avant la stimulation est de 0,80 ng/ml ce qui est significativement supérieur ($P \leq 0,05$) au taux de base observé en phase folliculaire du cycle au milieu de la saison de reproduction (0,40 ng/ml). Les sécrétions sont significativement augmentées par l'apport de LH et de FSH jusque la fin de la culture et restent plus élevées que celles rencontrées au milieu de la saison de reproduction.

Les taux moyens d'oestradiol (fig.31.4c) sont de 25 pg/ml avant stimulation. Dès le 5ème prélèvement, ils augmentent jusque 50 pg/ml et se maintiennent jusqu'au 11ème prélèvement. Que ce soit avant ou après la double stimulation, ils sont nettement inférieurs à ceux observés au milieu de la saison de reproduction.

Il ressort donc qu'en anoestrus, avant la stimulation hormonale, les taux de P_4 et Δ_4 sont élevés alors que les taux d'E_2 sont fortement diminués, ce qui indique une diminution de la capacité d'aromatisation. Les stimulations gonadotropes ont les mêmes effets qu'au milieu de la saison de reproduction mais ils sont moins marqués pour l'E_2.

Discussion & Conclusions

1. DISCUSSION

Dans cette partie, nous tentons de mettre en relation les profils de sécrétion plasmatiques des hormones gonadotropes (LH et FSH) avec l'évolution du nombre de récepteurs à la LH et à la FSH présents sur les cellules de la granulosa des follicules ponctionnés pendant 17 jours à différents moments de la saison de reproduction et en anoestrus. Ces résultats sont également comparés avec les profils de sécrétions plasmatiques des stéroïdes ovariens (P_4 et E_2) ainsi que qu'avec la stéroïdogenèse de follicule soumis à une stimulation FSH-LH.

Avant d'entrer plus avant dans la discussion, il est bon de redéfinir les interactions entre les différentes hormones, ainsi que le rôle des récepteurs. La LH en agissant sur les récepteurs présents sur les cellules ganulosales induit principalement la biosynthèse de la P_4 et de la Δ_4 (Derivaux et Ectors, 1986). La FSH stimule l'apparition des récepteurs à la LH et la synthèse de la β-déshydrogénase, enzyme nécessaire à la transformation du prégnénolone en progestérone (Yen et Jaffe, 1991). La FSH induit également une activité aromatasique dans les cellules de la granulosa, ce qui entraîne la synthèse de l'E_2. Celui-ci stimule, en synergie avec la FSH, la production de ses propres récepteurs ainsi que de ceux de la LH et de la FSH (Yen et Jaffe, 1991).

Rappelons qu'au cours de la croissance folliculaire terminale, la dépendance des follicules antraux de diamètre supérieur à 2 mm vis-à-vis des gonadotropines se traduit par la présence de récepteurs à la FSH et de récepteurs à la LH sur les cellules de la thèque et/ou de la granulosa.

Chez la brebis, les récepteurs à la FSH sont exclusivement présents sur les cellules de la granulosa des follicules de diamètre supérieur à 2 mm (Mariana *et al.*, 1991). Les récepteurs à la LH sont dans un premier temps exclusivement présents sur les cellules de la thèque des follicules de 2 mm de diamètre (Webb et Gauld, 1984). Ils apparaissent ensuite en concentration élevée sur les cellules de la granulosa des follicules de diamètre supérieur ou égal à 4 mm (Tsonis *et al.*, 1984; Webb *et al.*, 1984).

Dans le cadre de notre expérience, nous avons ponctionné chaque jour le plus gros follicule (au moins 4 mm de diamètre) présent à la surface des ovaires. Nous avons donc pu dénombrer les récepteurs à la FSH et à la LH sur les cellules de la granulosa, les cellules de la thèque ne pouvant être récupérées par notre méthode de ponction.

En ce qui concerne la technique de quantification des récepteurs, nous avons testé la technique décrite par Bramley *et al.* (1987) et nous l'avons adaptée à nos conditions expérimentales. Ainsi la concentration en hormone marquée utilisée pour la quantification est de 200.000 cpm pour les deux hormones. Et ce malgré le fait que la saturation semble se réaliser à des concentrations plus faibles d'hormone radioiodée pour les récepteurs à la FSH que pour ceux à la LH. De la même manière, bien que le temps d'incubation minimale soit de 4 à 8 heures, mais nous avons choisi pour des raisons pratiques un temps d'incubation de 24 heures. Enfin, bien que la technique de séparation au PEG décrite par Bramley *et al.*, (1987) soit efficace, nous avons utilisé une technique de séparation par un mélange huile d'olive/DBPHT (Mager, communication personnelle) qui semble être encore plus efficace. Tous ces aménagements ont été décrits dans la partie "Mise au point de la méthode de quantification."

1.1. Le milieu de la saison de reproduction

1.1.1. Evolution du nombre de récepteurs à la FSH et à la LH

Au milieu de la saison de reproduction, la quantité de récepteurs à la FSH montre une grande variabilité, mais la valeur moyenne semble augmenter tout au long du cycle. Les valeurs plus faibles obtenues au début de la phase lutéale (premiers jours du cycle) sont en accord avec les observations de Richards (1980; cité par Yen et Jaffe, 1991) qui notait un parallélisme entre la diminution du nombre de récepteurs à la FSH sur les cellules de la granulosa des follicules et la formation du corps jaune. Par contre, selon Mariana *et al.* (1991) le nombre de récepteurs à la FSH est constant pendant l'entièreté de la croissance folliculaire terminale.

Au cours de cette même période, le nombre de récepteurs à la LH sur les cellules de la granulosa augmente tout au long du cycle pour atteindre un maximum (22.000 cpm) au jour 17.

1.1.2. Profils de sécrétion des différentes hormones

Les taux de **FSH** évoluent sous forme de 3 vagues au cours du cycle oestral. Ce type d'évolution avait déjà été décrit chez la brebis par différents auteurs (Bister et Paquay, 1983; Lahlou-Kassi et Mariana, 1984; Jacques 1989). Par contre, selon Montgomerry *et al.* (1988), les valeurs de FSH fluctuent irrégulièrement au cours du cycle. Selon Bister et Paquay (1983), une importante sécrétion de FSH dont le taux atteint 3 fois le taux basal, se produit avant l'oestrus et est suivie entre 24 et 36 heures

plus tard par une seconde élévation moins marquée appelée décharge post-ovulatoire. Nos résultats montrent en effet une augmentation des taux de FSH au jour 17 du cycle. Par contre, nous n'avons pas pu observer de décharge post-ovulatoire étant donné que nous avons arrêté les prélèvements sanguins après 17 jours et qu'une seule prise de sang était réalisée chaque jour. Selon différents auteurs (Jacques 1989; Noël, 1994), il existe une corrélation évidente entre les 3 vagues de croissance folliculaire décrites au cours d'un cycle oestral et les 3 vagues de sécrétion de FSH. Chaque vague de FSH induirait le recrutement d'un groupe de follicules capables d'entamer la croissance folliculaire terminale (Bindon, 1984; Ireland, 1987; Fortune, 1994; Noël, 1994).

La sécrétion plasmatique de la **LH** reste basale pendant toute la première partie du cycle; on observe ensuite une augmentation des sécrétions aux jours 16 et 17 qui correspond au pic préovulatoire de LH.

Rappelons que la LH est sécrétée sous forme de pulses de courte durée dont l'intensité peut varier et atteindre 10 fois le taux de base. La fréquence des décharges est d'environ 1 toutes les 6 heures en phase lutéale (Janson et Legan, 1988). En phase préovulatoire, on observe une nette augmentation du taux de LH appelée pic préovulatoire. Celle-ci est due à la sommation de plusieurs pulses très rapprochés. Nos résultats, étant basés sur une prise de sang quotidienne ne nous permettent pas de mettre en évidence la pulsatilité de la LH ni l'importance du pic préovulatoire.

La **progestérone** est sécrétée par le corps jaune en quantité de plus en plus importante au cours du cycle oestral. Sa sécrétion se stabilise et se maintient jusqu'au jour 13 pour ensuite diminuer brusquement suite à la lutéolyse. Ce profil est identique à celui décrit dans la littérature (Driancourt *et al.*, 1984; Derivaux et Ectors, 1986; Robel, 1991).

Le profil de sécrétion de **l'oestradiol** semble fluctuer sous forme de 3 vagues : deux en phase lutéale et une en phase folliculaire. D'après la littérature, l'oestradiol présente deux hausses nettes de sécrétion pendant la phase lutéale; l'une entre le 2ème et le 4ème jour et l'autre entre le 7ème et le 9ème jour (Bister et Paquay, 1983; Terqui *et al.* 1983; Jacques 1989). Les niveaux périphériques d'oestradiol augmentent 3 jours avant l'oestrus pour atteindre un maximum la veille de l'oestrus puis diminuent ensuite progressivement (Terqui *et al.*, 1983). Nos résultats nous permettent d'observer deux vagues de sécrétion d'oestradiol en phase lutéale et une légère augmentation des taux d'oestradiol en phase folliculaire.

1.1.3. Stéroïdogenèse des follicules soumis à une stimulation LH-FSH

En phase folliculaire, au milieu de la saison de reproduction, les taux de progestérone sécrétés par les follicules mis en culture restent stables tout au long de la culture. Ils ne semblent pas être augmentés suite à la double stimulation gonadotrope mais ils ne diminuent pas non plus malgré la conversion accrue en androstènedione. Les résultats tendent donc à prouver que la LH et la FSH stimulent la synthèse de progestérone en vue de la production des autres stéroïdes.

Roy et Greenwald (1989) ainsi que Jia *et al.* (1985) ont montré que la LH favorise la production de P_4 tandis que d'autres auteurs (Fanjul *et al.*, 1984; Roy et Greenwald, 1987) montrent une action positive de la FSH sur la sécrétion de P_4.

Lors de cette même période, nous observons une augmentation des sécrétions d'androstènedione suite à la stimulation hormonale. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Fortune et Vincent (1983) ainsi que par Renard (1991) qui ont montré que la LH peut activer l'enzyme $P_{450\text{-}17\alpha}$ au niveau des cellules thécales et ainsi favoriser la synthèse de Δ_4. La FSH peut ensuite stimuler l'aromatase et ainsi favoriser la transformation de Δ_4 en E_2 (Kessel *et al.*, 1987), ce qui explique la hausse des taux de E_2 obtenue après stimulation.

En phase lutéale, les taux de P_4 et de Δ_4 obtenus sont comparables à ceux observés en phase folliculaire; c'est-à-dire que, suite à la stimulation LH-FSH, les sécrétions de P_4 ne varient pas malgré une augmentation des sécrétions de Δ_4 ce qui peut s'expliquer de la même manière que lors de la phase folliculaire; la LH et la FSH stimulant la sécrétion de P_4 qui est immédiatement transformée en Δ_4.

Par contre, les taux de sécrétion d'E_2 sont nettement plus faibles que ceux observés en phase folliculaire. Ceci peut s'expliquer grâce aux expériences de Fortune et Vincent (1983) qui ont montré qu'un excès de progestérone exerce un effet inhibiteur irréversible sur la production d'oestradiol par les cellules de la granulosa. Or, en phase lutéale, les follicules sont effectivement en présence d'une quantité importante de P_4 provenant de l'activité du corps jaune.

Durant la phase lutéale, une discordance semble apparaître entre les taux d'oestradiol plasmatiques qui restent comparables à ceux observés en phase folliculaire et les taux de sécrétion d'oestradiol *in vitro* qui sont nettement inférieurs à ceux obtenus en phase folliculaire. Tout d'abord, il faut remarquer que les taux plasmatiques d'oestradiol, que ce soit en phase lutéale ou en phase folliculaire, ne dépassent pas les

15 pg/ml alors que les sécrétions d'oestradiol, avant stimulation, des follicules placés en culture sont de 50 pg/ml en phase folliculaire et inférieurs à 15 pg/ml en phase lutéale. Toutes ces observations sont contradictoires mais, jusqu'à ce jour, aucune explication n'a pu y être apportée.

D'un autre côté, les follicules soustraits de leur environnement ovarien ne peuvent plus interagir avec l'axe hypothalamo-hypophysaire pour exercer d'éventuels "feed-back" et ils ne sont plus soumis aux régulations paracrines notamment de l'IGF-1 et de l'EGF.

1.1.4. Comparaison entre les nombres de récepteurs aux gonadotropines, les concentrations plasmatiques hormonales et la stéroïdogenèse

La FSH induit la synthèse et la sécrétion d'oestradiol par les cellules de la granulosa. Elle agit en stimulant l'aromatase, enzyme catalysant la transformation de la Δ_4 en E_2 (Kessel *et al.*, 1987). On pourrait donc s'attendre à observer un parallélisme entre le nombre de récepteurs à la FSH présents sur les cellules de la granulosa et les sécrétions d'E_2 par les follicules. Ceci n'apparaît pas dans nos résultats, les sécrétions d'oestradiol se faisant en trois vagues; alors que, l'évolution du nombre de récepteurs à la FSH ne se fait pas par vagues successives.

En fin de cycle, nous observons une augmentation du nombre de récepteurs à la LH sur les cellules de la granulosa ainsi qu'une augmentation des concentrations plasmatiques de la LH. Les deux mécanismes sont sans doute responsables de l'enclenchement du phénomène d'ovulation. Mariana *et al.* (1991) soulignent que l'acquisition de récepteurs à la LH sur les cellules de la granulosa est une indication de la maturité du follicule et de sa capacité à répondre au pic préovulatoire de LH.

La quantité de récepteurs à la LH et à la FSH présents sur les cellules de la granulosa ne peut pas être mise en relation avec les taux plasmatiques de progestérone puisque cette hormone est principalement sécrétée par le corps jaune (Driancourt *et al.*, 1984). Au niveau des follicules ovariens, la progestérone ne représente qu'une étape intermédiaire dans la biosynthèse de l'oestradiol (Liu et Hsueh, 1986).

Le nombre de récepteurs à la FSH en milieu de saison de reproduction, bien que très variable, semble être suffisant pour permettre à la FSH d'activer la synthèse d'oestradiol. On peut donc penser qu'en phase lutéale, la progestérone sécrétée par le corps jaune inhibe de manière irréversible le complexe aromatase des follicules.

Cependant, il n'y a pas d'accumulation de progestérone et d'androstènedione qui sont les précurseurs de l'oestradiol; ceci peut-être expliqué par un rétrocontrôle négatif de ceux-ci sur leur propre synthèse.

On pourrait aussi penser que la différence importante de sécrétion d'oestradiol *in vitro* entre la phase lutéale et la phase folliculaire serait due à un nombre de cellules granulosales plus élevé pour un nombre de récepteurs à la FSH par cellule presque identique. Or, il a été prouvé que l'indice mitotique des cellules de la granulosa reste identique durant l'entièreté d'un cycle et que l'augmentation de taille des follicules n'est due qu'à une augmentation du volume de l'antrum.

1.2. Fin de la saison de reproduction

En fin de la saison de reproduction, on constate que les nombres de récepteurs à la LH et à la FSH sont stables, mais restent très faibles par rapport à ceux observés en milieu de saison de reproduction et ne présentent aucune augmentation au cours du cycle.

L'évolution des taux plasmatiques de progestérone sont comparables à ceux observés au milieu de la saison de reproduction; la progestérone étant toujours sécrétée par le corps jaune. Les taux plasmatiques de LH sont, eux aussi, comparables à ceux observés en milieu de saison de reproduction; cependant, on ne constate plus d'augmentation de ceux-ci en fin de cycle ce qui signifierait qu'il n'y a pas de pic préovulatoire de LH. Mais, il faut rappeler que nous avons procédé à des prises de sang quotidiennes et que le pic de LH ne durant que 10 heures, il nous a peut-être échappé.

Les taux plasmatiques de FSH et d'oestradiol ne fluctuent plus sous forme de trois vagues bien nettes de sécrétions. Ceux de FSH semblent être plus faibles que durant le milieu de la saison de reproduction alors que ceux d'oestradiol sont du même ordre. Des résultats comparables avaient été obtenus par Noël (1994).

Mis en culture, les follicules présentent des accumulations de progestérone et androstènedione et des faibles sécrétions d'oestradiol; ces dernières montrent toutefois une légère augmentation suite à la stimulation LH-FSH. Des résultats similaires avaient été obtenus par Perrad (1992) qui avait expliqué ses résultats en montrant, grâce à des coupes histologiques, que les cellules de la granulosa des follicules montraient un bouleversement de structure qui pouvait faire penser à un début de lutéinisation.

Fortune et Vincent (1983) ont, eux aussi, montré que le début de la lutéinisation était caractérisé par un blocage du système enzymatique vers une sécrétion accrue de progestérone et une diminution de la sécrétion d'oestradiol.

De nouveau, il apparaît une discordance entre la diminution de la sécrétion d'oestradiol *in vitro* par les follicules prélevés au jour 16 et les taux plasmatiques d'oestradiol élevés au même moment du cycle; celle-ci s'explique de la même manière que celle observée durant la phase lutéale du milieu de la saison de reproduction.

La diminution de la sécrétion d'oestradiol *in vitro* peut être expliquée par une diminution du nombre des récepteurs à la FSH. Par contre, l'augmentation de la sécrétion de progestérone et d'androstènedione n'est pas due à une augmentation du nombre de récepteurs à la LH puisque ce nombre diminue. Il s'agit donc effectivement d'un blocage enzymatique comme celui décrit par Fortune et Vincent (1983) ou d'une augmentation du nombre de récepteurs à la LH sur les cellules de la thèque. Une analyse par autoradiographie des follicules entiers pourrait nous apporter plus de renseignements à ce sujet. On pourrait également penser à une modification des régulations paracrines ou autocrines. Certains facteurs de croissance ont, en effet, la capacité de stimuler (IGF) ou d'inhiber (EGF) les sécrétions d'oestradiol. Cet aspect fait l'objet du mémoire de Botspoel (1993) et a permis de mettre en évidence une stimulation de l'IGF-1 sur les sécrétions d'oestradiol en début et en fin de saison; l'EGF a un effet inverse durant les trois périodes de la saison de reproduction. De plus, l'EGF augmente les sécrétions de progestérone pendant toute la saison de reproduction et celles d'androstènedione en fin de saison.

1.3. Anoestrus

En anoestrus, les profils de fixation de la FSH et de la LH marquées sur les cellules de la granulosa ainsi que les taux plasmatiques de FSH et d'oestradiol sont comparables à ceux observés en fin de saison de reproduction.

La stéroïdogenèse des follicules placés en culture montre, comme en fin de saison mais dans une moindre mesure, une accumulation de progestérone et d'androstènedione. Les taux de sécrétions d'oestradiol *in vitro* sont légèrement supérieurs à ceux observés en fin de saison et répondent toujours par une augmentation à l'apport de LH et de FSH.

De nouveau, il apparaît une discordance entre la diminution de la sécrétion d'oestradiol *in vitro* pour les follicules prélevés 18 jours après la synchronisation et les

taux plasmatiques d'oestradiol élevés observés au même moment; celle-ci s'explique de la même manière que celles observées durant la phase lutéale du milieu de la saison de reproduction et la phase folliculaire de la fin de la saison de reproduction.

Les principaux changements apparaissant entre la fin de la saison de reproduction et l'anoestrus sont un taux plasmatique de progestérone qui reste très faible durant les 17 jours de prélèvement et l'absence de pic préovulatoire de LH. Le premier est dû à l'absence de corps jaune et le second explique l'absence d'ovulation.

La diminution du nombre de récepteurs commençant déjà en fin de saison de reproduction, on ne peut en conclure qu'elle soit responsable de l'entrée en anoestrus.

La première hypothèse proposée pour expliquer l'entrée en anoestrus est une désensibilisation de l'axe hypothalamo-hypophysaire envers l'oestradiol annulant l'effet de "feed-back" positif de l'oestradiol sur la décharge préovulatoire des gonadotropines et par le fait même, l'ovulation.

La seconde hypothèse est une modification de l'activité de IGF-1 qui inhiberait l'effet stimulateur des hormones gonadotropes sur les sécrétions d'androstènedione et d'oestradiol (Botspoel, 1993).

1.4. Début de la saison de reproduction

Le début de la saison de reproduction est caractérisé par une grande variabilité au niveau des quantités de LH et FSH radioiodées fixées sur les cellules de la granulosa, alors qu'en anoestrus les quantités sont stables et en moyenne plus faibles.

Les concentrations plasmatiques de FSH sont comparables à celles observées en anoestrus et en fin de saison de reproduction. Le milieu de la saison de reproduction est donc la seule période caractérisée par trois vagues de sécrétions.

Les taux plasmatiques de LH sont, eux aussi, comparables à ceux observés en anoestrus bien que le pic préovulatoire réapparaisse annonçant ainsi l'entrée en saison de reproduction.

A cause de la réapparition du corps jaune, les concentrations plasmatiques de progestérone reprennent leur évolution cyclique caractéristique de la saison de reproduction.

Les taux plasmatiques d'oestradiol présentent le même profil de sécrétion que ceux observés en anoestrus mais les concentrations sont légèrement plus élevées tout au long du cycle. De nouveau, comme pour la FSH, le milieu de la saison de reproduction est donc la seule période caractérisée par trois vagues de sécrétions d'oestradiol.

Les taux de sécrétion de progestérone et d'androstènedione des follicules placés en culture sont supérieurs à ceux observés en anoestrus et les sécrétions d'oestradiol sont plus élevées et répondent à la stimulation LH-FSH. Les sécrétions stéroïdiennes des follicules placés en culture sont, en fait, comparables à celles obtenues au milieu de la saison de reproduction que ce soit avant ou après la stimulation gonadotrope. Des résultats comparables avaient été obtenus par Perrad (1992).

L'absence de fluctuation régulière de la FSH et de l'oestradiol pourrait également expliquer le fait que l'acquisition des récepteurs à la LH et récepteurs à la FSH varie très fort au cours du cycle étant donné que se sont la FSH et l'oestradiol qui sont responsables de leur apparition au niveau des cellules granulosales.

2. CONCLUSIONS

L'étude au cours d'une année de l'évolution du nombre de récepteurs aux hormones gonadotropes durant une période de 17 jours suivant une synchronisation par un progestagène (FGA) chez des brebis Suffolk nous a permis de tirer les conclusions suivantes:

- au cours d'un cycle oestral en milieu de saison de reproduction, le nombre de récepteurs aux hormones gonadotropes (FSH et LH) tend à augmenter pour atteindre un maximum en phase folliculaire;
- en fin de saison de reproduction ainsi qu'en anoestrus, le nombre de récepteurs aux gonadotropines est faible et ne présente pas d'augmentation à la fin de la période de 17 jours;
- au début de la saison de reproduction, le nombre de récepteurs à la FSH et à la LH montre une grande variabilité tout au long du cycle annonçant la reprise de l'évolution observée en milieu de saison de reproduction.

L'évolution du nombre de récepteurs aux gonadotropines a ensuite été comparé avec les profils de sécrétion des hormones gonadotropes et stéroïdiennes, ainsi qu'avec la stéroïdogenèse de follicules soumis à une stimulation LH-FSH.

Aucun parallélisme entre les taux plasmatiques d'oestradiol, le nombre de recepteurs aux gonadotropines et la réactivité des follicules à la stimulation gonadotrope n'a pu être mis en évidence.

La phase lutéale du milieu de la saison de reproduction est caractérisée par une déficience au niveau des sécrétions d'oestradiol et une absence de réponse significative à la stimulation gonadotrope quelque soit le stéroïde considéré.

Pendant la phase folliculaire, les niveaux de progestérone sont peu variables alors que les sécrétions moyennes d'androstènedione et d'oestradiol augmentent suite à l'apport d'hormone gonadotrope.

De plus, le nombre de récepteurs aux gonadotropines présents sur les cellules de la granulosa est moins important en phase lutéale.

Les taux de progestérone sécrétés par le corps jaune en phase lutéale semblent donc exercer un effet inhibiteur sur l'acquisition des récepteurs à la LH et à la FSH et sur l'activité aromatasique des follicules.

En fin de saison de reproduction, nous observons une production plus importante de progestérone aux dépens de l'oestradiol. Il se produirait donc un blocage du système enzymatique qui modifierait la stéroïdogenèse vers une production accrue de progestérone. Ceci est associé à une diminution du nombre de récepteurs à la LH et à la FSH par rapport au milieu de la saison de reproduction.

Le passage en anoestrus est caractérisé par une diminution des sécrétions d'oestradiol. Les follicules restent cependant capables de répondre à la stimulation gonadotrope par une hausse des taux d'oestradiol. De plus, nous avons observé une diminution du nombre de récepteurs à la LH et à la FSH.

Le retour en saison de reproduction est caractérisé par une reprise des sécrétions d'oestradiol suite à la stimulation gonadotrope et par l'augmentation progressive du nombre de récepteurs aux hormones gonadotropes.

Au vu de nos résultats, il semblerait qu'il existe d'autres mécanismes que l'acquisition des récepteurs aux gonadotropines impliqués dans la régulation de la croissance folliculaire terminale et notamment l'ensemble des réactions paracrines exercées par les facteurs de croissance.

Références Bibliographiques

Armstrong, D.T., Daniel, S.A.J., Gore-Longton, R.E. (1987) Intra-ovarian actions of steroids in regulation of follicular steroid biosynthesis. In : Leung P.C.K., Armstrong D.T., Ruf K.B., Moger W.H. and Friesen M.G. (Eds). "Endocrinology and Phyiology of Reproduction" , New York, Plenum Press, 177-195.

Bister, J.L. (1980) Influence de la photopériode sur la physiologie de la reproduction de la brebis Texel. Thèse de doctorat. FUNDP, Namur.

Bister, J.L. (1991) Physiologie animale, cours de 1ère licence. F.U.N.D.P., Namur.

Bister, J.L. and Paquay, R. (1983) Fluctuations in the plasma levels of the follicule stimulating-hormone during oestrus cycle, anoestrus, gestation and lactation in the ewe : evidence for endogenous rythm of FSH release. *Theriogenology* ,25, 53-70.

Bindon, B.M. (1984) Reproductive biology of Booroola Merino sheep. *Austr.J.Biol.Sci.*; 37,163-189.

Botspoel, N. (1993) Effets de l'état physiologique et de différents traitements hormonaux sur la sensibilité des follicules ovariens aux facteurs de croissance. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Licencié en Sciences Biologiques, FUNDP, Namur

Bramley, T.A, Stirling, D. Svenston, I.A, Mengries, G.R. and Baird D.J. (1987) Specific binding sites for LH/chorionic gonadotropin, low-density lipoprotein, prolactin and FSH in homogenates of human corpus luteum. I : Validation of Methods. *J. Endocr.*; 113, 305-315.

Brand, A. and de Jong, W.H.R. (1973) Qualitative and quantitative micromorphological investigations of the tertiary follicle population during the oestrus cycle in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 33, 431-439.

Bränströom, M. (1988) Mecanism of ovulation. Studies using the in vitro perfused rat ovary. Department of Physiology, University of Göteborg.

Cahill, L.P. and Mauléon, P. (1980) Influences of season, cycle and breed on follicular growth rates in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 58, 321-328.

Cahill, L.P., Mariana, J.C., Mauléon, P. (1979) Total ovarian follicular population in ewes of high and low ovulation rate. *J. Reprod. Fert.*, 55, 27-36.

Caldani, M.,, Caraty, A., Pelletier, J., Thiéry, J.C. and Tillet, Y. (1991) La libération pulsatile de LH et son contrôle. Dans Thibault C. & Levasseur M.C. (Eds) "La reproduction chez les mammifères et l'homme". INRA Ellipses, 71-87.

Catt, K.J. and Dufau, M.L. (1991) Gonadotropic hormones : biosynthesis, receptors and action. In : Yen S.S.C and Jaffe R.B. (Eds) "Reproductive Endocinology" W.B. sanders Company, 105-155.

Clarke, I.J. (1989) The GnRH/gonadotropin axis in the ewe, cow and sow. *Domest. Anim.Endocr.* 6, 1-14.

Craplet, C. and Thibier, M. (1980) Le mouton. Edition Vigot tome IV, p.163.

Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. (1989) La cellule. Biologie Moléculaire Decarie ed. inc. Editions Vigot. 1ère edition, pp 567-615 et pp 667-714.

Demuynck, 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, troisième édition.

Di Zerega, G.M. and Hodgen, G.D. (1981) Folliculogenesis in the primate ovarian cycle. *Endocr. Rev.*, 2, 27-49.

Di Zerega, G.M., Arrs, R.P., Roche, P.C., Campeau, J.D. and Kling, O.R., (1983) Identification of proteins in pooled human follicular fluid which suppres follicular response to gonadotrophins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 56, 35-41.

Driancourt, M.A. and Cahill, L.P. (1984) Preovulatory follicular events in sheep. *J. Reprod. Fert.* , 71, 205-211.

Driancourt, M.A., Gibson, W.R. and Cahill, L.P. (1984) Follicular dynamics throughout the oestrus cycle in sheep. *Reprod. Nutr. Dev.*, 25 (1A), 1-15.

Driancourt, M.A., Cahill, L.P. and Bindon, B.M. (1985) Ovarian follicular population and preovulatory enlargement in Boorola and control Merino ewes. *J. Reprod. Fert.*, 73, 93-107.

Driancourt, M.A., Fry, R.C., Clarke, I.J. and Cahill, L.P.(1987) Follicular growth and regression during the 8 days after hypophysectomy in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 79, 635-641.

Driancourt, M.A., Goujeon, A., Royère, D., Thibault, Ch. (1991) La fonction ovarienne. Dans Thibault C. & Levasseur M.C. (Eds) "La reproduction chez les mammifères et l'homme". INRA Ellipses, 273-298.

Fanjul, L.F., Ruiz de Galarreta, C.M. and Hsueh, A.J.W. (1984) Progestin augmentation of gonadotropin-stimulated progesterone production by culture rat granulosa cells. *Endocrinology*, 114, (2) 407-410.

Fortune, J.E. and Vincent, S.E. (1983) Progesterone inhibits the induction of aromatase activity in rat granulosa cells in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 29 , 1078-1089.

Fortune, J.E.(1994) Ovarian follicular growth and development. Mammals Biology of Reproduction, 50, 225-232.

Ginther, O.J., Knopf, L. and Kastelic, J.P. (1989a) Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biol.of Reprod.* 41, 247-254.

Ginther, O.J., Knopf, L. and Kastelic, J.P. (1989b) Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycle with two and three follicular waves. *J.Reprod.Fert.* 87, 223-230.

Goldring, N.B., Durica, J.M., Lifka, J., Hedin, L., atoosh, S.L., Miller, W.L.,Orly, J. and Richards, J.S. (1987) Cholesterol side-chain cleavage P450 messenger ribonucleic acid : evidence for hormonal regulation in rat ovarian

follicles and constitution expression in corpora lutea. *Endocrinology*, 120, 1942-1950.

Goodman, R.L. and Karsh, F.J. (1980) A critique of the evidence on the importance of steroïd feedback to seasonal changes in gonadotrophin secretion. *J. Reprod. Fert.*, Suppl. 30, 1-13.

Haresign, W., Mc Leod, G.J., Webster, G.M. and Worthy, K. (1984) Endocrine basis of seasonal anoestrus in sheep, Eds. Ellendorff & Elsaesser.

I'Anson, H. and Legan, S.J. (1988) Changes in LH pulse frequency and serum progesterone concentrations during the transition to breeding season inewes. *J.Reprod.fert.* 82, 761-767.

Ireland, J.J. (1987) Control of follicular growth and developemnt. *J.Reprod.Fert. Suppl.* 34, 39-54.

Ireland, J.J. and Roche, J.F. (1987) Hypothesis regarding development dominant follicles during a bovine estrus cycle. In follicular growth and ovulation rate in form animals. Eds Roche, J.F. and O'Callagan, D. Martinus Nijh off the Mague. pp 1-18.

Jacques, E. (1989) Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences biologiques : Contrôle de la croissance terminale et de la maturation des follicules ovariens de la brebis. Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur.

Jia, X.C and Hsueh, A.J.W. (1984) Homologous regulations of hormone receptors : Luteinizing hormone increases its own receptors in cultured granulosa cells. *Endocrinology*, 115, 2433-2449.

Jia, X.C., Kessel, B., Welsh, T.H. and Hsueh, A.J.W. (1985) Androgen inhibition of follicule stimulating hormone stimulated luteinizing hormone receptor formation in cultured granulosa cells. *Endocynology* 117, 13-22.

Junqueira, L.C., Carneiro, J. and Long, J.A. (1986) Basic histology. Third edition. Piecin Nuova Libraria. S.p.A., Italia.

Kessel, B., Xiao-Chi, J., Davoren, B. and 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.

LaBarbera, A.R. and Ryan, R.J. (1981) Porcine Granulosa Cells in Suspension Culture. I. Follicle-Stimulating Hormone Induction of Human Chorionic Gonadotropin-Binding Sites on Cells from Small Follicles. *Endocrin*, 108, 1561-1569.

Lalhou-Kassi, A. and Mariana, J.C. (1984) Ovarian follicular growth during the oestrus cycle in two breeds of ewes of different ovulation rate. *J. Reprod. Fertil.*, 72, 301-310.

Legan, S.J., Karsch F.J. and Foster, D.L. (1977) The endocrine control of seasonal reproductive function in the ewe : a marked change in reponse to the negative feedback action of oestradiol on luteinizing hormone secretion. *Endocrin.*, 101, 818-824.

Legan, S.J. and Karsch, F.J. (1979) Neuroendocrine regulation of the oestral cycle and seasonal breeding in the ewes. *Biol. Reprod.*, 20, 74-85.

Legan, S.J., L'Anson H., Fitzgerald, B.P. and Fitzovich, D. (1985) Does the seasonal icrease in oestradiol negative feed-back prevent luteinizing hormone surges in anoestrus ewes by suppressing hypothalamic gonadotrophin-releasing-hormne pulse frequency ? *Biol.Reprod.* 33, 117-131.

Liu, Y.X. and Hsueh A.J.W. (1986) Synergism between granulosa and theca-interstitiel cells in estrogen biosynthesis by gonadotropin treated rat ovaries : studies on two cell, two gonadotropin hypothesis using steroïd antisera. *Biol. Reprod.*, 35, 27-36.

Malpaux, B.,Wayne, N.L. and Karsch, F.J. (1988) Termination of breeding season in the Suffolk ewe. Involvement of a endogenous rhythm of reproducion. *Biol.Reprod.* 39, 254-263.

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.

Mariana, J.C., Monniaux, D., Driancourt, M-A. and Mauléon, P. (1991) Folliculogenesis. In : Cupps P.T. (Eds) "Reproduction in domestic animals", Academic Press, San Diego, 119-171.

Martin, G.B., Price, C.A., Thiery, J.C. and Webb, R. (1988) Interactions between inhibin, oestradiol and progesterone in the control of gonadotrophin secretion in the ewe. *J.Reprod.Fert.* 82, 319-328.

Mc Natty, K.P., Gibb, M., Dobson, C, Bull, K., Coster, I., Heath, D.A., Thurley, D.C. (1982) Preovulatory follicular development in sheep treated with P.M.S.G. and/or prostaglandine. *J. Reprod. Fert.*, 65, 111-123.

Mc Natty, K.P., Hudson, N.L., Gibb, M., Ball, K., Henderson, K.M., Heath, D.A., Lun, S. and 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., Hunter, M., Land, R.B. and Fraser, H.M. (1981) Inadequate corpus luteum function after the induction of ovulation in anoestrous ewes by LH-RH or an LH-RH agonist. *J. Reprod. Fert.*, 63, 137-144.

Mc Neilly, A.S., Jonassen, J.A., Fraser, H.M. (1986) Suppression of follicular development after chronic LHRH immunoventralisation in the ewe. *J. reprod. fert.*, 76, 481-490.

Mc Neilly, A.S., Crow, W., Brooks, J. and Evan, C. (1992) Luteinizing hormone pulses, follicle-stimulating hormone and control of follicle selection in sheep. *J. Reprod. Fert.*, Supp. 45, 5-19.

Mc Neilly, A.S.(1991) The ovarian follicle and fertility. *J. Steroïd Biochem. Molec. Biol.*, vol 40, n° 1-3, pp 29-33.

Monget, P. (1993) Le système IGF dans l'ovaire de brebis. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences. Station INRA de physiologie de la reproduction des mammifères domestiques. Tours, France.

Montgomery, G.W., Scott, I.C. and Johnstone, P.D. (1988) Seasonal changes in ovulation rate in Coopworth ewes maintained at different liveweights. *An. Reprod. Sc.*, 17, 197-205.

Noël, B., Bister, J.L. and Paquay, R. (1993) Ovarian follicules dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. *J. Reprod. Fert.*; 99; 695-700.

Noël, B. (1994) Contrôle et maîtrise de la stéroïdogenèse et de la croissance folliculaire terminale chez la brebis Suffolk. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences. FUNDP, Namur.

O'Malley, B.W. and Strodt, C.A. (1991) Steroid hormones : Metabolism and mechanism of action. In : Yen S.S.C and Jaffe R.B. (Eds) "Reproductive Endocinology" W.B. sanders Company, 156-180.

Oussaïd, B. (1982) Etude de l'activité ovarienne et de la stimulation pendant l'anoestrus chez la brebis Ile-de-France. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de docteur, 3 ème cycle, Paris VI, France.

Pearce, D.T. et Oldham, C.M. (1988) Ovulation in the Merino ewe in the breeding and anoestrous seasons. *Aust. J. Biol. Sci.*, 41, 23-36.

Perrad, B. (1992) Effets de l'état physiologique et de différents traitements hormonaux sur la réponse de follicules ovariens de brebis cultivés *in vitro*. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Licencié en Sciences Biologiques; FUNDP. Namur.

Philippon, P. (1988) Vaccination contre l'androstènedione de brebis Merinos d'Arles : effet sur le taux d'ovulation dans différents systèmes de conduite. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de licencié en sciences agronomiques; Académie de Montpellier, France.

Piraux, C. (1990) Etude de la prolactine durant les différentes phases de l'activité sexuelle chez la brebis Texel. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences; FUNDP, Namur.

Plachot, M. (1989) La maturation ovocytaire. *Contracept-fertil-sex*, 1988, 33-43.

Rawling, N.C., Kennedy, S.W., Chong, C.H., Mill, J.P. and Hendrickx, D.M. (1977) Onset of seasonal anoestrus in the ewe. *J. Anim. Sci.*; 44 , 791.

Renard, D. (1991) Influence hormonale sur l'activité de follicules ovariens de brebis en culture. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Licencié en Sciences Biologiques; F.U.N.D.P., Namur.

Robel, P. (1991a) La stéroïdogenèse : les enzymes et la régulation de leur expression génomique. Dans Thibault C. & Levasseur M.C. (Eds) "La reproduction chez les mammifères et l'homme". INRA Ellipses, 127-134.

Robel, P. (1991b) Les récepteurs des hormones stéroïdes impliquées dans la reproduction : mode d'action. Dans Thibault C. & Levasseur M.C. (Eds) "La reproduction chez les mammifères et l'homme". INRA Ellipses, 135-152.

Ronin, C. (1989) Les récepteurs aux gonadotropines. *Annales d'endocrinologie* (Paris), 50, 388-398.

Roy, S.K. and Greenwald, G.S. (1989) Hormonal requierments for the growth and differentiation of hamster preantral follicles in long-term culture. *J. Reprod; Fert.*; 87, 103-119.

Ruckebusch, Y., Phaneuf, L.P., Dunlop, R. (1991) Physiology of small and large animals. First edition; pp 489-511.

Scaramuzzy, R.J. and Radford, H.M. (1983) Factors regulating ovulation rate in the ewe. *J.Reprod.Fert.* 69, 353-367.

Scaramuzzy, R.J., Admas, N.R., Baird, D.T., Campbell, B.K., Dowing, J.A., Findlay, J.K., Henderson, K.M., Marin, G.B., McNatty, K.P.,

McNeilly, A.S. and Tsonis, C.G. (1993) Amodel for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod.Fert.Dev.*, 5, 459-478.

Schwall, R.H. and Erikson, G.F. (1984) Inhibition of synthesis of luteinizing hormone (L.H.) receptors by a Down regulating dose of LH. *Endocrinology*, 114, 1114-1123.

Terqui, M., Berthelot, F. and Gotta, J. (1983) Variations de la concentration de l'oestradiol-17β dans le sang périphérique de la brebis au cours du cycle oestral. C.R. Acad. Sci., Paris 277 (Série D) 1595-1598.

Thibault, C., Srjöllösi, D. and Gerard, M. (1987) Mammalian oocyte maturation. *Reprod. Nutr. Dev.*, 27 (5), 865-896.

Thibault C. & Levasseur M.C. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Eds. INRA Ellipses, 53-69.

Tsonis, C.G., Carson, R.S. and Findlay, J.K. (1984) Relationships between aromatase activity, follicular fluid oestradiol-17b and testosterone concentration, and diametre and atresice of individual ovine follicles. *J. Reprod. Fert.*, 72, 153-163.

Walton, J.S., Mc Neilly, J.R., Mc Neilly, A.S. and Cunnigham, F.J. (1977) Changes in concentrations of follicle-stimulating, luteinizing hormone, prolacting and progesterone in the plasma of ewes during the transition from anoestrus to breeding activity. *Endocrinology*, 75, 127-136.

Webb, R. and England, B.R. (1982) Relationship between LH receptor concentrations in the eal on granulosa cells in vivo and in vitro steroïd secretion by ovine follicules during preovulatory period. *J. Reprod. Fert.*, 66, 169-180.

Webb, R. and Gauld, J.K. (1984) Final maturation of the preovulatory follicle in the ewe in "période pré-ovulatoire".(Sarat-Barouse J. and Thibooltch Masson, ed) pp 21-31.

Webb, R., Baxter, G., Mc Bride, D., Ritchie, M. and Springbett, A.J. (1992) Mecanism controlling ovulation rate in ewes in relation to seasonal anoestrus. *J. Reprod. Fert.*, 94, 143-151.

Wilson, J.D. and Foster, D.W. (1992) Williams Textbook of Endocrinology. 8th Edition. W.B. Sanders Company, Harcourt Brace Jovanovich, Inc.

Yarney, T.A. and Sairam, M.R. (1991) Differences in properties of the sheep testicular LH and FSH receptors. *J. Molecular Endocrinology*, 6, 291-297.

Yen, S.S.C. and Jaffe, R.B. (1991) Reproductive endocrinology. Third edition W.B. Saunders Company.

Yenikoye, A., Mariana, J.C. and Celeux, G. (1989) Follicular growth during the oestrus cycle in Peul sheep. ; *Anim. Reprod. Sci.* , 21, 201-211.