

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Mise au point d'une technique de culture in vitro de follicules ovariens de brebis

Demuynck, Fabian

Award date:
1990

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.

24089r



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

1990

**MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE
DE CULTURE IN VITRO DE FOLLICULES
OVARIENS DE BREBIS.**

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

DEMUYNCK FABIAN

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61- 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Télex 59222 Facnam-b - Téléfax 081/23.03.91

Mise au point d'une technique de culture in vitro de follicules ovariens de brebis.

DEMUYNCK Fabian

Résumé

Le but de ce mémoire était de mettre au point une technique de culture in vitro qui permette une étude de la physiologie du follicule.

A cette fin, une analyse des effets de la température du transport, de l'ajout de sérum de veau foetal au milieu et du nombre de follicules placés par chambre a été réalisée. Une stimulation des follicules par de la FSH a également été envisagée.

Les résultats obtenus montrent qu'il est préférable, pour étudier la physiologie du follicule, de réaliser les cultures en ne plaçant qu'un follicule par chambre. Dans ce cas on observe une survie minimale de 25 heures ainsi qu'une bonne corrélation entre l'état physiologique des follicules et leurs sécrétions. En effet, les follicules sains sécrètent plus d'oestradiol que les atrétiques et cette sécrétion élevée est maintenue tout au long de la culture.

Les résultats montrent également que la FSH stimulerait la stéroïdogénèse en trois points: au niveau de la synthèse de la progestérone, des androgènes et de l'oestradiol.

On ne peut tirer de conclusions quant aux effets du sérum et de la température de transport, d'autres expériences devront être réalisés pour vérifier les résultats obtenus.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Septembre 1990

Promoteur : R. Paquay

Co-promoteur : J-L. Bister

REMERCIEMENTS.

Je tiens à remercier mon promoteur, le professeur R. PAQUAY, de m'avoir permis de travailler dans son laboratoire, ainsi que pour ses conseils lors de la rédaction de ce travail.

Je remercie également le D^r J.L. BISTER pour son aide, sa disponibilité et ses remarques judicieuses au cours de cette année.

Que tous les membres du laboratoire de Physiologie Animale soient remerciés pour l'accueil et l'assistance qu'ils m'ont réservé.

Mes remerciements vont également au professeur R. LELOUP et au département d'Immunologie pour m'avoir autorisé à réaliser une partie de mon travail dans leur laboratoire, ainsi qu'aux membres de ces départements pour l'aide qu'ils m'ont fournie.

J'exprime enfin toute ma reconnaissance à mes parents pour le soutien qu'ils m'ont témoigné tout au long de mes études.

TABLE DES MATIERES.

Remerciements.

Table des matières.

Introduction.

Chapitre I: Revue bibliographique

1. Description histologique.	1
1.1. Ovaire	1
1.2. Follicules en maturation.....	1
1.3. Follicule atrétique.....	2
2. Gamétogenèse.....	3
2.1. Ovogenèse.....	3
2.2. Folliculogenèse.....	3
2.3. Cinétique de la croissance folliculaire terminale.....	5
2.4. Recrutement, sélection, dominance.....	6
2.4.1. Recrutement.....	6
2.4.2. Sélection du follicule dominant.....	6
2.4.3. Atrésie folliculaire.....	8
2.5. Différenciation cellulaire et contrôle de la croissance des follicules à antrum.....	8
2.5.1. Rôles de la FSH.....	8
2.5.2. Rôles de la LH.....	9
2.5.3. Rôles de l'oestradiol.....	9
2.5.4. Rôles de la progestérone.....	9
2.5.5. Rôles des androgènes.....	10
2.5.6. Contrôle paracrine.....	10
2.5.6.1. Facteurs protéiques spécifiques.....	10
2.5.6.2. Facteurs de croissance.....	11
2.6. Maturation de l' ovocyte.....	13
2.6.1. Maturation nucléaire.....	14
2.6.1.1. Facteurs inhibant la méiose.....	14
2.6.1.2. Facteurs induisant la reprise de la méiose.....	16
2.6.1.3. Causes de la reprise de la méiose.....	16
2.6.2. Maturation cytoplasmique.....	16
2.7. Ovulation.....	17
2.7.1. Mécanismes hormonaux.....	17
2.7.2. Mécanismes biochimiques.....	17
3. Steroidogénese.....	19
3.1. Régulation de la synthèse des stéroïdes.....	20
3.1.1. Oestradiol.....	20

3.1.2. Androgènes.....	21
3.1.3. Progestérone.....	22
3.2. Modifications fonctionnelles dues au pic de LH.....	23

Chapitre II: Matériel et méthodes.

1. Objectifs poursuivis.....	24
2. Méthodes.....	24
2.1. Préparation du matériel biologique.....	24
2.2. Culture in vitro.....	25
2.2.1. Milieu de culture.....	25
2.2.2. Description du matériel.....	25
2.3. Techniques histologiques et interprétation.....	26
2.4. Dosages hormonaux.....	27

Chapitre III: Résultats.

1. Objectifs des cultures.....	30
2. Première culture.....	30
2.1. But.....	30
2.2. Schéma expérimental.....	30
2.3. Résultats.....	31
3. Deuxième culture.....	31
3.1. But.....	31
3.2. Schéma expérimental.....	31
3.3. Résultats.....	31
4. Troisième et quatrième cultures.....	32
4.1. But.....	32
4.2. Schéma expérimental.....	32
4.3. Résultats.....	33
5. Cinquième culture.....	33
5.1. Buts.....	33
5.2. Schéma expérimental.....	33
5.3. Résultats.....	34
6. Sixième culture.....	35
6.1. Résultats.....	35
7. Septième culture.....	36
7.1. But.....	36
7.2. Schéma expérimental.....	36
7.3. Résultats.....	37

Chapitre IV: Discussion.

1. Température de transport.....	39
2. Composition du milieu.....	40
3. Evolution des sécrétions au cours des cultures.....	41
4. Comparaison entre l'observation histologique et les sécrétions.	41
5. Effets des stimulations.	43
6. Valeur de la techniques.....	44

Conclusions.

Bibliographie.

Annexes.

INTRODUCTION.

Jusqu'à présent l'étude de la croissance et de la maturation folliculaire se faisait essentiellement par la technique d'endoscopie. Cependant différentes données de la littérature ainsi que des expériences réalisées au laboratoire de Physiologie Animale montrent que des follicules morphologiquement identiques peuvent avoir une capacité de synthèse hormonale totalement différente. Les données obtenues par endoscopie ne sont dès lors plus suffisantes pour évaluer le fonctionnement de l'ovaire. Une étude fondamentale des mécanismes folliculaires s'avère donc nécessaire.

Toutes ces raisons nous ont poussés à rechercher une méthode de culture *in vitro* des follicules ovariens qui permettrait de maintenir la structure et l'activité de ces tissus pendant une durée suffisante pour en étudier la réponse fonctionnelle.

Il s'agissait dans un premier temps de rechercher les conditions idéales en terme de technique de culture.

Une étude de quelques facteurs a ensuite été réalisée afin d'observer leur influence sur les cultures. Ces facteurs sont : la température de transport des ovaires, l'adjonction de sérum au milieu de culture et le nombre de follicules par chambre.

Une approche de l'effet de la FSH a également été réalisée.

Ce travail se divise en différents chapitres. Dans un premier temps, il a été nécessaire de réaliser une étude bibliographique pour synthétiser les informations sur l'histologie de l'ovaire et des follicules, la gamétogenèse et la stéroïdogénèse. Le chapitre suivant est réservé à la description du plan expérimental et des techniques utilisées. Dans les troisième et quatrième chapitres nous exposerons et discuterons les résultats pour enfin tirer les conclusions.

CHAPITRE I: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.

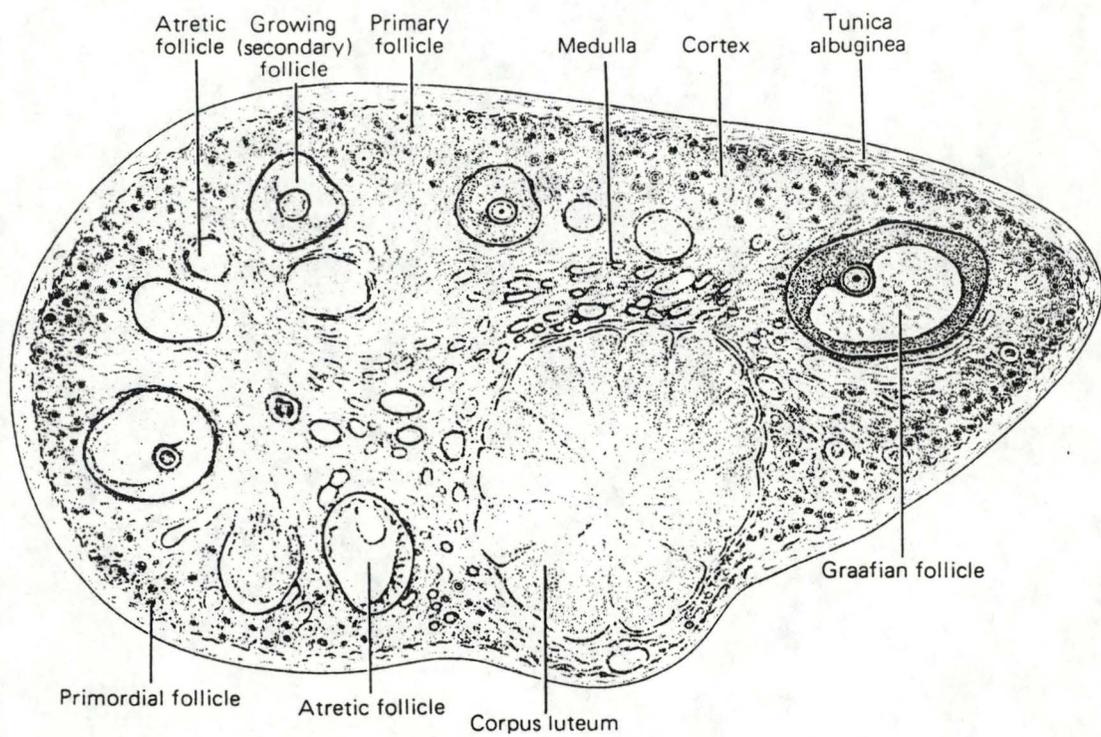


FIGURE 1 : Schéma d'un ovaire de femme adulte (Junqueira et al., 1986).

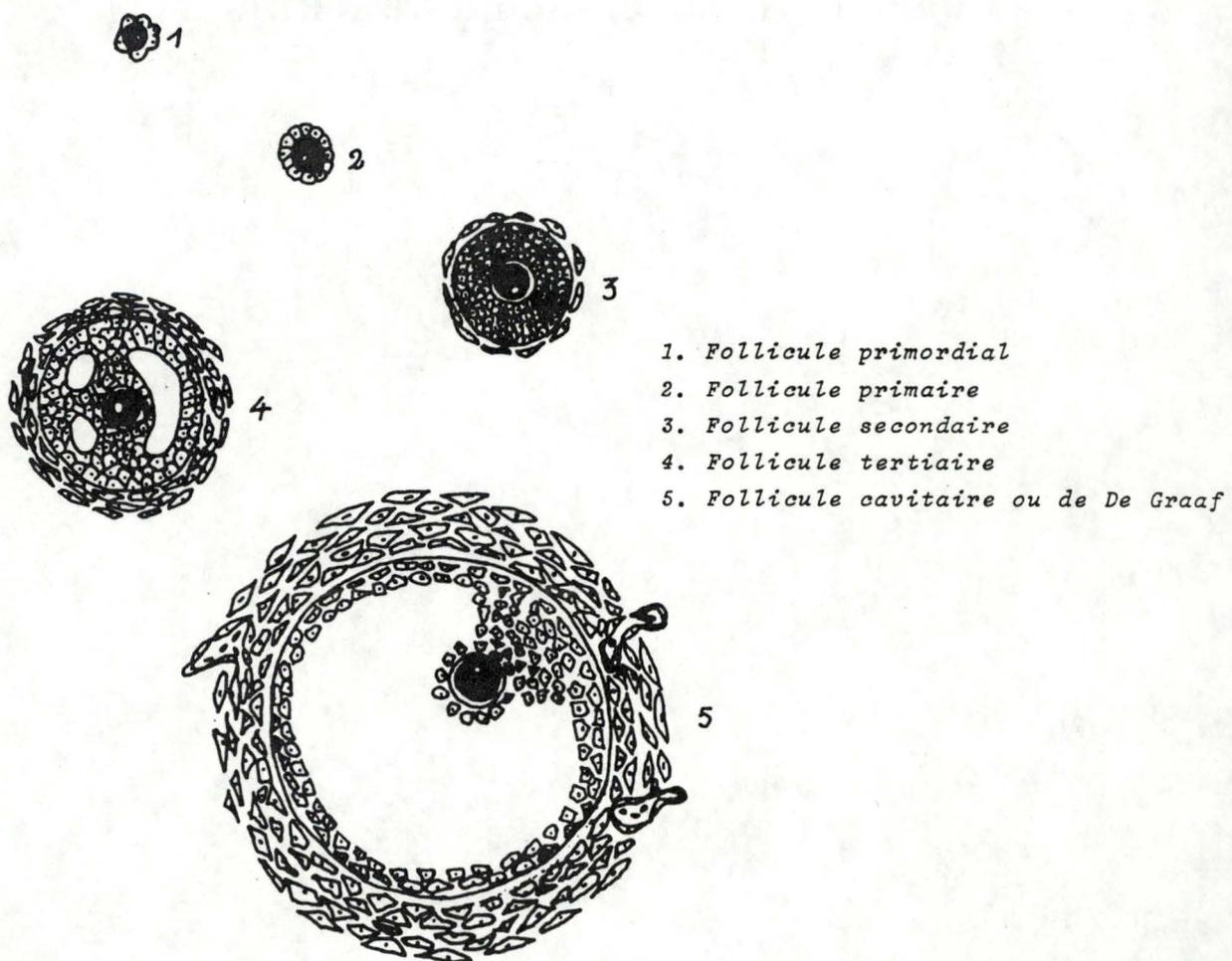


FIGURE 2 : Schéma des différents stades folliculaires (Derivaux et Ectors, 1986).

1. DESCRIPTION HISTOLOGIQUE.

1.1. OVAIRE.

Chez la plupart des espèces, 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 pour un poids de 3 à 15 gr chez la femme, la brebis et la vache. Chez la jument il peut atteindre 6 cm de long et peser 70 gr. Chez les espèces prolifiques tels que la truie et la lapine, l'ovaire peut avoir une forme de grappe en raison des nombreux follicules qui font protrusion à sa surface (Bister, 1989).

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

La médulla est un tissu conjonctif à distribution cellulaire lâche, contenant de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques, ainsi que des fibres nerveuses.

Le cortex contient les follicules et son stroma est constitué de cellules fibroblastiques fusiformes peu différenciées.

La tunica albuginée est un tissu conjonctif fibreux qui entoure le cortex. Elle est recouverte par un épithélium pavimenteux ou cubique simple (Junqueira et al., 1986).

1.2. FOLLICULES EN MATURATION.

Les follicules en développement passent par différents stades (figure 2). Classiquement on distingue les follicules primordiaux, primaires, secondaires, tertiaires et antraux. Très peu de follicules atteignent l'ovulation et on estime que plus de 99% subissent l'atréxie. Celle-ci se produit à n'importe quel stade de développement (Bister, 1989).

Le follicule primordial est constitué d'un ovocyte I entouré par une seule couche de cellules granulosales aplaties.

Dans le follicule primaire l'ovocyte augmente de diamètre et est entouré d'une seule couche de cellules granulosales qui prennent une forme cubique. La zone pellucide se forme.

Dans le follicule secondaire; les cellules granulosales se multiplient par mitoses et forment une couche pluristratifiée entourant l'ovocyte: la granulosa. De nombreuses gap junctions et tight junctions existent entre ces cellules. L'ovocyte présente alors des

microvilli qui pénètrent dans la zone pellucide; les cellules de la granulosa forment des prolongements qui traversent cette zone pellucide et entrent en contact avec l'ovocyte via des gap junctions. Des cellules venant du stroma s'agencent autour de la granulosa et constitueront la future thèque.

Le follicule tertiaire possède deux thèques bien différenciées. La thèque interne est constituée de cellules cubiques, bien différenciées possédant les caractéristiques de cellules productrices de stéroïdes. La thèque externe consiste plutôt en un tissu conjonctif. Elle est traversée par des vaisseaux sanguins qui forment un réseau capillaire dans la thèque interne. La granulosa ne possède aucun vaisseau à ce stade de développement.

Le follicule antral est caractérisé par l'apparition de cavités dans la granulosa. Celles-ci sont remplies de liquide folliculaire sécrété par les cellules de la granulosa. Elles fusionnent pour former l'antrum. Avec l'accroissement en volume de l'antrum se forme une proéminence dans la cavité: le cumulus oophorus qui contient l'ovocyte entouré de cellules de la granulosa qui forment la corona radiata. A ce stade, le follicule est appelé follicule de De Graaf ou follicule préovulatoire (Erikson et al., 1985; Junqueira et al., 1986; Bister, 1989).

1.3. FOLLICULE ATRÉTIQUE.

La plupart des follicules subissent un processus de dégénérescence: l'atrésie. Lors de celle-ci, les cellules du follicule et l'ovocyte meurent et sont éliminés par les cellules phagocytaires. L'atrésie est caractérisée par un arrêt des mitoses dans les cellules de la granulosa, un détachement de la granulosa de la membrane basale, une dissociation des cellules de la granulosa, la présence de noyaux picnotiques dans ces cellules et la mort de l'ovocyte (Erikson et al., 1985 ; Junqueira et al., 1986).

2. GAMETOGENESE.

Le stock gamétique femelle existe dès la naissance et il n'y a plus formation de nouvelles cellules sexuelles dans l'ovaire adulte.

Ce stock est important et variable suivant les espèces ; de 100.000 à 200.000 cellules chez la vache, 100.000 chez la chienne, 200.000 à 400.000 chez la femme et chez la brebis. De ce stock, seul un faible pourcentage parviendra à maturité et ovulation ; les autres subiront l'atrésie à différents moments de leur développement (Derivaux et Ectors , 1986).

2.1. OVOGENESE.

Les cellules primordiales de la lignée germinale des mammifères proviennent de l'ectoblaste et se développent dans la paroi du sac embryonnaire. Tôt dans la vie de l'embryon, ces cellules migrent dans les gonades en développement (Gardner et al., 1985 : cités par Brännström , 1989).

Pendant leur migration , ces cellules ont une activité mitotique qui continue pendant le processus de colonisation des gonades. Dans les gonades, les cellules se transforment et passent de leur forme amœboïde à une forme sphérique. Elles sont dès lors appelées ovogonies (Tam et Snow, 1981: cités par Brännström et al.,1988 ; Plachot, 1989).

Le stade ovogonial est caractérisé par une grande activité mitotique conduisant à un accroissement du nombre des cellules. Chez certaines espèces, ce stade n'a lieu que pendant la vie foetale (femme, rat, brebis) tandis que chez d'autres il peut se prolonger jusqu'en période néonatale (chat, hamster; Peters et McNatty, 1980).

Sous l'action de substances inductrices, les cellules germinales entreprennent la méiose (Andersen et al., 1981). L'enclenchement de celle-ci marque la transition du stade ovogonie au stade ovocyte.

Un arrêt temporaire de la méiose se produit au stade diplotène de la première division méiotique. La méiose ne reprendra qu'au moment de la maturation de l'oocyte (Thibault et al., 1987).

Les mécanismes responsables de cet arrêt de la méiose seront explicités ultérieurement.

2.2. FOLLICULOGENESE.

Le follicule préovulatoire est issu de la population de follicules primordiaux, localisée dans le cortex externe de l'ovaire.

Les premiers signes de la croissance d'un follicule primordial en follicule préantral sont un accroissement du volume de l'ovocyte, la formation de la zone pellucide, et une transformation des cellules de la granulosa d'une forme aplatie en une forme cubique. Les cellules de la granulosa se divisent activement et se disposent en plusieurs couches autour de l'ovocyte. Le stroma ovarien entourant le follicule s'organise pour former la thèque. Au départ les cellules de la thèque ne sont pas différenciables des fibroblastes mais très tôt une partie des cellules se différencie en une thèque interne constituée de cellules productrices de stéroïdes et l'autre partie en une thèque externe constituée de cellules à aspect fibroblastique (Brännström, 1988).

Diverses expériences (McNeilly et al., 1986 ; Driancourt et al., 1987) ont permis de différencier deux types de folliculogénèse, l'une basale et l'autre tonique. Cette différenciation se fait pour des follicules au seuil de deux millimètres de diamètre et se base sur la disproportion entre le temps pris par un follicule pour atteindre deux millimètres de diamètre (temps estimé à 6 mois chez la brebis) et le temps mis pour passer de deux millimètres à une taille préovulatoire comprise entre cinq et douze millimètres (temps estimé à 6 jours chez la brebis; Cahill et Mauléon, 1980).

La folliculogénèse basale est contrôlée par des mécanismes mal connus. Un mécanisme endocrinien est probablement impliqué dans le déclenchement de la croissance folliculaire mais c'est surtout un contrôle paracrine qui semble inhiber la différenciation de certains follicules et stimuler le développement d'autres.

La folliculogénèse tonique est soumise à un contrôle hormonal à action brève et immédiate de la part des gonadotropines et est strictement dépendante de celles-ci. La folliculogénèse tonique est encore appelée croissance folliculaire terminale (Driancourt et Cahill, 1984). Elle concerne les follicules à antrum qui ont atteint deux millimètres de diamètre.

L'accroissement du diamètre d'un follicule résulte principalement de deux phénomènes: l'augmentation du nombre de cellules de la granulosa et l'accumulation de fluide folliculaire dans l'antrum.

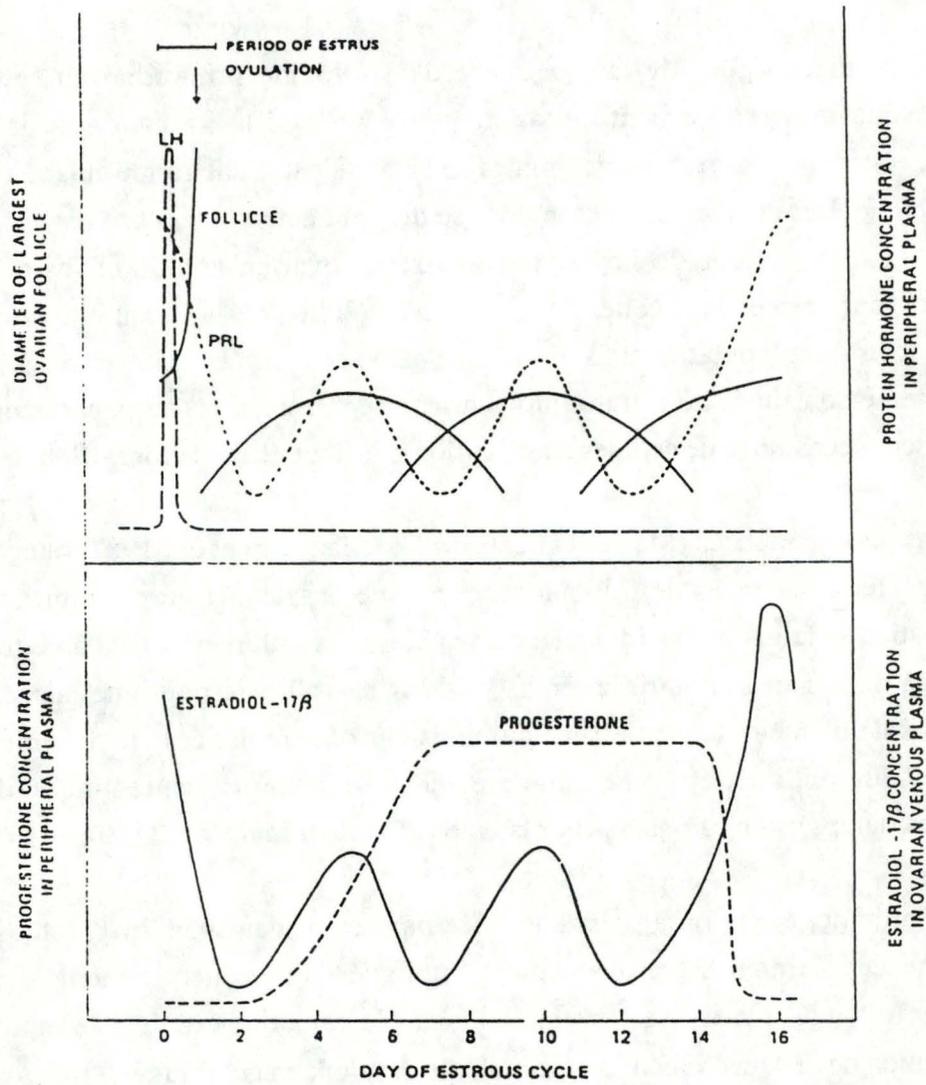


FIGURE 3 : Evolutions hormonales au cours du cycle oestral chez la brebis (Robertson, 1977).

Les cellules de la granulosa ont un pouvoir mitotique élevé conduisant à un accroissement exponentiel du nombre de cellules. Ce pouvoir diminue une fois le diamètre d'un millimètre atteint et la croissance folliculaire est dès lors surtout due à l'augmentation du volume de l'antrum (Cahill, 1984).

Les cellules de la thèque se divisent activement dans les follicules ayant une taille comprise entre 0,4 et 1 millimètre. En dessous de 0,4 mm le nombre de mitoses est faible et au delà de 1 mm il diminue fortement (Jacques, 1989).

2.3. CINÉTIQUE DE LA CROISSANCE FOLLICULAIRE TERMINALE.

Chez la brebis, le cycle, qui a une durée d'environ 17 jours, comporte deux phases (figure 3). Une phase lutéale qui est caractérisée par une sécrétion importante de progestérone par le corps jaune et qui se termine par la chute de cette sécrétion suite à la lutéolyse, et une phase folliculaire qui présente une sécrétion plus importante d'oestradiol et qui se termine par l'ovulation de un ou plusieurs follicules (Robertson, 1977).

Au cours du cycle on peut observer trois vagues de croissance folliculaire qui durent chacune environ six jours. Deux vagues sont observables pendant la phase lutéale. La troisième a lieu pendant la phase folliculaire (Bister et Paquay, 1983). Les follicules se développant pendant la phase lutéale subissent l'atrésie et seul ceux de la phase folliculaire peuvent évoluer jusqu'à l'ovulation. Ces vagues de croissance sont à mettre en relation avec la sécrétion de l'oestradiol plasmatique qui se fait aussi sous forme de trois vagues au cours du cycle (Bister, 1980). L'oestradiol est sécrétée par les plus gros follicules.

Pendant la phase lutéale, les follicules peuvent atteindre quatre à sept millimètres, montrant que des follicules peuvent se développer jusqu'à une taille préovulatoire en présence de concentrations hormonales différentes de celles que l'on trouve lors de la phase folliculaire (Jacques, 1989).

De nombreux auteurs ont également montré qu'il existe une croissance folliculaire en anoestrus comparable à celle observée en oestrus, se réalisant aussi sous forme de vagues (Kammerlade et al., 1952; McNatty et al., 1984; Webb et Gauld, 1985, 1987: cités par Jacques, 1989; Jacques, 1989). Cependant, aucun follicule n'atteint l'ovulation pendant l'anoestrus.

2.4. RECRUTEMENT, SÉLECTION, DOMINANCE.

Des follicules issus du pool de follicules primordiaux entament la phase de croissance rapide. Le développement de ces follicules candidats pour l'ovulation est appelé recrutement.

Des follicules recrutés, seul un nombre déterminé par le quota ovulatoire de l'espèce poursuivent leur développement; les autres dégènèrent. Ce processus est appelé sélection et les follicules sélectionnés sont appelés dominants (Driancourt et al., 1984). Parmi ces follicules dominants, ceux qui se développent après la lutéolyse ont des chances d'aboutir à l'ovulation. Tous les autres, qui se développent pendant la période d'anoestrus ou pendant la phase lutéale, sont voués à l'atrésie.

2.4.1. Recrutement.

Divers résultats expérimentaux suggèrent que les follicules recrutables sont ceux qui ont atteint la taille de deux millimètres de diamètre. Des marquages à l'encre de Chine de follicules ont montré que ceux qui ovulent doivent avoir au moins 2 mm de diamètre au moment de la lutéolyse (Driancourt et al., 1984 : cités par Driancourt et al., 1984). De plus, la cautérisation de tous les follicules de diamètre égal ou supérieur à 2 mm entraîne un retard de l'ovulation (Tsonis et al., 1984).

Le moment du recrutement du ou des follicules qui arrivent à l'ovulation a été estimé par plusieurs auteurs (Acritopoulou et al., 1977 ; Driancourt et Cahill, 1984 ; Tsonis et al., 1984); il doit avoir lieu au plus tard 48 heures avant le pic de LH, ce qui correspond au moment de la lutéolyse.

La LH est l'hormone principale qui agit sur le recrutement des follicules (McNatty et al., 1981) , mais ceux-ci doivent préalablement être imprégnés avec de la FSH pour répondre à la LH. En effet , chez la brebis Ile-de-France, une injection de LH seule ne peut induire l'ovulation pendant l'anoestrus profond ; une séquence FSH puis LH est, par contre, efficace (Oussaid, 1982).

2.4.2. Sélection du follicule dominant.

Les follicules recrutés sécrètent une quantité accrue d'oestrogènes et d'inhibine. La plus grande partie de l'oestradiol sécrétée est d'ailleurs attribuée au follicule dominant (Webb and England, 1982).

2.5.2. Rôles de la LH.

Le rôle de la LH est de promouvoir la maturation folliculaire, l'expulsion de l'ovocyte et la formation du corps jaune fonctionnel (McNatty et al., 1981). Au niveau de la croissance folliculaire, la LH entraîne un blocage de l'activité mitotique et une inhibition de la production d'oestradiol, deux causes de l'atrésie et de la formation du corps jaune (Bister, 1982).

2.5.3. Rôles de l'oestradiol.

L'oestradiol peut agir en synergie avec les gonadotropines pour augmenter le poids ovarien, induire la prolifération des cellules de la granulosa, induire la croissance des follicules préantraux et la formation de l'antrum (Goldenberg et al., 1972 : cités par Tonetta and DiZerega, 1989).

Cette hormone augmente également la sensibilité du follicule aux stimulations des gonadotropines. Elle peut augmenter le nombre de ses propres récepteurs sur les cellules de la granulosa (Richards, 1975 : cité par Tonetta and DiZerega, 1989) ainsi que sa production en stimulant l'activité aromatasé-synthétase (Zhuang et al., 1982 : cités par Tonetta and DiZerega, 1989).

L'oestradiol, sécrété pour sa plus grande part par le follicule dominant, possède pendant la majeure partie du cycle un effet de feed-back négatif sur la sécrétion de GnRH et des gonadotropines, LH et FSH. Après la lutéolyse, le taux plasmatique d'oestradiol augmente, ce qui confère alors à cette hormone un effet de feed-back positif sur l'hypothalamus et l'hypophyse; ceci stimule la sécrétion de GnRH et des hormones gonadotropes, et provoque le pic préovulatoire de LH et de FSH. L'augmentation de la concentration plasmatique en gonadotropines stimule la production d'oestradiol qui à son tour augmente sa propre production. L'oestradiol intervient donc dans deux boucles de feed-back positif, une au niveau de l'hypothalamus et une au niveau de l'ovaire, pour assurer le maintien du follicule dominant et provoquer l'ovulation (Bister, 1989 ; Tonetta and DiZerega, 1989).

2.5.4. Rôles de la progestérone.

La progestérone inhibe la sécrétion aux niveaux hypothalamique (GnRH) et hypophysaire (LH, FSH). Elle empêche la maturation folliculaire et maintient la sécrétion d'oestradiol dans certaines limites (Bister, 1989).

2.5.5. Rôles des androgènes.

Bien que les androgènes (testostérone et androstènedione principalement) soient associés à l'atrésie, ils jouent aussi un rôle dans le développement folliculaire préovulatoire.

Ils peuvent augmenter l'activité aromatasynthétase induite par la FSH dans les cellules de la granulosa et par là stimuler la synthèse d'oestradiol (Hillier and De Zwart, 1981 : cités par Tonetta and DiZerega 1989).

Les androgènes peuvent également stimuler la synthèse de progestérone par les cellules de la granulosa ainsi qu'augmenter la réponse de ces cellules à la LH, ce qui est mis en évidence par une production accrue de progestérone et d'AMPc (Tonetta and DiZerega, 1989).

L'atrésie des follicules est associée à une augmentation des teneurs intrafolliculaires en androgènes. Ceci peut être le résultat d'une perte d'activité aromatasynthétase mais aussi une cause de l'atrésie puisque l'immunisation contre l'androstènedione permet d'augmenter le nombre de follicules qui atteignent l'ovulation et la fécondité des brebis (Van Look et al, 1978; Geldar et al, 1984; Bister et al, 1988 A,B).

2.5.6. Contrôle paracrine.

De nombreux composés ont été isolés du fluide folliculaire, mais leurs fonctions et la régulation de leur sécrétion ne sont pas encore bien connues. Philippon (1988) a recensé une vingtaine de facteurs de nature protéique capables de contrôler l'activité des follicules. Certains d'entre eux ne sont peut-être qu'une seule et même molécule. Inversement, de nouvelles molécules actives sont découvertes régulièrement.

Certains facteurs semblent spécifiques aux follicules, d'autres sont des facteurs de croissance dont on connaît un rôle dans de nombreux tissus.

2.5.6.1. Facteurs protéiques spécifiques.

L'inhibiteur de la lutéinisation (LI) se trouve en grande quantité dans les petits follicules et empêche la lutéinisation de ceux-ci, comme le montre son action inhibitrice sur la synthèse de progestérone. Les gros follicules contiendraient un stimulateur de la lutéinisation (LS) et (ou) de plus faibles concentrations en inhibiteur.

L'ocytocine, sécrétée par la neurohypophyse, la granulosa ou le corps jaune, semble avoir une action régulatrice sur la sécrétion de progestérone par le corps jaune. Cette action peut varier avec l'âge du corps jaune.

L'inhibine, sécrétée par la granulosa, a une action inhibitrice sur la sécrétion de FSH (Bicsak et al., 1986).

L'activine semble avoir une action opposée à celle de l'inhibine. Elle possède certaines homologues de structure (sous-unités) avec l'inhibine et le Transforming Growth Factor (TGF β).

La follistatine peut, comme l'inhibine, inhiber la synthèse de FSH.

La synthèse de FSH par l'hypophyse serait de ce fait aussi bien régulée par la GnRH hypothalamique que par des facteurs stéroïdiens ou non stéroïdiens de l'ovaire.

L'arginine vasopressine pourrait avoir un rôle dans la prévention de l'atrésie en maintenant un taux contrôlé d'androgènes (Tonetta and DiZerega, 1989).

2.5.6.2. Facteurs de croissance.

Insuline-like Growth Factors (IGF-I et II).

L'IGF-I est produit par les cellules de la granulosa. Son émission est stimulée par l'AMPC et par toute substance induisant la production de celui-ci tel que LH, FSH et oestradiol, (Hartshorne, 1988). Il augmente la production d'AMPC et exerce donc un feed-back positif sur sa propre production. Il stimule la voie biochimique de la synthèse de la progestérone en plusieurs endroits. Il stimule également la production d'inhibine par les cellules granulosaires.

Il potentialise l'action de la FSH sur la différenciation cellulaire de la granulosa, c'est-à-dire la production d'oestradiol et de progestérone (Jacques, 1989).

L'IGF-II augmente la production de progestérone via ses propres récepteurs ou via ceux à l'IGF-I.

Les IGF-I et II sont impliqués dans la maturation ovocytaire car ils accélèrent la maturation méiotique des ovocytes chez le rat (Feng et al., 1988).

Fibroblast Growth Factor (FGF).

Le FGF est produit par les cellules de la granulosa et a une action sur la prolifération de celles-ci.

En diminuant le nombre de récepteurs à la LH et en diminuant l'aromatase, il s'oppose à une différenciation trop rapide et trop poussée des cellules de la granulosa, et permet ainsi la méiose de l'ovocyte.

Il stimule la vascularisation des follicules au moment de leur maturation.

Au moment de l'ovulation, il stimule la production de progestérone, de collagénase et de l'activateur du plasminogène, favorisant ainsi l'ovulation.

Epidermal Growth Factor (EGF).

L'EGF, en présence de FSH, diminue l'activité de l'aromatase, donc la production d'oestradiol, et stimule la production de progestérone, favorisant de ce fait l'atrésie (Franchimont et al., 1986 ; Skinner et al., 1987).

Il augmente le nombre de récepteurs pour la FSH mais diminue leur affinité (Hartshorne, 1988).

L'EGF peut donc participer à la régulation du fonctionnement et de la croissance de la granulosa ainsi qu'à sa différenciation terminale .

En réponse à la FSH, il diminue le nombre de récepteurs pour la LH, probablement par perte accélérée de ces récepteurs (Skinner et al., 1987).

Transforming Growth Factor α (TGF α).

Le TGF α est, quant à sa structure et à son fonctionnement, similaire à l'EGF, et les faibles concentrations circulantes en EGF laisseraient supposer que le TGF α est in vivo responsable de l'effet traditionnellement attribué à l'EGF (Skinner and Goffey, 1988).

In vitro, la présence continue d'EGF retarde la différenciation terminale et augmente la période de multiplication de cellules de la granulosa provenant de petits et de moyens follicules mais pas de gros (Gasparowicz et al., 1978). Cette capacité

régulatrice est inhérente à son effet sur l'émission des oestrogènes et de la progestérone (Skinner et al., 1987).

Transforming Growth Factor β (TGF β).

Le TGF β augmente l'activité aromatisique modulée par la FSH au niveau de la granulosa, diminue de ce fait l'atrésie et stimule l'effet de dominance ainsi que le taux d'ovulation. De plus, il amplifie les effets de la FSH, probablement en augmentant la synthèse et la libération de celle-ci au niveau de l'hypophyse (Franchimont et al., 1986).

Il augmente le nombre de récepteurs à la LH et stimule ainsi la synthèse de progestérone (Hartshorne, 1988).

Il est in vitro, ainsi que d'autres facteurs de croissance, un puissant stimulateur de la maturation ovocytaire; chez le rat, il accélère cette maturation en absence d'inhibiteurs comme l'AMPc ou l'hypoxanthine.

Par contre, il diminue les effets positifs que possède l'EGF (Epidermal Growth Factor) sur la croissance de la granulosa. L'affinité des récepteurs à l'EGF peut être en effet régulée par des hormones (gonadotropes ou autres) et par des facteurs de croissance comme le TGF β ou l'EGF lui-même (Skinner et al., 1987).

Chez le porc, la diminution de l'activité de l'EGF est due à sa production plus faible par les cellules de la granulosa sous l'action de ce TGF β . Par contre, celui-ci stimule la production de l'IGF-I (Insulin-like Growth Factor-1) chez ces même cellules (Mondschein et al., 1988).

Selon le contexte hormonal, le TGF β peut stimuler légèrement ou inhiber fortement la prolifération granulosaire chez le porc (May et al., 1988).

2.6. MATURATION DE L' OVOCYTE.

Au moment du pic préovulatoire de LH, l'ovocyte qui était jusque là bloqué au stade diplotène de la première prophase méiotique, poursuit sa méiose. Parallèlement à cette maturation nucléaire il se produit une maturation cytoplasmique de l'ovocyte.

Les cellules de la granulosa et du cumulus jouent un rôle dans l' inhibition et la reprise de la méiose, et dans la maturation cytoplasmique. La maturation de l' ovocyte et des cellules du cumulus est nécessaire pour qu' il atteigne un stade où il sera fertilisable (Thibault et al., 1987 ; Brännström, 1987 ; Jacques, 1989).

L'ovulation se produit une fois la maturation terminée.

2.6.1. Maturation nucléaire.

L'ovocyte devient compétent, c'est-à-dire apte à poursuivre la méiose, quand il a atteint 80% de sa taille finale, soit au moment de la formation de l'antrum.

Des études *in vitro* ont montré que des contacts membranaires entre l'ovocyte et les cellules du cumulus sont nécessaires à la croissance et à la maturation de l'ovocyte (Buccione et al., 1987).

Les cellules de la granulosa sécrètent des facteurs qui, tout d'abord inhibent la croissance de l'ovocyte. Ensuite, lorsque les cellules du follicule commencent à se diviser elles stimulent au contraire cette croissance de l'ovocyte. Finalement, lorsque l'ovocyte devient compétent, les cellules folliculaires exercent un effet inhibiteur sur la reprise de la méiose, jusqu'à ce qu'un stimulus adéquat déclenche la reprise de celle-ci (Thibault et al., 1987).

2.6.1.1. Facteurs inhibant la méiose.

In vivo, les ovocytes compétents ne reprennent pas la méiose avant le pic de LH. Cependant, les mêmes ovocytes, cultivés *in vitro*, avec ou sans les cellules du cumulus, reprennent spontanément la méiose (Thibault, 1977).

Ces constatations montrent que les cellules de la granulosa sont responsables de l'arrêt de la méiose.

Ces cellules sécrètent des inhibiteurs qui sont de trois types (Fulka et al., 1989 ; Jacques, 1989):

- un ou plusieurs peptides appelés OMI;
- l' AMPc;
- un ou plusieurs nucléosides puriques.

Il est admis que le maintien d'une concentration élevée en AMPc dans l'ovocyte est nécessaire au maintien de l'arrêt de la méiose. Le pic préovulatoire de LH qui entraîne une diminution du taux d'AMPc dans l'ovocyte permet la poursuite de la méiose (Brännström, 1988). L'AMPc contrôle également la dissolution de la membrane nucléaire (Thibault et al., 1987).

L'ovocyte possède une adénylate cyclase qui dans les follicules immatures produit de grandes quantités d'AMPc mais dont l'activité diminue avec la maturation du

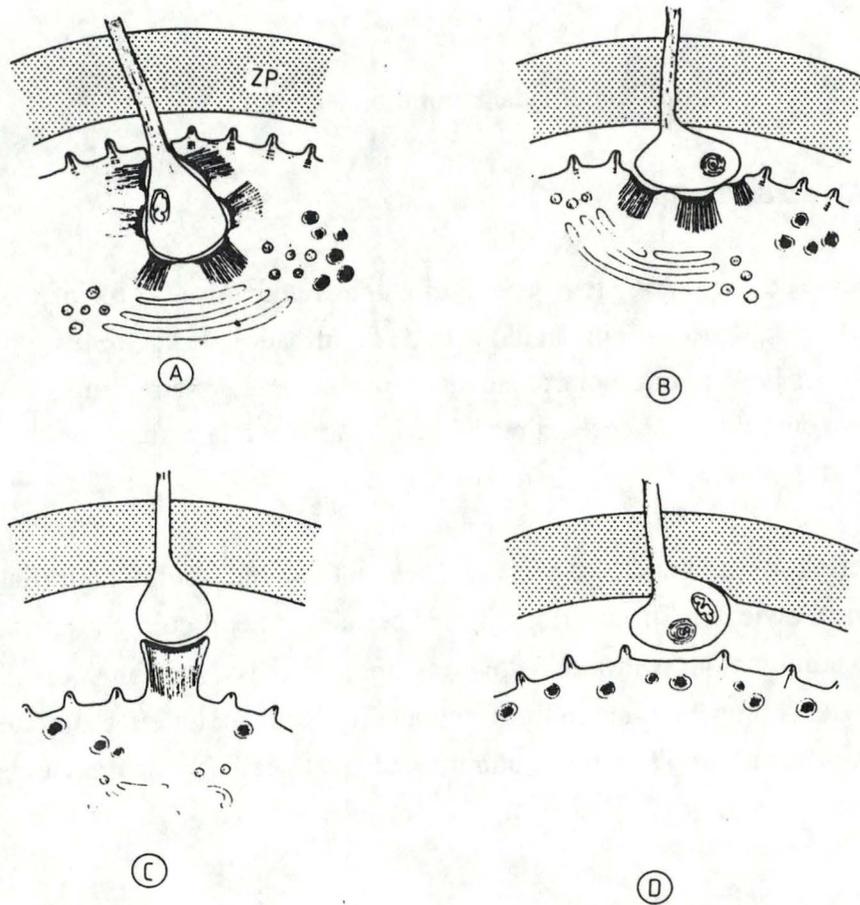


FIGURE 4 : Représentation schématique de l'évolution des jonctions entre ovocyte et cellules du cumulus pendant la maturation ovocytaire chez certains mammifères (Thibault et al., 1987).

- A: gaps junctions et jonctions intermédiaires chez le follicule préovulatoire.
- B: après 5 à 7 h de culture avec des gonadotropines, les prolongements cellulaire sont en partie extériorisés, mais les deux types de jonction subsistent.
- C: lorsque les cellules du cumulus retirent leur prolongements de l'ovocyte, les jonctions intermédiaires qui subsistent, entraînent des déformations de l'ovocyte.
- D: les jonctions disparaissent en même temps que la membrane nucléaire se dissout.

follicule pour disparaître dans le follicule mûr (Thibault et al., 1987). L'ovocyte possède également une phosphodiesterase qui peut, en quelques minutes ramener le taux d'AMPC à un niveau basal.

L'AMPC peut également être fourni à l'ovocyte par les cellules du cumulus au travers des gap junctions qui existent entre ces deux types de cellules (Tonetta and Di Zerega, 1989; figure 4).

Sous l'action des hormones gonadotropes, ces jonctions disparaissent. La reprise de la méiose suit généralement la disparition de ces liaisons. Cependant, des expériences ont montré que chez la souris, le hamster, le mouton et le porc, le découplage entre ces cellules se fait de 3 à 9 heures après la reprise de la méiose (Thibault et al., 1987).

L'AMPC n'est pas le seul inhibiteur de la reprise de la méiose. En maintenant artificiellement des niveaux élevés d'AMPC dans des ovocytes compétents, on observe une condensation des chromosomes mais pas une dissolution de la membrane nucléaire (qui est AMPC dépendante). Il existe donc d'autres inhibiteurs de la reprise de la méiose en plus de l'AMPC puisqu'il ne peut à lui seul inhiber totalement la reprise de la méiose.

Des molécules extraites du fluide folliculaire, appelées OMI ont certainement un rôle important dans l'inhibition de la méiose.

Ces inhibiteurs sont synthétisés par les cellules de la granulosa sous forme de pro-inhibiteurs (pro-OMI), qui passent par des gap-junctions dans les cellules du cumulus où ils sont transformés en leur formes actives. Ces OMI actifs passent dans l'ovocyte où ils exerceront leur action inhibitrice.

Au moment de la reprise de la maturation de l'ovocyte (Thibault et al., 1987), la LH et la FSH pourraient agir à 4 niveaux pour supprimer les effets de ces substances (figures 5):

- 1) en bloquant leur synthèse ;
- 2) en dissociant les cellule du cumulus et de la granulosa ;
- 3) en bloquant la transformation des pro-inhibiteurs en leur forme active;
- 4) en dissociant les cellules du cumulus de l'ovocyte.

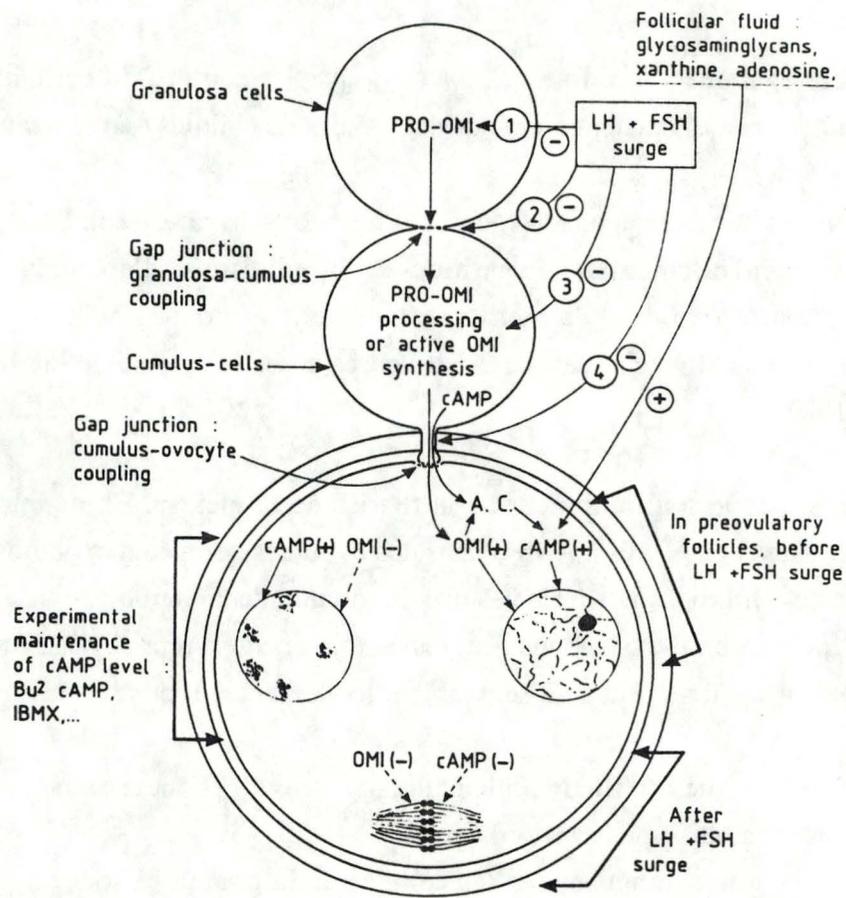


FIGURE 5 : Modes d'action possibles de la LH et de la FSH lors de la maturation de l'ovocyte. Voir dans le texte pour les explications (Thibault et al., 1987).

Les nucléosides puriques ne sont probablement pas des inhibiteurs principaux de la reprise de la méiose. Ils seraient capables de moduler l'activité de la phosphodiesterase (Thibault et al., 1987).

2.6.1.2. Facteurs induisant la reprise de la méiose.

Les ovocytes de xénopes ne reprennent jamais spontanément la méiose, une fois sortis de leur follicules; ils ont donc besoin d'un signal positif.

In vitro, la méiose peut-être induite par de la progestérone, de l'insuline ou le produit de l'oncogène "ras 21".

La progestérone agit en bloquant l'adénylate cyclase responsable de la production de l'AMPc. L'insuline et la protéine ras 21 agissent par l'intermédiaire de la protéine kinase C.

Les résultats sont une chute du taux d'AMPc levant l'inhibition de la méiose et une cascade de phosphorylations des protéines conduisant à la synthèse d'un facteurs, le MPF (maturation promoting factor; Fulka et al, 1989). Ces auteurs ont montrés que le MPF existe aussi chez les mammifères.

2.6.1.3. Causes de la reprise de la méiose.

Les explications qui viennent d'être fournies montrent que deux hypothèses sont en présence pour expliquer la reprise de la méiose.

Certains auteurs pensent que cette reprise est due au découplage des fonctions entre les cellules périovocytaires et l'ovocyte et que des facteurs pouvant induire la reprise existeraient (Fulka et al, 1989).

D'autre auteurs pensent au contraire que la reprise de la méiose est due à la disparition des inhibiteurs (OMI, AMPc) et que le découplage se fait plus tard (Plachot; 1989).

2.6.2. maturation cytoplasmique.

Pendant la croissance, l'ovocyte accumule d'importantes réserves qui lui serviront ultérieurement pour réaliser la méiose et au-delà, pour permettre à l'oeuf fécondé de se développer.

Bien que l'ovocyte de mammifères soit considéré comme avitellin, il accumule des substances riches en énergie tel que du glycogène et des lipides (Thibault et al, 1987).

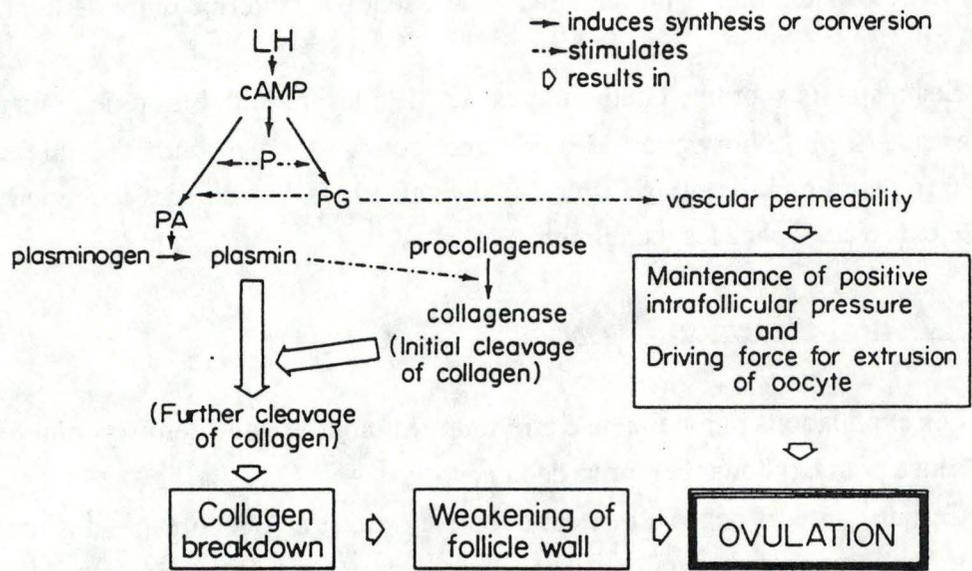


FIGURE 6 : Modèle simplifié du processus ovulatoire (Brännström, 1988).

L'oocyte synthétise du matériel génétique sous forme d'ARN messager. Cette production s'arrête au moment de la reprise de la méiose. Une partie de cet ARNm sert à la synthèse de protéines qui seront utilisées lors de la division méiotique. L'autre partie n'est utilisée que pendant le développement embryonnaire précoce. L'ARNm est stocké sous une forme non adénylée qui n'est traduite qu'après fécondation, moment à partir duquel elle peut-être adénylée (Bachvarova et Paynton, 1988, cités par Fulka et al, 1989).

Le début du développement embryonnaire pourrait ainsi être sous contrôle maternel, l'embryon ne devenant autonome que lorsque son propre matériel génétique peut s'exprimer.

Les mitochondries passent lors de la maturation folliculaire d'une forme à matrice dense et crêtes parallèles à la membrane mitochondriale externe, à une forme à matrice claire et crêtes perpendiculaires à la membrane mitochondriale externe (Thibault et al, 1987).

2.7. OVULATION.

2.7.1. Mécanismes hormonaux.

L'ovulation est un mécanisme contrôlé principalement par les hormones gonadotropes. L'hypophysectomie d'une brebis adulte a pour effet une réduction de la population et du taux de croissance folliculaire, ainsi qu'une inhibition de l'ovulation (Dufour et al, 1979). L'administration de gonadotropines exogènes (la PMSG est utilisée dans ce but) a un effet stimulateur sur l'ovaire et provoque chez les animaux ainsi traités une augmentation du taux d'ovulation (Callens et al, 1986; Noël, 1989).

La LH est considérée comme étant la substance principale de déclenchement de l'ovulation, tandis que l'émission concomitante de FSH semble être importante pour le recrutement des follicules du cycle suivant (Hoak et Schwartz, 1980: cités par Brännström, 1988).

2.7.2. Mécanismes biochimiques.

La LH agit en se liant à un récepteur spécifique présent sur la thèque interne et sur les cellules de la granulosa. Cette fixation active une adénylate cyclase (AC) et une phospholipase C (PLC; figure 6), qui déclenchent des cascades de phosphorylations et induisent ainsi la synthèse d'activateur du plasminogène (PA), de progestérone (P) et

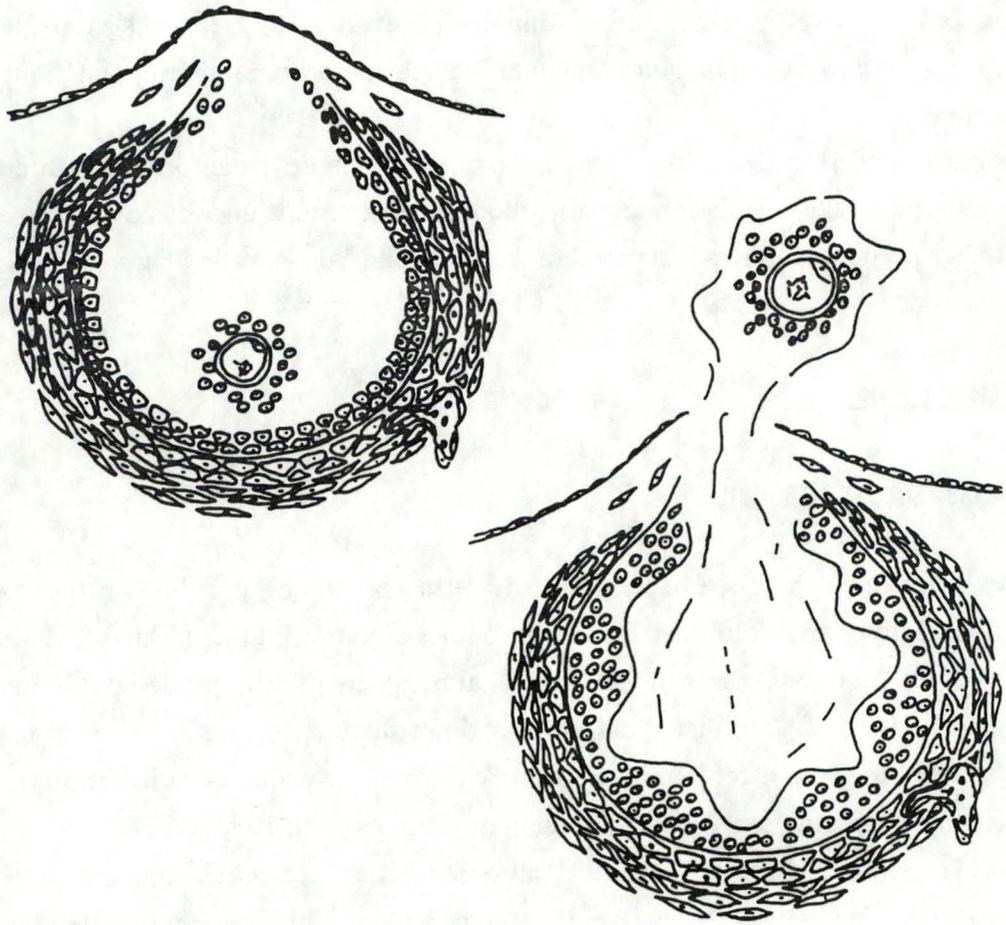


FIGURE 7 : Ovulation (Derivaux et Ectors, 1986).

de prostaglandines (PG). Le rôle essentiel de la progestérone est d'amplifier la synthèse de PA et de PG.

Le PA scinde le plasminogène en plasmine qui convertit la protocollagénase en collagénase . La collagénase et la plasmine dégradent le collagène et amincissent la paroi folliculaire.

Les PG augmentent la perméabilité vasculaire qui est importante pour le maintien d'une pression positive dans le follicule jusqu'au moment de l'ovulation, vu que la paroi devenue plus lâche peut permettre les pertes de liquides. La paroi devenue suffisamment fragile, se rompt et l'ovocyte entouré des cellules du cumulus est expulsé (figure 7; Derivaux et Ectors, 1986).

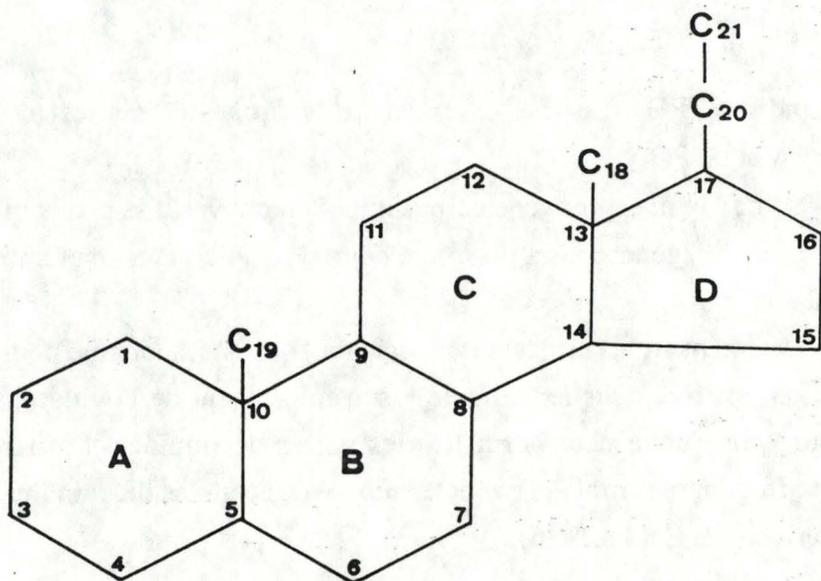


FIGURE 8 : Noyau cycloperhydropentanophénantrène (Derivaux et Ectors, 1986).

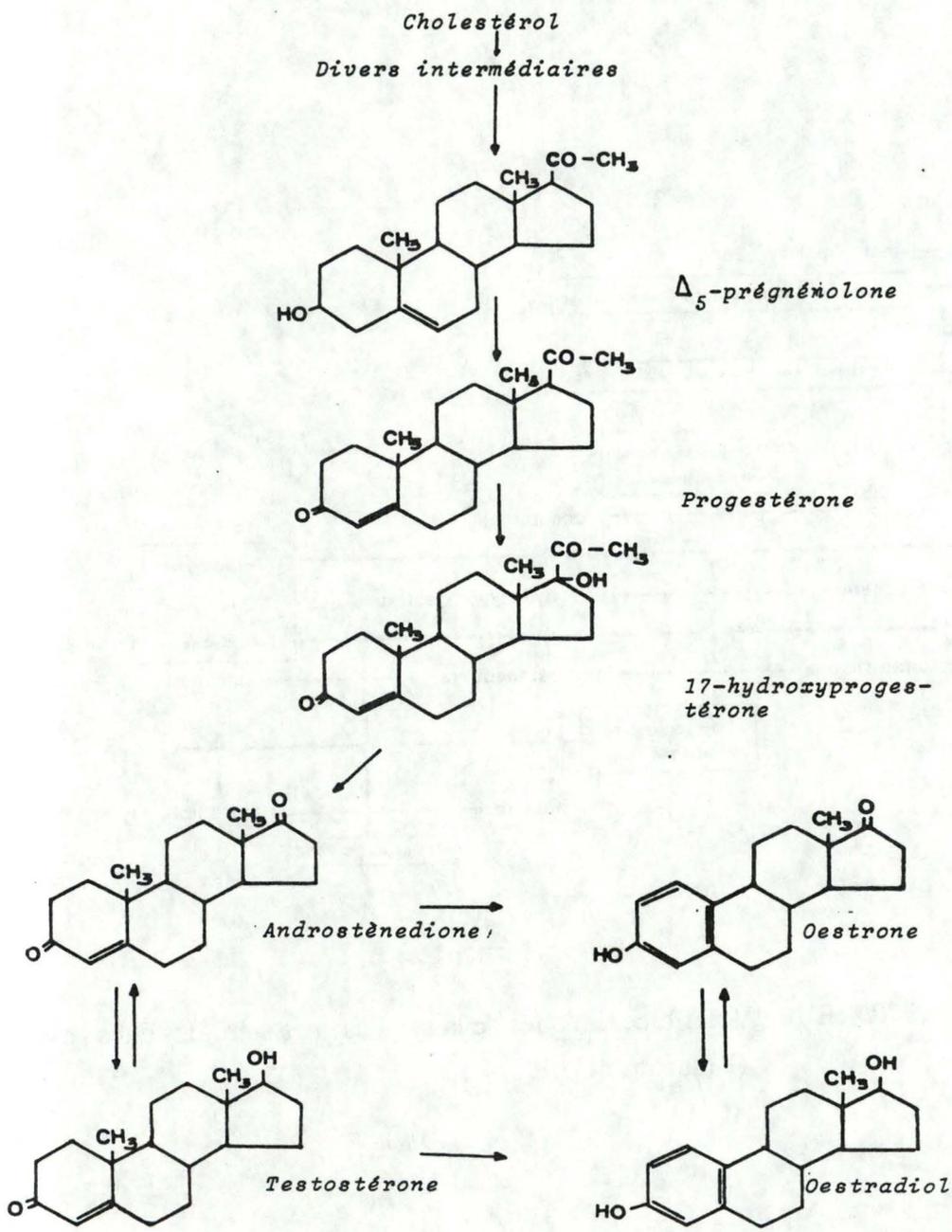


FIGURE 9 : Biosynthèse des stéroïdes dans l'ovaire (Derivaux et Ectors, 1986).

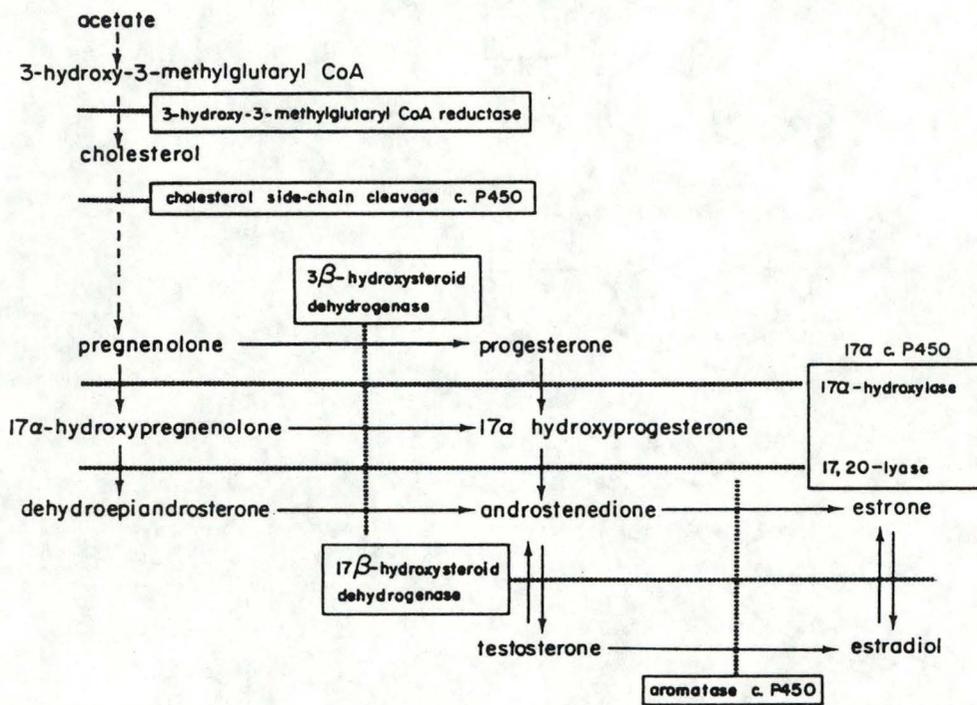


FIGURE 10 : Voies biochimiques de la synthèse des stéroïdes dans l'ovaire (Brännström, 1988).

3. STEROIDOGENESE.

Le cholestérol est la molécule de départ pour la synthèse des stéroïdes. Le cholestérol exogène apporté par l'alimentation est utilisé préférentiellement au cholestérol synthétisé de novo par la cellule. Avant l'ovulation, les cellules de la granulosa et le fluide folliculaire sont séparés du sang par la membrane basale qui est imperméable à des particules de poids moléculaire supérieur à 400 Kdaltons. Les VLDL (Very Low Density Lipoprotein) et LDL (Low Density Lipoprotein) qui ont un poids moléculaire supérieur à 400 Kdaltons ne passent donc pas la membrane basale; une partie des HDL (High Density Lipoprotein) qui peuvent avoir moins de 400 Kdaltons pourra traverser la membrane basale et sera utilisée pour la stéroïdogénèse. Après l'ovulation, il s'opère une vascularisation et une lutéinisation de la granulosa rendant toutes les lipoprotéines accessibles pour ces cellules. Avant la vascularisation, l'oestradiol (produit par les cellules de la granulosa) est synthétisé principalement à partir des androgènes provenant de la thèque. Après le pic de LH et avant la vascularisation, la production de progestérone peut dépendre de l'apport en HDL.

La régulation de la prise du cholestérol dans les tissus stéroïdogéniques se fait par les hormones trophiques, et ceci indépendamment du contenu cellulaire en cholestérol. L'oestradiol, la prolactine, l'insuline, l'insuline-like growth factor, la human Chorionic Gonadotropin (hCG), la LH et la FSH augmentent la prise de lipoprotéines et la stéroïdogénèse par les cellules de la granulosa et par le tissu lutéal. Cette régulation se fait via l'AMPC car un ajout de dibutyryl cAMP ou de 8-bromo cAMP à ces cellules en culture stimule également la stéroïdogénèse ainsi que la prise de lipoprotéines. Chez la vache, cette régulation se fait en augmentant l'affinité des récepteurs pour les lipoprotéines; chez la ratte, la truie, et aussi chez la femme, elle se fait en augmentant le nombre des récepteurs (Grummer and Carrol, 1988).

La structure de base des stéroïdes est représentée par le noyau cycloperhydrophénantrène dont le squelette est analogue à celui du cholestérol (figure 8).

La synthèse des stéroïdes hormonaux débute dans la mitochondrie, où le cholestérol est transformé en Δ^5 pregnenolone; ceci est réalisé par clivage de la chaîne latérale en C 20 (figures 9 et 10) (Derivaux et Ectors, 1986; Tsang et al., 1988).

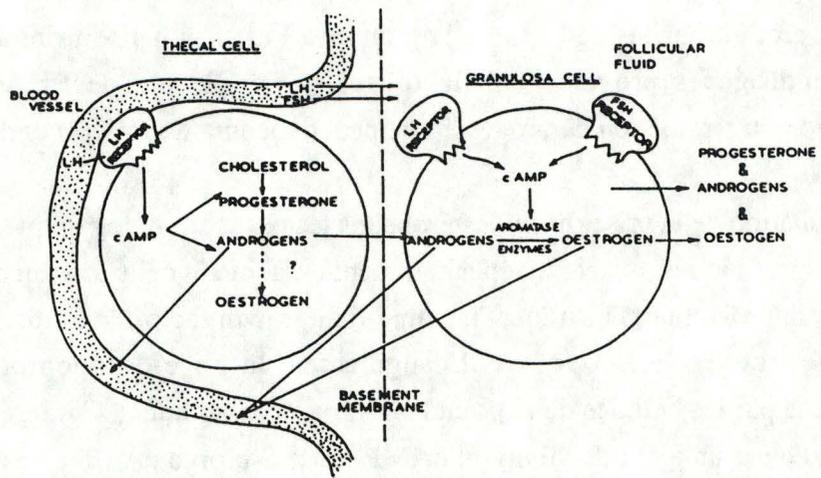


FIGURE 11: Biosynthèse des stéroïdes dans un follicule ovulatoire (Webb et Gauld,1984).

La pregnenolone passe ensuite dans le réticulum endoplasmique lisse pour être transformée en progestérone sous l'action d'une $\Delta 5-3\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase: $\Delta 5-4$ isomérase (Armstrong et al., 1987; Tsang et al., 1988).

Cette progestérone peut être synthétisée par les cellules de la granulosa et de la thèque (figure 11). Elle subit ensuite une hydroxylation en C17 (17- α hydrolase) pour donner la 17-hydroxyprogestérone qui est transformée en androstènedione sous l'action d'une desmolase. L'androstènedione constitue l'intermédiaire principal pour la formation des androgènes et des oestrogènes (Derivaux et Ectors, 1986; Armstrong et al., 1987).

L'androstènedione n'est produite que par les cellules de la thèque (interne). La formation de la testostérone nécessite l'action d'une déshydrogénase en C17 sur l'androstènedione.

Les androgènes nécessaires à la formation des oestrogènes par la granulosa sont fournis par la thèque (Armstrong et al., 1987). Les oestrogènes (oestrone et oestradiol) sont formés à partir des androgènes par élimination du carbone C19 et par aromatisation du noyau A. Il existe un équilibre entre la forme cétonique (oestrone) et β -hydroxylée (oestradiol) des oestrogènes du fait de la présence d'une 17 β -hydroxystéroïde-déshydrogénase (Derivaux et Ectors, 1986).

3.1. REGULATION DE LA SYNTHÈSE DES STÉROÏDES.

3.1.1. Oestradiol.

Avant le pic préovulatoire de LH, les follicules sécrètent principalement de l'oestradiol. Cette hormone est produite par la granulosa et sa production dépend de la disponibilité en androgènes fournis par la thèque. Un facteur limitant la production d'oestradiol semble être la conversion dans les cellules de la thèque de la progestérone en androstènedione par l'enzyme 17- α -cytochrome-P450 (Bogovich et Richards, 1982: cités par Brännström, 1988) c'est à dire l'enzyme possédant les activités 17 α hydrolase et 17-20- α hydrolase. Le taux maximum de cet enzyme est trouvé au moment du pic de gonadotropines. Quatre à six heures après ce pic, la production d'oestradiol et d'androgènes diminue, cette diminution semble être associée à une rapide chute du taux en 17- α -cytochrome-P450. Le corps jaune ne sécrète plus d'oestradiol ni d'androgènes mais seulement de la progestérone (Brännström, 1988).

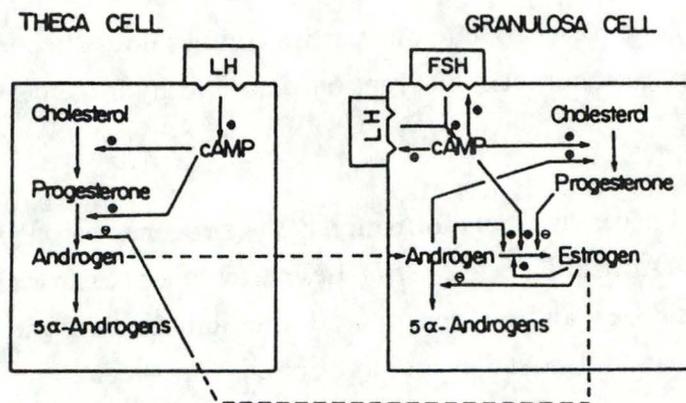


FIGURE 12 : Sites d'action des stéroïdes et interactions avec les hormones gonadotropes dans le contrôle de la synthèse des stéroïdes par le follicule (Armstrong et al., 1987).

La FSH induit et maintient la synthèse de l'aromatase dans les cellules de la granulosa (figure 12). Cette induction se fait via l'AMPc et implique la synthèse d'ARNm et/ou d'enzyme (Chan and Tan, 1987). La FSH agit donc en induisant la synthèse de nouvelle aromatase plutôt que par activation d'aromatase préexistantes.

L'androstènedione augmente l'effet de l'AMPc sur l'induction de la synthèse d'aromatase. La testostérone a le même effet mais celui-ci est moins important.

La progestérone inhibe la production d'oestradiol par les cellules de la granulosa de follicules préovulatoires de rate cultivées en présence de FSH et de testostérone. L'inhibition est d'autant plus forte que la dose de progestérone est élevée (Fortune and Vincent, 1983). Cette inhibition se fait sur l'induction de la synthèse d'aromatase en diminuant la synthèse d'AMPc induite par la FSH et non sur le fonctionnement de l'enzyme existante (Armstrong et al., 1987).

In vivo, la progestérone peut supprimer le développement des follicules ovulatoires en inhibant l'aromatase des cellules de la granulosa (Fortune and Vincent, 1983).

L'oestradiol augmente sa propre production en favorisant l'effet de la FSH sur la synthèse d'aromatase (Armstrong et al., 1987).

3.1.2. Androgènes.

La LH stimule la production d'androgènes par la thèque (Fortune and Vincent, 1983).

Les oestrogènes inhibent la production d'androgènes, et cela aussi bien in vivo qu'in vitro. Ils agissent sur un site différent de la production d'AMPc. Leur action se fait au niveau d'une étape enzymatique. En effet, des ovaires de rattes immatures prétraités in vivo aux oestrogènes puis mis en culture en présence de progestérone radioactive ne produisent pas d'androgènes radioactifs, la radioactivité se retrouve incorporée dans la 3- α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one (composé 5- α réduit). Les oestrogènes agiraient en inhibant le système enzymatique 17 α -hydrolase:C-17,20-lyase, ou en déviant les substrats vers une voie alterne conduisant à la formation de composés 5 α -réduits (Armstrong et al., 1987). D'autres expériences de cultures in vitro ont montré cette action inhibitrice des oestrogènes sur ce système enzymatique (Magoffin and Erickson, 1982: cités par Armstrong et al., 1987).

Les androgènes et la hCG induisent une sécrétion accrue d'androgènes.

La progestérone et la 5- α -pregnan-3,20-dione sont des inhibiteurs de l'enzyme C-17,20 lyase et de ce fait ont une action régulatrice sur la synthèse des androgènes.

3.1.3. Progestérone.

La LH a un effet positif sur la synthèse de progestérone par les cellules de la thèque (Armstrong et al., 1987). Au niveau de la granulosa, La LH et la FSH stimulent la synthèse de progestérone.

Les oestrogènes ont une action inhibitrice sur la production de progestérone. Ils agissent en limitant la conversion de la pregnenolone en progestérone (Toaff et al., 1983 et Veldhuis, 1985 : cités par Armstrong et al., 1987).

In vivo, l'administration d'oestradiol pendant 3 jours à des rattes hypophysectomisées diminue la capacité de la LH à augmenter la production de progestérone. In vitro, l'addition de dibutyryl cAMP à des ovaires de rattes hypophysectomisées traitées à l'oestradiol restaure la production de progestérone, mais pas l'addition de LH. Ceci suggère que les oestrogènes inhibent la production de progestérone à une étape antérieure à la production d'AMPc (Leung et Armstrong, 1979 : cités par Armstrong et al., 1987).

Certains auteurs (Veldhuis, 1985 et Welsh et al., 1983 : cités par Armstrong et al., 1987) ont montré que les oestrogènes pouvaient avoir un effet stimulateur sur la sécrétion de progestérone et cela pour des cultures de longue durée de cellules de granulosa, pour la culture de petits follicules, mais pas pour la culture de gros follicules.

In vitro, les androgènes stimulent la production de progestérone par les cellules de la granulosa de ratte (Corredor and Flickinger, 1983) ou par des follicules intacts de brebis (Moor et al., 1975 : cités par Armstrong et al., 1987). Ils agiraient en augmentant la production d'AMPc induite par la FSH, en améliorant l'affinité du récepteur à la FSH et en diminuant le métabolisme de l'AMPc. Des expériences utilisant des cellules de granulosa humaine (Battal et al., 1980 : cités par Armstrong et al., 1987) ou de porc (Lischinsky et al., 1983 : cités par Armstrong et al., 1987) ont montré un effet inhibiteur des androgènes sur la synthèse de progestérone. Cette inhibition empêcherait la conversion de la pregnenolone en progestérone. Un effet inhibiteur de la

testostérone sur l'enzyme $\Delta 5-3-\beta$ -Hydroxystéroïde déshydrogénase: $\Delta 5,4$ -isomérase a été montré par Tan and Armstrong (1980 : cités par Armstrong et al., 1987).

Pendant la période entre le pic des gonadotropines et la rupture folliculaire (ovulation), il se produit une augmentation de la production d'enzyme 3-hydroxy-3-méthylglutaryl CoA réductase, cholestérol side-chain cleavage cytochrome P450, et de 3- β -hydroxystéroïde déshydrogénase ou de leur taux de RNAm. Ces enzymes assureront une sécrétion assez importante de progestérone par les follicules préovulatoires pendant l'ovulation (Brännström, 1988).

3.2. MODIFICATIONS FONCTIONNELLES DUES AU PIC DE LH.

Le pic préovulatoire des gonadotropines stimule la production d'androgènes par la thèque; ceux-ci sont transformés en oestrogènes. Ces derniers, produits en grande quantité ont ensuite un effet inhibiteur sur la production d'androgènes par la thèque et sur leur aromatisation en oestrogènes, entraînant la baisse du taux de ceux-ci. L'oestradiol provoque également une augmentation de l'activité 5- α -réductase conduisant à la formation d'androgènes 5- α réduits qui sont des inhibiteurs compétitifs de l'aromatase. Après l'ovulation, la granulosa se lutéinise, et passe de la sécrétion d'oestrogènes à celle de progestérone (Armstrong et al., 1987).

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES.

1. OBJECTIFS POURSUIVIS.

Ce mémoire a été réalisé dans le but de mettre au point et de tester une technique de culture qui permette une bonne survie des follicules ovariens de brebis ainsi qu'une étude dynamique de leurs sécrétions.

2. METHODES.

La technique de culture choisie est la périfusion . Elle n'a jamais été utilisée au laboratoire, ce travail consistera donc en une première approche de cette technique.

A partir des données de différents auteurs (Bahr et al., 1980; Terqui et al., 1988), un appareillage a été construit de manière assez simple au laboratoire. Après quelques essais et aménagements, il nous a donné satisfaction. Une description de ce matériel sera faite dans le chapitre suivant.

Une étude de quelques facteurs a ensuite été réalisée afin d'observer leur influence sur les cultures. Ces facteurs sont la température de transport des ovaires, l'adjonction de sérum au milieu de culture et le nombre de follicules par chambre.

Une approche de l'effet de substance, dans notre cas la FSH, sera également réalisée.

2.1. PRÉPARATION DU MATÉRIEL BIOLOGIQUE.

Les ovaires sont prélevés à l'abattoir d'Anderlecht directement après que les brebis soient tuées, dépecées puis vidées. Le temps maximal écoulé entre la mort de l'animal et le prélèvement est d'environ dix minutes. Les animaux abattus sont principalement des moutons des races Texel et Suffolk.

Les ovaires sont recueillis par excision à l'aide de ciseaux. Ils sont placés dans des milieux de culture maintenus aux températures soit de 4°C dans de la glace, soit de 38°C dans de l'eau à cette même température. Les ovaires sont emportés tels quel. La dissection des follicules de diamètre compris entre 2 et 7 mm est réalisée à l'aide de pinces fines et de ciseaux de micro-dissection au laboratoire de physiologie animale des Facultés. Pendant la dissection les ovaires et les follicules sont maintenus à la température de 4°C ou de 38°C.

Le temps écoulé entre la récolte des ovaires et la mise en culture des follicules est d'environ trois heures.

Les ovaires d'une même récolte ne sont pas tous de même qualité. Quelques un peuvent présenter des anomalies. Des brebis peuvent en effet avoir subi divers

TABLEAU 1: Composition du milieu de culture M 199: référence 079-00011 (Gibco).

Medium 199¹

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

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

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

2. Values established by the Tissue Culture Standards Committee.

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

traitements hormonaux ou anabolisants, être âgées ou malades. Un tri des ovaires est donc réalisé avant la dissection des follicules.

2.2. CULTURE IN VITRO.

2.2.1. Milieu de culture.

Le milieu de culture utilisé est du M199 fourni par GIBCO (tableau 1). Il est acheté sous forme de poudre et préparé puis stérilisé 1 à 2 jours avant son utilisation en suivant le mode opératoire décrit par GIBCO. De la gentamicine (à 50 ng/ml) est ajoutée à raison de 1 ml/l de milieu. Le milieu est utilisé tel quel, ou additionné de sérum de veau foetal à raison de 20 ml/l (2%). La gentamicine et le sérum sont tous deux fournis par GIBCO.

2.2.2. Description du matériel.

La survie des follicules est réalisée dans de petites chambres périfusées de milieu spécifique et maintenues à température idéale dans un bain thermostaté (figure 13).

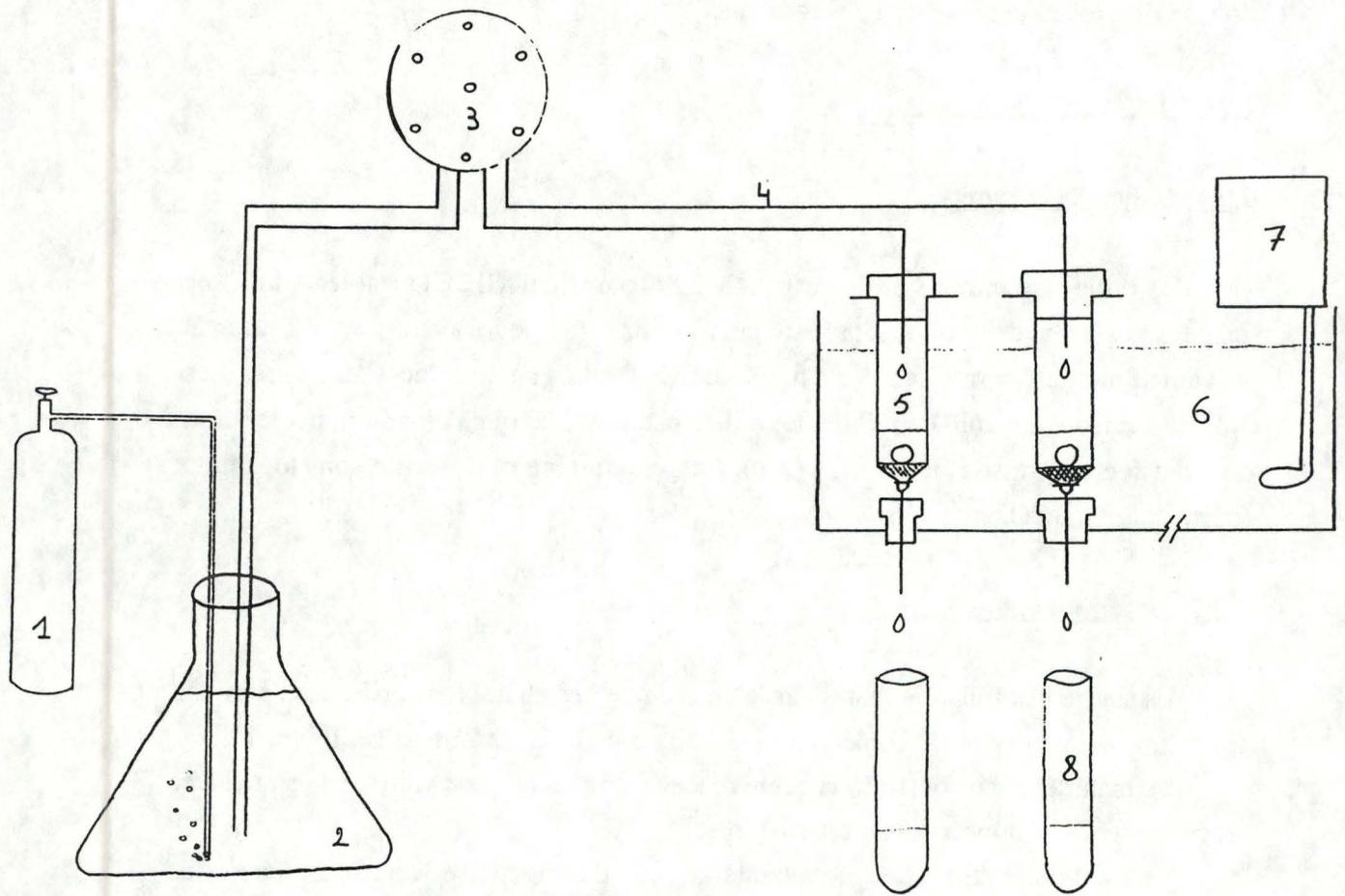
Le matériel a été construit de manière assez simple au laboratoire. Après quelques aménagements, il nous a donné satisfaction.

Le fond d'un bassin destiné à contenir l'eau thermostatée a été 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 de 22G qui les traversent de part en part. Ces seringues servent de chambres de culture. Elles sont tapissées dans le fond par une fine couche de laine de verre 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 1,5 ml).

La thermostatation 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. Le débit est régulièrement contrôlé au cours de la culture et est le même d'une culture à l'autre. Les tubes plongent dans le bain-marie pour réchauffer le milieu avant qu'il ne soit injecté goutte-à-goutte dans les chambres.



- 1: mélange gazeux O₂ (95%) + CO₂ (5%).
- 2: milieu de culture.
- 3: pompe péristaltique.
- 4: tuyau en Tygon.
- 5: chambre de culture.
- 6: bain thermostatisé.
- 7: pompe thermostatique.
- 8: tubes pour la récolte des fractions.

FIGURE 13 : Système de périfusion.

Le milieu est oxygéné par barbotage d'un mélange gazeux d'O₂ (95%) + CO₂ (5%), qui permet également de maintenir le pH du milieu à 7,4. Le pH est contrôlé régulièrement au cours de la culture et réajusté si nécessaire.

Le milieu périefusé est recueilli par fractions dans des tubes dressés dans des portoirs sous les chambres.

2.3. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES ET INTERPRETATION.

Après chaque culture, les follicules sont préparés pour un examen histologique de la granulosa afin de déterminer si le follicule est sain ou atrétique.

Les follicules sont fixés dans une solution de Bouin Hollande, inclus et enrobés dans du Surgipath; des sections de 3 à 4 µm sont réalisées, et les coupes sont colorées par un HES (hémalun, érihtrosine, safran). Ces étapes sont expliquées en détail en annexe.

L'observation microscopique des noyaux des cellules de la granulosa permet de déterminer si le follicule est sain ou atrétique. Plusieurs auteurs ont établi une classification de l'état des follicules en se basant sur le nombre de noyaux picnotiques présents dans la granulosa. Webb et al. (1989) ont défini la classification suivante pour des follicules de brebis:

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

Nous n'avons considéré que 4 stades: follicule sain, follicule en atrésie précoce, follicule en atrésie avancée et follicule présentant une atrésie tardive (cf. photos 1 à 4 en annexe).

L'observation de mitoses au niveau de la granulosa montre que le follicule est en bonne santé.

2.4. DOSAGES HORMONAUX.

Au cours des cultures, des prélèvements de milieu sont réalisés à intervalles réguliers, et sont congelés à -20°C en attendant le dosage des hormones envisagées: $\Delta 4$ -androstènedione (A), testostérone (T), oestradiol (E2) et progestérone (P4).

La méthode de dosage utilisée est le " radio-immuno-assay" (RIA; Bister, 1980).

Les traceurs radioactifs utilisés lors de ce travail sont des hormones tritiées.

Le compteur est un compteur β de la firme Beckman.

Le modèle mathématique appliqué au calcul des résultats des dosages est celui de Finney (1976).

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

A = radioactivité de la fraction pour une certaine quantité d'hormone froide.

A_0 = radioactivité maximale de la fraction.

a = radioactivité non spécifique.

C_m = concentration d'hormone marquée.

C_f = concentration d'hormone froide.

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

Les quatre hormones sont dosées selon le même schéma et les différentes solutions préparées de la même façon.

Les traceurs radioactifs utilisés sont la $[1,2,6,7\text{-H}^3]$ androstènedione (Amersham TRK 454), la $[1,2,6,7\text{-H}^3]$ testostérone (Amersham TRK 402), la $[2,4,6,7\text{-H}^3]$ oestradiol (Amersham TRK 322) et la $[1,2,6,7\text{-H}^3]$ progestérone (Amersham TRK 413).

TABLEAU 2: Caractéristiques de sensibilité et de spécificité des différents antiséras.

	Androstènedione	Testostérone	Oestradiol	Progestérone	
Titre final	1/120000	1/450000	1/600000	1/700000	
Sensibilité de la courbe standard (pg)	-	4	4	4 - 8	
Spécificité: pourcentage de réaction croisée (%)	Androstènedione	100	0,15		
	Androstérone	4,6			
	Andrénostérone	2,1			
	5 α -androstan-3 β ,17 β -diol	<0,06			
	Déhydroépiandrostérone		<0,05	0,08	
	Testostérone	1,4	100	<0,07	0,08
	5 α -Dihydrotestostérone	0,5	32		
	17 β -oestradiol		<0,05	100	<0,05
	17 α -oestradiol			0,47	
	Oestriol			0,27	
	Oestrone	<0,06	<0,05	1,4	
	Progestérone	0,1	<0,05	<0,07	100
	Pregnenolone	<0,06	<0,05	<0,07	1,6
	21-hydroxyprogestérone				3,16
	17 α -hydroxyprogestérone				1,9
	11 α -hydroxyprogestérone				1
	17 α hydroxypregnenolone				0,08
	Prednisolone				<0,05
	Cholestérol		<0,05	<0,07	<0,05
	Cortisone				<0,05
Cortisol	<0,06		<0,07	<0,05	
II désoxycortisol	<0,06				
Corticostérone				<0,05	

Ces différentes hormones ont une activité spécifique de 3-4 TBq/mmol et sont livrées en fioles de 9-25 MBq (250 μ Ci) par 250 μ l de solvant (toluol pour la P₄, toluol: éthanol à 9: 1 v/v pour le Δ 4, la T et l'E₂).

Cent μ l de cette solution sont pipetés dans un tube en verre et mis à évaporer dans une étuve sous vide à 40°C. L'hormone marquée est récupérée par 1 ml d'éthanol et le volume est porté à 30 ml à l'aide de tampon "Wide" (tampon phosphate 0,06 M, pH 7.55). L'activité totale d'une telle solution est d'environ 7000 Cpm/100 μ l.

Les antisérums spécifiques (AS) proviennent, sous forme lyophilisée, du laboratoire d'hormonologie du Centre d'Economie Rurale de Marloie. Ils sont reconstitués par addition de 10 ml d'eau distillée. Leurs caractéristiques de sensibilité et de spécificité sont données dans le tableau 2.

Les solutions hormonales de référence servant à l'établissement des courbes standard sont réalisées à partir d'une solution alcoolique d'hormone non marquée à 100000 ng/ml. Deux dilutions successives dans du milieu de culture donnent une solution à 10 ng/ml. Cette solution est de nouveau diluée dans du milieu afin d'obtenir les concentrations connues et croissantes d'hormone utilisées comme références. Pour l'A, la T et la P₄ on réalise une courbe standard comportant les valeurs: 0,00; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 et 10,00 ng/ml. Pour l'E₂ les valeurs sont: 0,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0; 200,0; 500,0; 1000,0; 2000,0 et 3000,0 pg/ml. Les courbes standard sont conservées à -20°C.

Les hormones sont extraites dans des tubes en verre d'une capacité de 7 ml; 200 μ l d'échantillon à doser ou 200 μ l de la courbe standard sont déposés dans ces tubes. On ajoute 2 ml d'éther aux tubes destinés à l'extraction de l'A, de la T et de l'E₂ ou 2 ml d'hexane pour l'extraction de la P₄.

Les tubes sont bouchés, agités pendant 2 minutes au vortex puis placés au congélateur pour la nuit.

Le solvant contenant les stéroïdes reste liquide; il est transvasé dans un autre tube et évaporé sous vide à 40°C. Le résidu sec est dissous par 100 μ l de tampon phosphate 0,1 M (pH 7.4).

Le dosage proprement dit est réalisé par addition au 100 μ l d'échantillon de 100 μ l de traceur et de 100 μ l d' AS.

Des BG (back ground) sont réalisés en déposant dans les tubes 200 μ l de tampon et 100 μ l de traceur.

Les tubes sont agités au vortex puis placés une nuit à 4°C afin que la compétition entre l'hormone marquée et l'hormone froide pour l'AS s'équilibre.

Cinq cents μ l d'adsorbant (Chacoal Norit 650 mg + Dextran T70 PHARMACIA 65 mg pour 300 ml de tampon "Wide") à 4°C sont ajoutés aux tubes; l'adsorbant fixe l'hormone restée libre.

Les tubes sont homogénéisés au vortex et la solution est incubée pendant 10 minutes à 4°C.

Les tubes sont ensuite centrifugés à 3000 rpm, 0°C, pendant 10 minutes afin de séparer l'hormone fixée à l'adsorbant de celle ne s'y étant pas fixée.

Trois cents μ l de surnageant sont pipetés et déposés dans une fiole contenant 3 ml de liquide scintillant (Ecoscint A).

Cette solution est homogénéisée au vortex puis reposée.

L'activité est mesurée au compteur β à scintillation pour un temps fixé à 4 minutes.

CHAPITRE III: RESULTATS.

1. RAPPELS DES OBJECTIFS.

Sept essais ont été réalisés, les buts de ceux-ci sont dans l'ordre de leur réalisation:

- 1: observer la survie de follicules incubés dans du milieu M 199 seul;
- 2: rechercher si la température de transport a un effet sur la survie des follicules, et évaluer les sécrétions de ceux-ci;
- 3 et 4: déterminer si l'ajout de sérum de veau foetal au milieu a un effet sur la survie ou sur les sécrétions des follicules;
- 5 et 6: rechercher une relation entre l'état physiologique des follicules et ses sécrétions en ne plaçant qu'un follicule par chambre, et déterminer si la culture de follicules isolés améliore leur survie;
- 7: observer les effets de la FSH sur la sécrétion des stéroïdes.

2. PREMIERE CULTURE.

2.1. BUT.

La première culture est réalisée dans le but d'observer la survie des follicules placés dans du milieu M 199 Gibco non additionné de sérum de veau foetal.

2.2. SCHÉMA EXPÉRIMENTAL.

Les ovaires prélevés à l'abattoir sont transportés dans ce milieu maintenu à la température de 4°C. Pour observer la survie des follicules, 4 follicules sont introduits dans chacune des 10 chambres, ceci afin d'en avoir un nombre suffisant pour les analyses ultérieures et pour ne pas surpeupler les chambres. Il n'a pas été possible de disséquer suffisamment de follicules d'une même taille, celle-ci va de 2 à 6 mm de diamètre. Les follicules sont donc répartis de façon homogène dans les chambres. Toutes les 5 heures de culture, de la 5^{ème} jusqu'à la 50^{ème}, les follicules d'une chambre sont prélevés et fixés dans du Bouin en vue de leur préparation à une observation histologique.

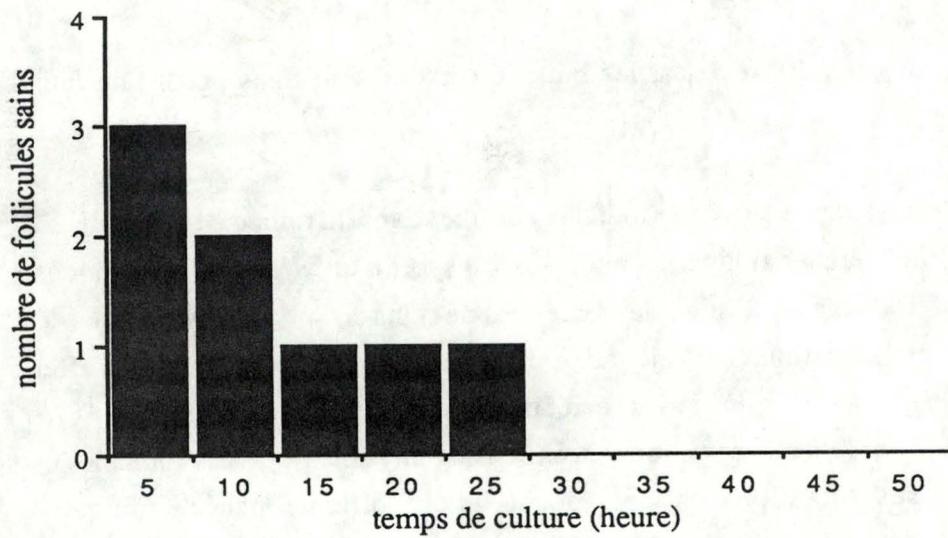


FIGURE 16: Nombre de follicules histologiquement sains en fonction du temps de culture.

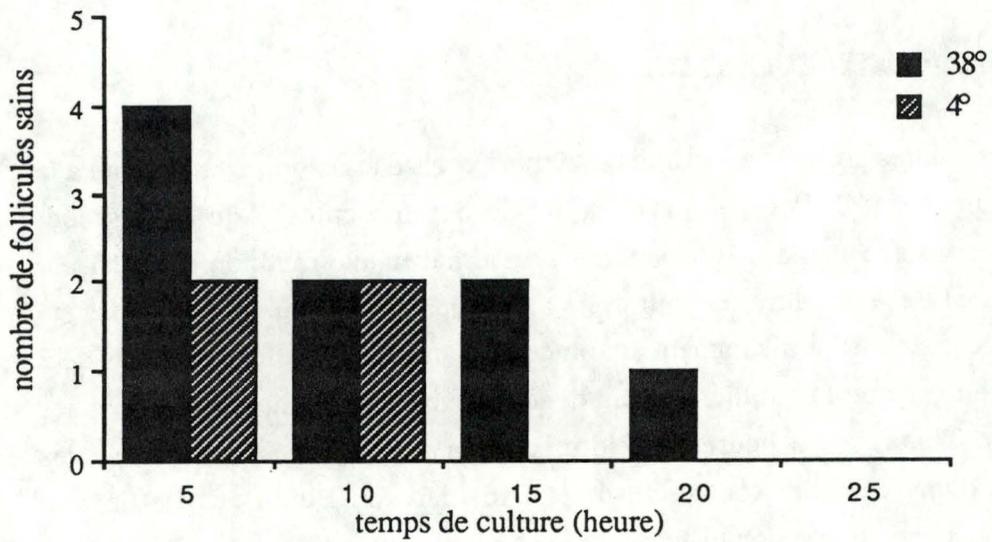


FIGURE 17: Nombre de follicules histologiquement sains en fonction du temps de culture pour les température de transport de 4 et 38°C.

2.3.RÉSULTATS.

La figure 16 montre le nombre de follicules observés sains à chaque retrait des chambres. Trois follicules sur 4 ne présentent pas de picnose après 5 heures. Deux sont encore sains après 10 heures. Un seul apparaissait encore sain dans les chambres ouvertes après 15, 20 et 25 heures de culture. Après 30 heures, tous les follicules montrent une atrophie importante.

3. DEUXIEME CULTURE.

3.1.BUTS.

Cette essai a pour but de rechercher si le refroidissement à 4°C imposé aux ovaires pendant le transport n'est pas néfaste pour la survie des follicules par rapport à un maintien à 38°C, qui est la température physiologique du mouton.

En plus de l'analyse histologique de la survie des follicules, une évaluation de leurs sécrétions est aussi envisagée.

3.2.SCHÉMA EXPÉRIMENTAL.

Les ovaires recueillis à l'abattoir sont transportés pour moitié dans du milieu maintenu à 4°C et pour moitié dans du milieu maintenu à 38°C. Après dissection, 40 follicules sont recueillis et placés par 4 dans chaque chambre à raison de 5 chambres par température de transport des ovaires. La périfusion est réalisée avec du milieu de culture M 199 Gibco ne contenant pas de sérum de veau foetal. Pour chaque température de transport, les follicules d'une chambre sont prélevés toutes les 5 heures puis placés dans du Bouin. La culture dure donc 25 heures. Une demi-heure avant chaque retrait des follicules, le milieu périfusé est recueilli pendant 30 minutes pour une analyse des stéroïdes.

3.3.RÉSULTATS.

La survie des follicules provenant d'ovaires transportés à 38°C est meilleur que celle des follicules refroidis à 4°C (figure 17). Ceci est observé dès la 5^{ème} heure de culture, avec 4 follicules sains pour la température de 38°C contre 2 pour celle de 4°C. Durant cet essai, aucun follicule sain n'est observé après 15 heures s'il a été refroidi à la température de 4°C, tandis qu'on observe encore un follicule sain à la 20^{ème} heure de culture chez les follicules transportés à 38°C.

La figure 18 montre la sécrétion d'androstènedione (A), pour les chambres dans lesquelles les follicules restent 20 ou 25 heures en culture, tend à rester constante ou à augmenter.

La testostérone (T) est sécrétée en quantité plus faible au 20 et 25^{ème} heures par rapport à la 5^{ème} heure contrairement à la progestérone (P4) qui voit sa sécrétion augmenter en fin de culture.

La sécrétion d'oestradiol (E2) ne montre pas de tendance bien nette mais reste à des valeurs assez élevées aux heures 20 et 25.

Un test statistique a pu montrer une sécrétion d'E2 significativement plus élevée pour les chambres contenant les follicules refroidis à 4°C ($P < 0,05$). Aucune différence n'a pu être montrée pour les autres stéroïdes.

4. TROISIEME ET QUATRIEME CULTURES.

4.1. BUT.

Les 3^{ème} et 4^{ème} cultures sont réalisées afin de déterminer si l'ajout de sérum de veau foetal au milieu de culture a un effet sur la survie et sur les sécrétions des follicules.

4.2. SCHÉMA EXPÉRIMENTAL.

Les ovaires sont transportés à la température de 38°C. Après dissection, les 20 follicules disponibles sont placés par 4 dans 5 chambres. Le milieu périfusé est du M 199 Gibco additionné de sérum de veau foetal à raison de 20 ml par litre de milieu (2%). Les follicules sont, comme lors des essais précédents ôtés d'une chambre toutes les 5 heures et placés dans le Bouin. La culture dure donc 25 heures. Avant chaque retrait des follicule, le milieu périfusé est recueilli pendant 30 minutes.

Malheureusement, le petit nombre d'ovaires obtenus à l'abattoir ne nous a pas permis de réaliser 5 chambres supplémentaires périfusées avec du milieu sans sérum, et nous devons nous baser sur les résultats de 38°C de l'expérience précédente, réalisée dans les mêmes conditions, et sans sérum, pour pouvoir faire une comparaison.

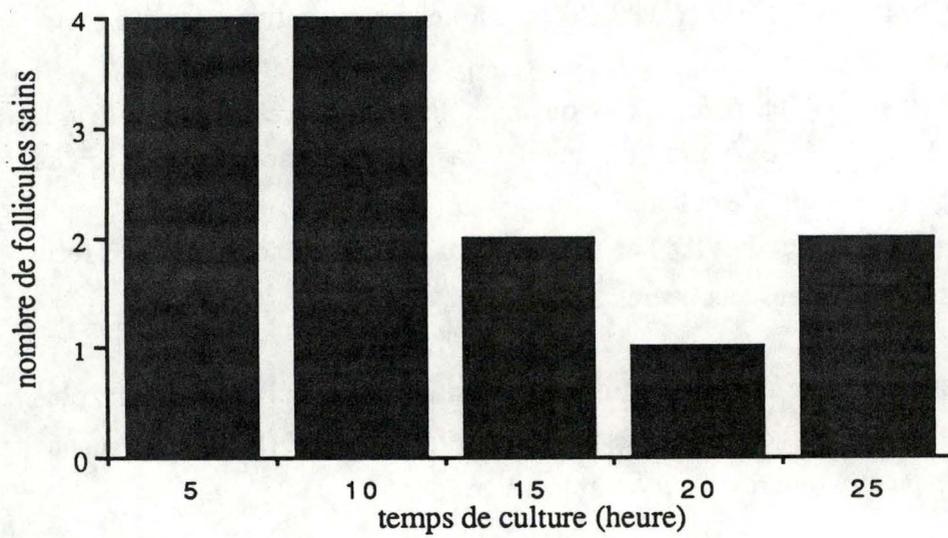


FIGURE 19: Nombre de follicules histologiquement sains en fonction du temps de culture.

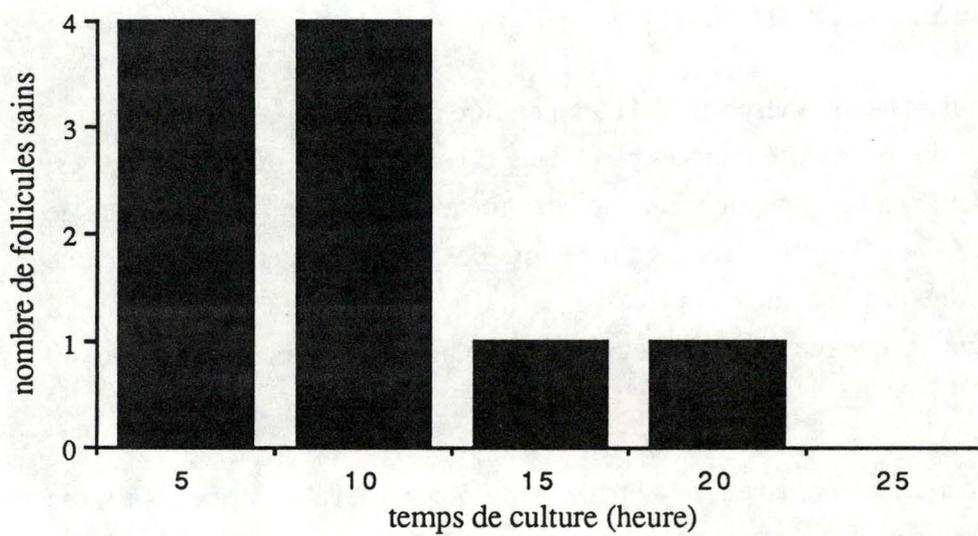


FIGURE 20: Nombre de follicules histologiquement sains en fonction du temps de culture.

FIGURE 21 : Sécrétions par chambre des 4 stéroïdes en fonction du temps de culture.

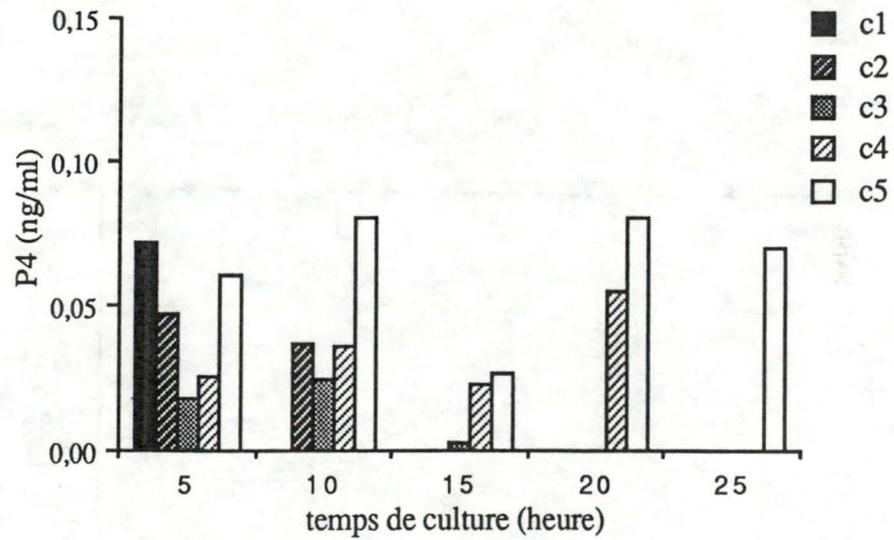
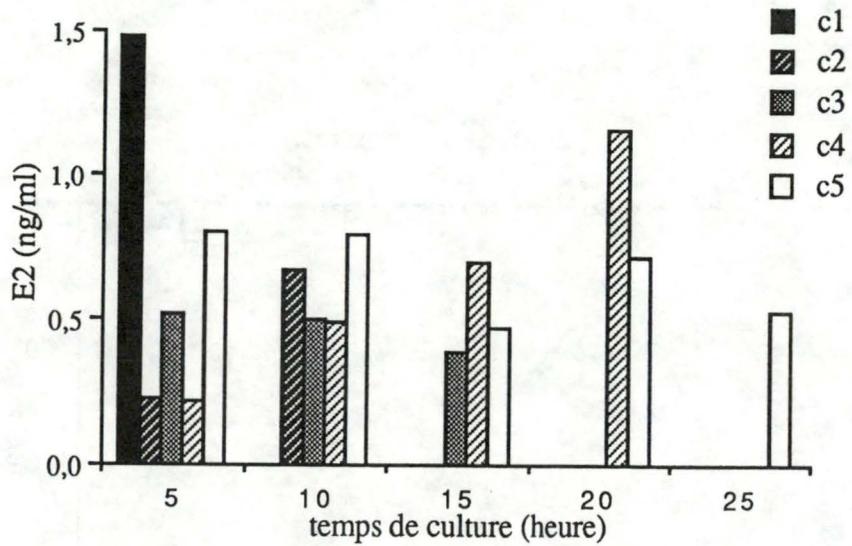
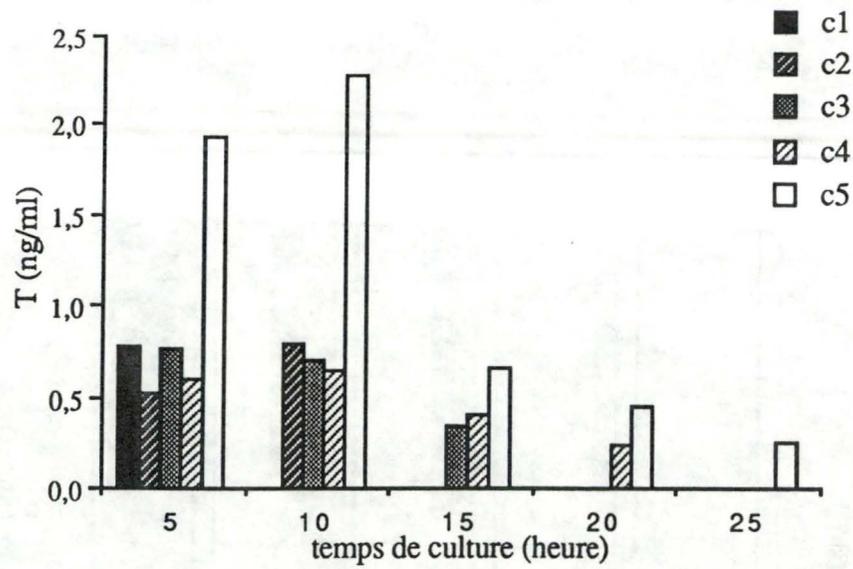
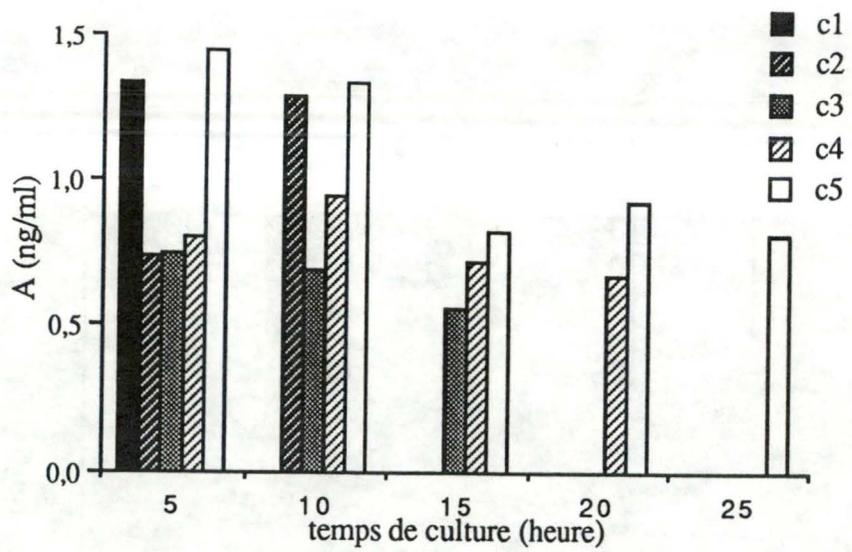
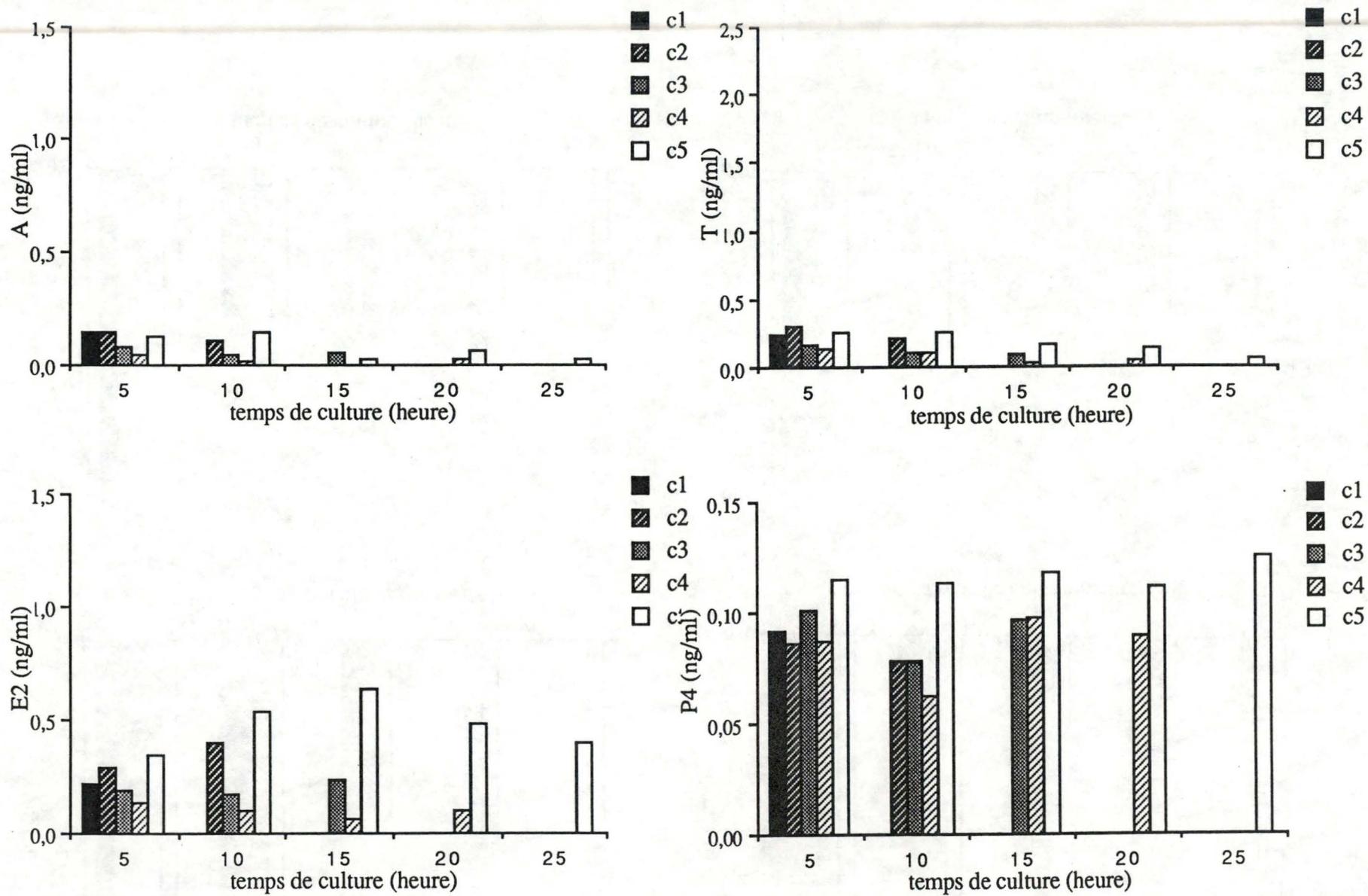


FIGURE 22: Sécrétions par chambre des 4 stéroïdes en fonction du temps de culture.



Pour la 4^{ème} culture, des problèmes rencontrés lors de la récolte des ovaires et pendant le retour ont occasionné du retard. Le temps écoulé entre la récolte et la mise en culture fut d'environ 4 heures au lieu de 3.

4.3.RÉSULTATS.

Ces deux cultures montrent une survie qui est totale après 10 heures (figures 19 et 20). Pour la 3^{ème} culture, 2 follicules sont toujours sains après 25 heures bien qu'on n'en observe qu'un seul à la 20^{ème} heure. La 4^{ème} culture présente une survie plus courte, un seul follicule est encore sain après 15 heures et après 20 heures de culture. Chez les follicules atrétiques, la picnose est importante et on n'observe pas d'état intermédiaire.

Les quantités d'hormone sécrétées lors de ces deux cultures sont différentes (figures 21 et 22). Les sécrétions d'A, de T et d'E₂ sont significativement plus élevées au cours de la 3^{ème} culture (A: $P < 0,01$; T, E₂: $P < 0,05$); tandis que celle de P₄ est plus importante pendant la 4^{ème} culture ($P > 0,01$).

Ces résultats ne permettent pas de faire la comparaison prévue avec la 2^{ème} culture. Le seul point commun entre les cultures 3 et 4 est que leur sécrétion d'E₂ est significativement plus élevée que celle de la 2^{ème} culture ($P < 0,01$).

5.CINQUIEME CULTURE.

5.1.BUTS.

La 5^{ème} culture, et la suivante, est réalisée en ne plaçant qu'un seul follicule par chambre de culture, afin de rechercher si la technique de culture permet d'observer une relation entre l'état physiologique des follicules et leurs sécrétions et si leur survie peut être améliorée par le fait qu'ils ne sont pas en contact avec d'autres.

5.2.SCHÉMA EXPÉRIMENTAL.

Les ovaires sont transportés à la température de 38°C. Après dissection, un follicule est placé dans chacune des 9 chambres utilisées. Le diamètre des follicules est compris entre 3,5 et 6,5 mm. Le milieu de périfusion contient du sérum de veau foetal (2% v/v). En fonction des résultats antérieures (survie totale jusque la 10^{ème}

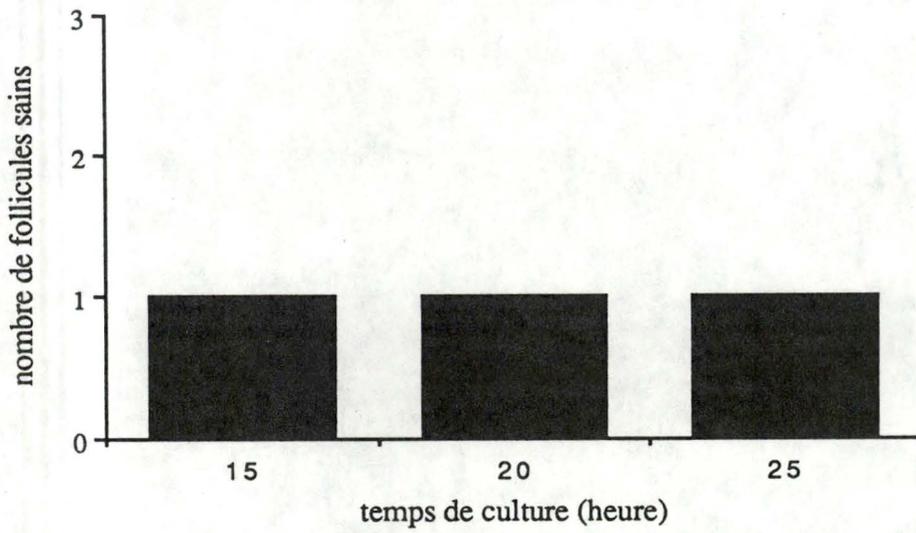


FIGURE 23: Nombre de follicules histologiquement sains en fonction du temps de culture.

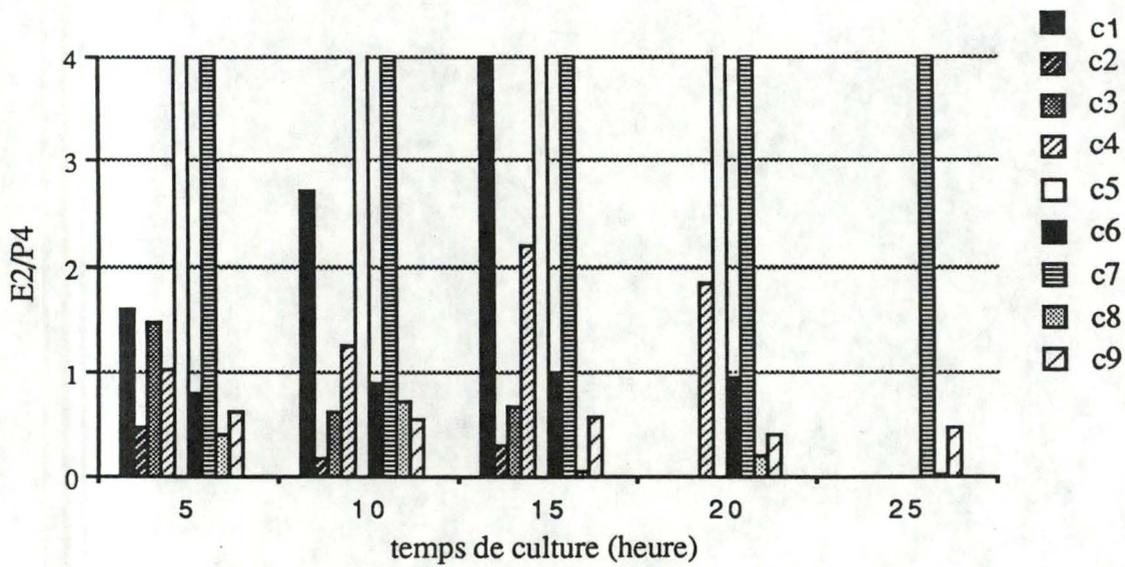


FIGURE 24: Rapport des concentrations E₂/P₄ par follicule en fonction du temps de culture.

heure), les follicules sont enlevés de 3 chambres toutes les 5 heures à partir de la 15^{ème} heure puis placés dans le Bouin. Le retrait des follicules est donc effectué de la manière suivante: chambres 1 à 3 à la 15^{ème} heure, chambres 4 à 6 à la 20^{ème} heure et chambres 7 à 9 à la 25^{ème} heure. Du milieu périfusé est recueilli pendant une demi heure aux heures 4.30', 9.30', 14.30', 19.30' et 24.30'.

5.3.RÉSULTATS.

L'observation histologique a permis de déterminer qu'un follicule sur 3 reste sain après 15, 20 et 25 heures de culture (figure 23). Ces follicules correspondent aux chambres 1, 5 et 7.

Le follicule 6 ne présente qu'un stade précoce d'atrésie. Pour le follicule 4, l'atrésie est faible, localisée près de la membrane basale et limitée à une petite portion de la granulosa, le reste de celle-ci présente un aspect normal (lésion: photo 5 en annexe). L'atrésie observée chez les follicules 2, 3, 8 et 9 est avancée.

Les sécrétions de chaque chambre (figure 25) montrent que les follicules 1, 5 et 7 sécrètent de grandes quantités d'E₂, et que cette sécrétion augmente au cours du temps (follicules 1 et 5) ou augmentent de la 5^{ème} à la 10^{ème} heure pour diminuer ensuite (follicule 7).

Le follicule 4 voit également sa sécrétion d'E₂ augmenter; toutefois la valeur maximale atteinte reste faible par rapport à celle des trois follicules précédents.

La sécrétion d'A reste relativement constante pour chaque follicule, sauf pour le follicule 7 où elle a tendance à augmenter.

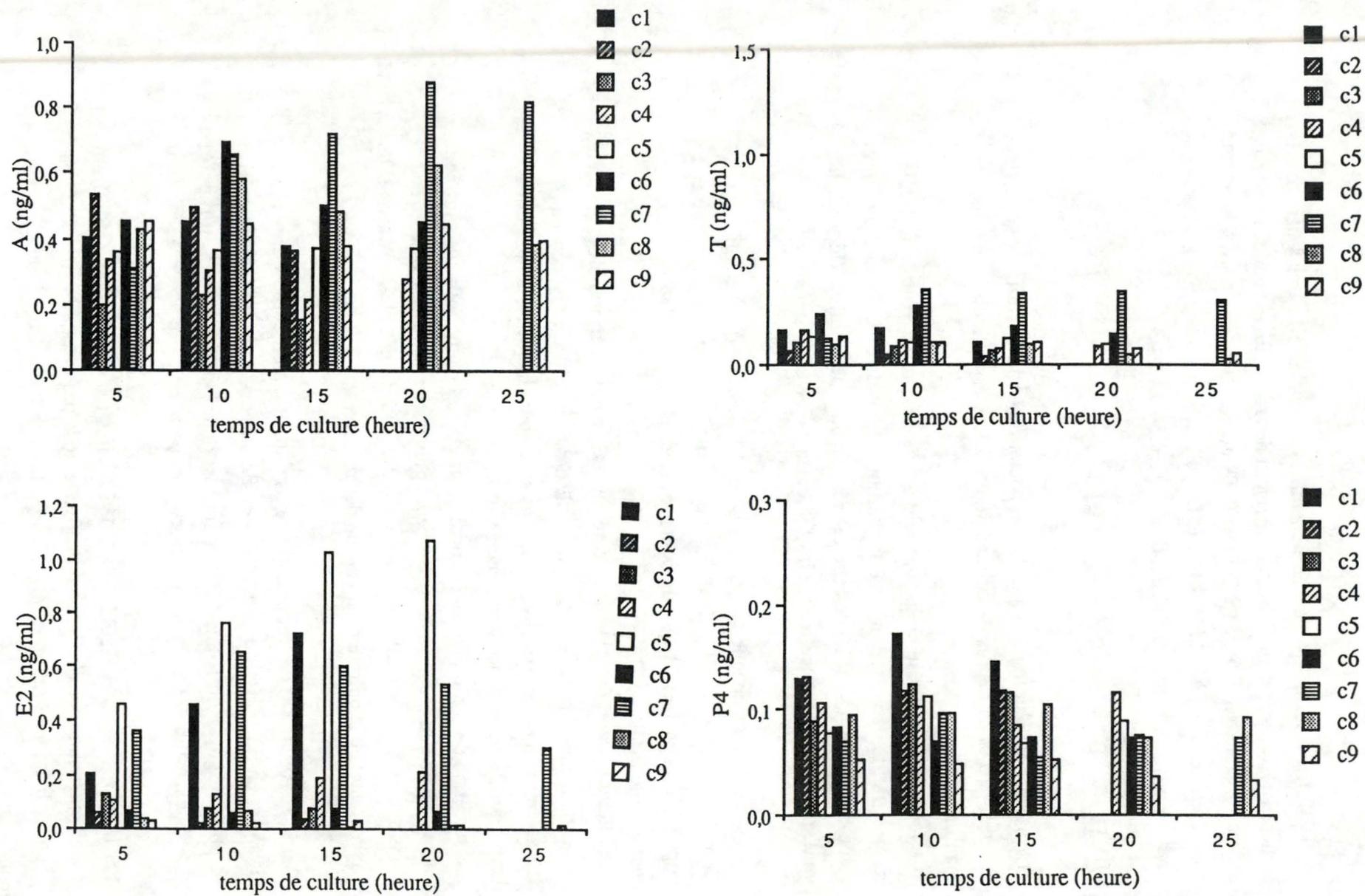
La sécrétion de T diminue au cours du temps pour chaque follicule sauf pour le follicule 7 où elle augmente à la 10^{ème} heure puis reste assez constante.

Quelque soit le follicule, la P₄ ne montre pas de grandes variations de sécrétion au cours de la culture pour chacun des follicules.

Bellin et Ax (1984) ont montré qu'il existe une relation entre le rapport des concentrations en E₂ sur les concentrations en P₄ dosées dans le fluide folliculaire et l'état physiologique du follicule. Ils ont ainsi déterminé que pour un rapport $E_2/P_4 > 1$ les follicules sont sains, alors que pour un rapport < 1 , ils sont atrétiques.

Par ailleurs, Webb et Gauld (1985, 1987: cités par Webb et al., 1989) ont montré qu'il existe une corrélation significative entre la production *in vitro* d'E₂ par le follicule et la concentration en E₂ dans le fluide folliculaire ou dans la veine ovarienne.

FIGURE 25: Sécrétions par follicules des 4 stéroïdes en fonction du temps de culture.



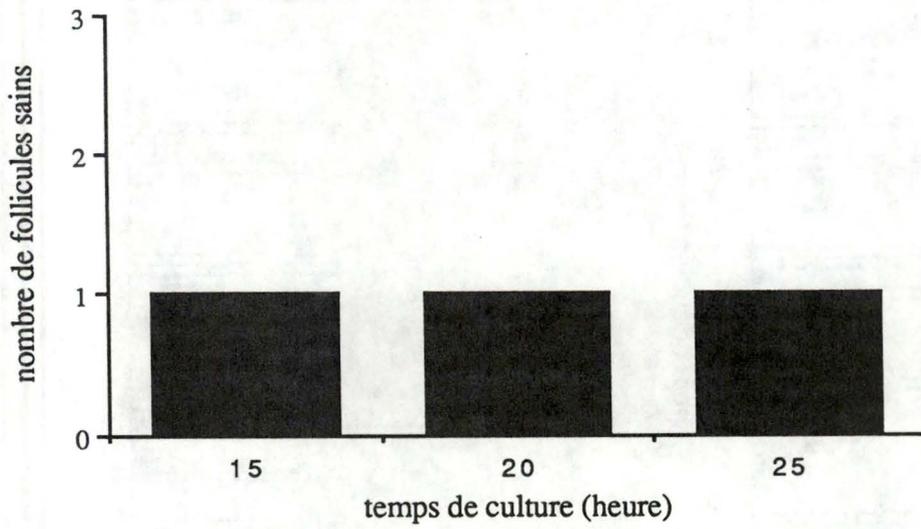


FIGURE 26: Nombre de follicules histologiquement sains en fonction du temps de culture.

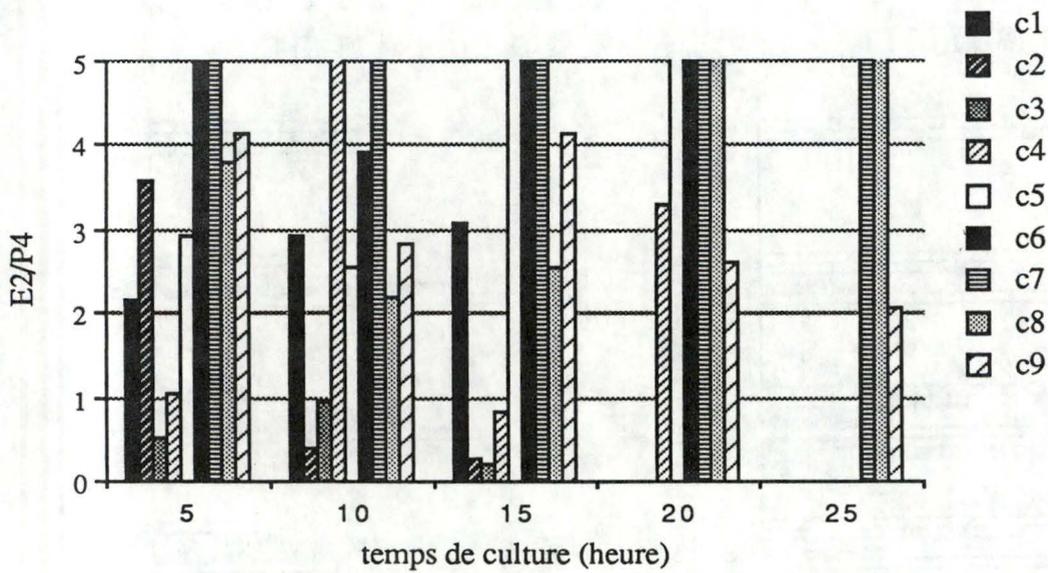


FIGURE 27: Rapport des concentrations E₂/P₄ par follicules, en fonction du temps de culture.

Nous avons donc calculé le rapport E2/P4 pour chaque follicule et pour chaque temps considéré (figure 24).

Le rapport est supérieur à 1 et le reste tout au long de la culture pour les follicules déterminés sains par l'observation histologique (follicules 1, 5 et 7). Il est inférieur à 1 pour les follicules déterminés atrétiques (follicules 2, 8 et 9); pour le follicule 3, il est supérieur à 1 à l'heure 5 mais est ensuite inférieur à. Le rapport reste proche de 1 pour le follicule 6; il est proche de 1 à la 5^{ème} heure pour le follicule 4 puis augmente.

6. SIXIEME CULTURE.

Les buts et le schéma expérimental de la 6^{ème} culture sont identiques à ceux de la culture précédente.

6.1. RÉSULTATS.

L'observation histologique permet de déterminer un taux de survie identique à celui de la culture précédente (figure 26). Un follicule sain est observé aux heures 15, 20 et 25 (follicules 1, 5 et 9). Le follicule 4 présente une atrésie précoce. Les follicules 6, 7 et 8 ont de petites portions de la granulosa proches de la membrane basale qui présentent une picnose, le reste de la granulosa étant tout à fait sain. Les follicules 2 et 3 sont à un stade d'atrésie avancée.

Les follicules 1, 5, 6, 7, 8 et 9 sécrètent des quantités d'E2 plus importantes que les follicules 2, 3 et 4 (figure 28). A la 5^{ème} heure le follicule 2 secrète beaucoup d'E2 mais sa sécrétion chute à la 10^{ème} heure. La sécrétion d'E2 ne présente pas la même évolution au cours du temps pour tous les follicules. Une augmentation est observée pour les follicules 5 et 6. La sécrétion du follicule 7 augmente jusque la 15^{ème} heure puis diminue. Celle des follicules 8 et 9 diminue de la 5^{ème} à la 10^{ème} heure puis réaugmente.

La sécrétion de T diminue dans le temps pour tous les follicules sauf pour le 5 où elle augmente jusque la 15^{ème} heure puis diminue.

Pour chaque follicule, on observe une grande variabilité dans les valeurs des sécrétions de P4 obtenues d'un prélèvement à l'autre.

La sécrétion d'A a tendance à rester constante pour les différents follicules, sauf pour le follicule 5 où elle augmente et pour le follicule 9 où elle part d'une valeur élevée, diminue puis réaugmente à la 25^{ème} heure.

TABLEAU 3: Moyenne et écart-type des sécrétions des 4 stéroïdes pour les follicules sains et atreétiques.

	E2 (ng/ml)	A (ng/ml)	T (ng/ml)	P4 (ng/ml)
follicules sains n=9	0,630 ± 0,289	0,458 ± 0,253	0,306 ± 0,268	0,080 ± 0,041
follicules atreétiques n=6	0,032 ± 0,026	0,369 ± 0,197	0,096 ± 0,048	0,092 ± 0,030

Le rapport E₂/P₄ (fig. 27) reste supérieur à 1 pendant toute la culture pour les follicules 1, 5, 6, 7, 8 et 9. Il reste inférieur à 1 pendant les 15 heures de culture du follicule 3. Le follicule 2 présente un rapport supérieur à 1 à la 5^{ème} heure, mais inférieur par la suite. Le follicule 4 montre un rapport qui oscille autour de 1.

Une comparaison, entre les sécrétions des follicules sains et atériques observées à la 15^{ème} heure lors des 5^{ème} et 6^{ème} essais, montre que les follicules sains sécrètent significativement plus d'E₂ (P < 0,01; tableau 3). Les différences ne sont pas significatives pour les sécrétions d'A, de T et de P₄.

7. SEPTIEME CULTURE.

7.1. BUT.

Le dernier essai a pour but de tester si la technique de culture permet de détecter les effets de stimulations hormonales sur la sécrétion des stéroïdes par des follicules en culture individuelle. Pour cela, de la FSH est ajoutée au milieu de culture.

7.2. SCHEMA EXPERIMENTAL.

Les ovaires récoltés sont transportés dans du milieu maintenu à la température de 38°C. Après dissection, 9 follicules, d'un diamètre compris entre 4 et 6 mm, sont placés chacun dans une chambre. La culture dure 5 heures. Les follicules sont d'abord périfusés une demi-heure sans stimulation (milieu + sérum (2%), sans FSH). Après quoi, les chambres 4, 5 et 6 sont périfusées avec du milieu contenant, en plus du sérum, 1 ng/ml de FSH; les chambres 7, 8 et 9 sont périfusées avec du milieu contenant 5 ng/ml de FSH, ceci pendant le reste de la culture. Les chambres 1, 2 et 3 servent de témoins et reçoivent du milieu ne contenant pas de FSH. Du milieu périfusé est recueilli toutes les demi-heures pendant une demi-heure dès le début de la culture pour le dosage des stéroïdes.

A la fin de la culture, les follicules sont ôtés des chambres et placés dans du Bouin pour leur préparation à l'observation histologique.

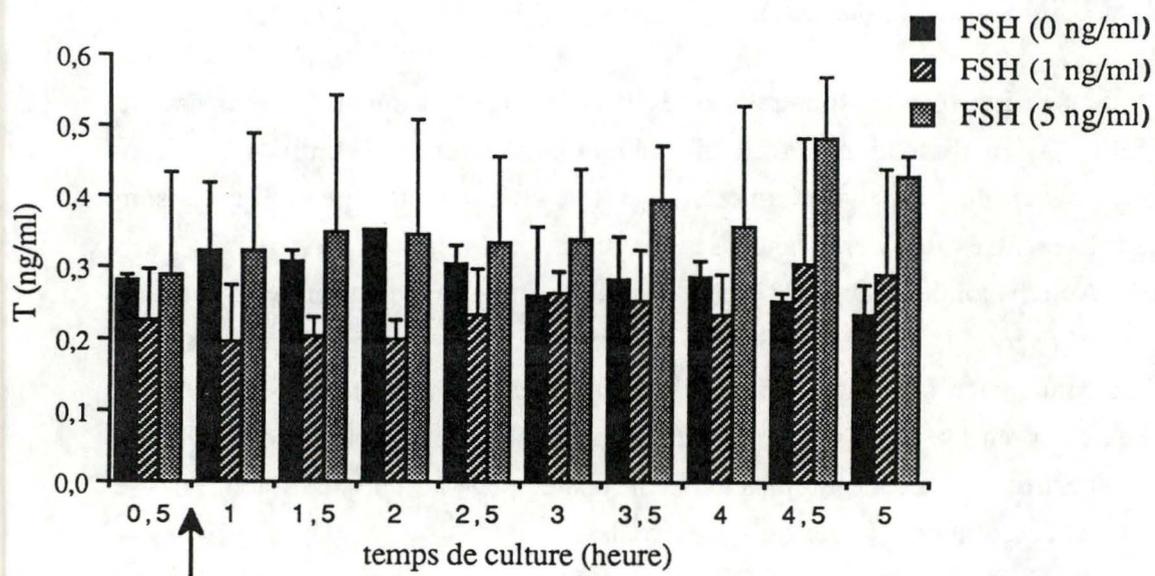
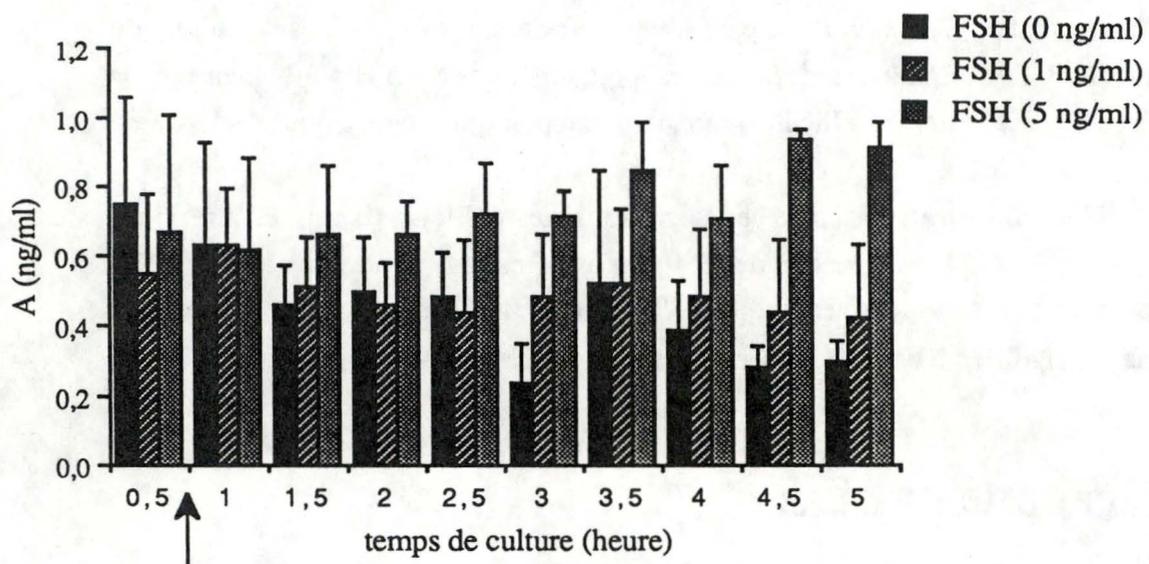


FIGURE 29: Sécrétions moyennes d'androsténone et de testostérone en fonction du temps de culture. La flèche représente le moment de l'ajout de FSH.

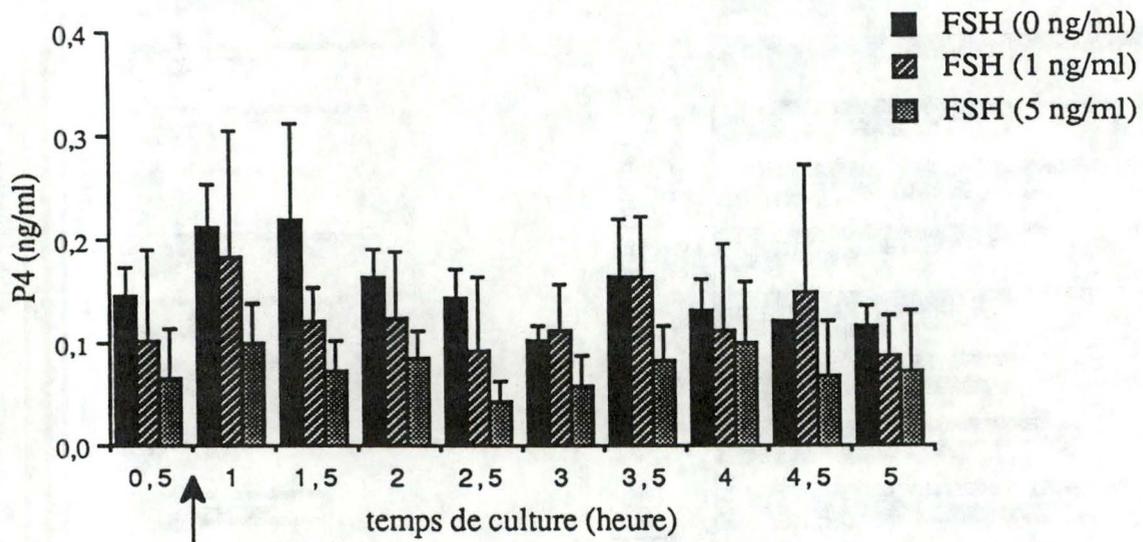
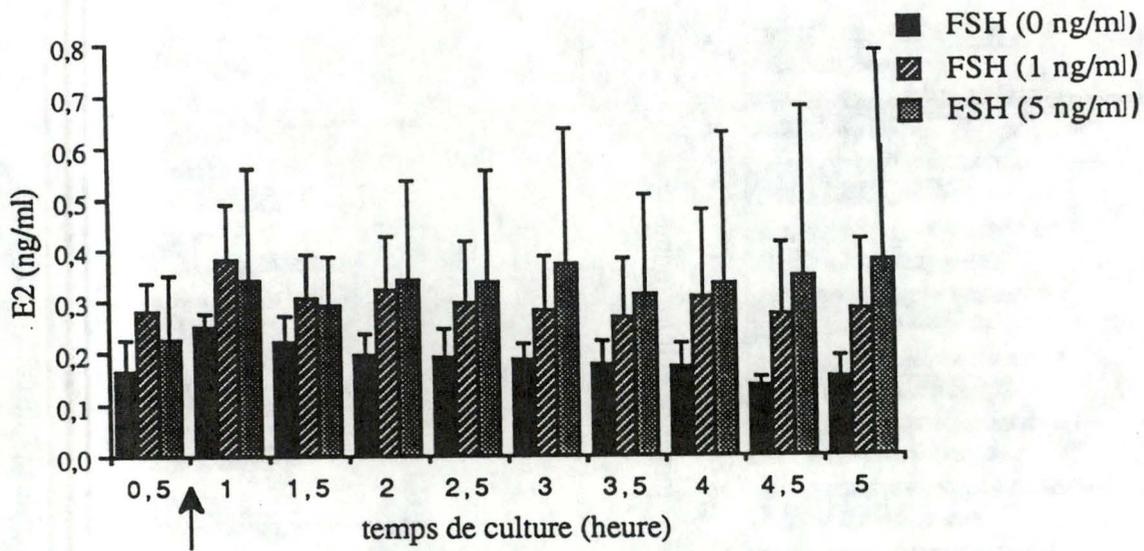
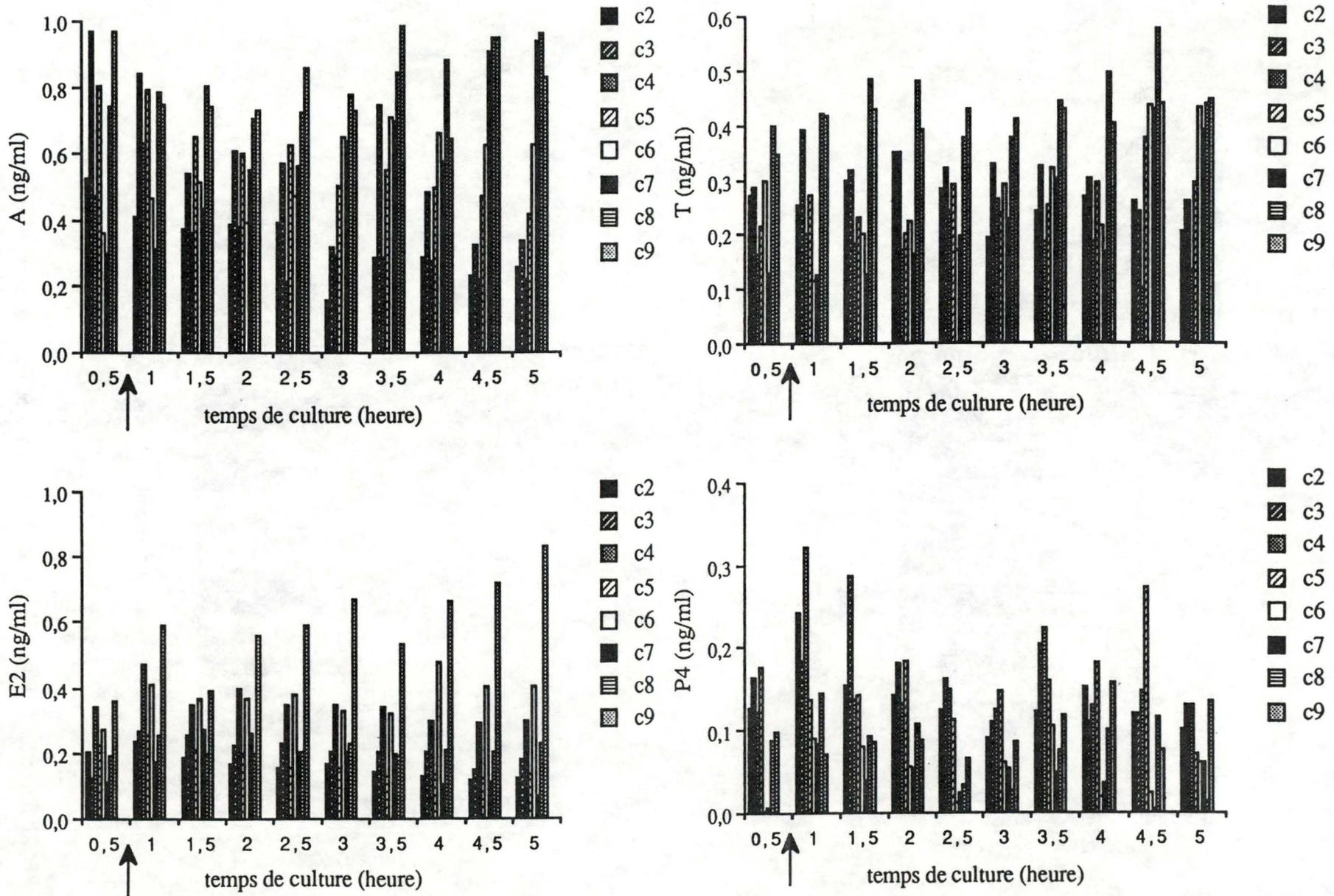


FIGURE 30: Sécrtions moyennes d'oestradiol et de progestérone en fonction du temps de culture. La flèche représente le moment de l'ajout de FSH.

FIGURE 31: Sécrétions par follicules des 4 stéroïdes en fonction du temps de culture.
La flèche représente le moment de l'ajout de FSH.



7.3.RÉSULTATS.

La survie est totale après 5 heures de culture.

Les sécrétions du follicule 1 n'ont pas été prises en compte dans les résultats car elles étaient très supérieures à celles des autres. La différence était surtout marquée pour l'E₂, le follicule 1 sécrétant dès le début de la culture 1,06 ng/ml d'E₂ contre 0,11 à 0,36 ng/ml pour les autres follicules et maintenant sa sécrétion tout au long de la culture. Seul les follicules 2 et 3 serviront donc de témoins.

Un test statistique réalisé sur les sécrétions observées à l'heure 0,5, avant l'ajout de la FSH, n'a pas montré de différence significative entre les sécrétions moyennes des 3 lots de follicules. Une certaine variabilité entre les follicule est cependant observée.

La figure 29 représente les sécrétions moyennes d'A et de T sont plus importantes avec le milieu contenant 5 ng/ml de FSH qu'avec ceux n'en contenant qu'1 ng/ml ou pas du tout. Un test statistique a montré que les différences observées après l'ajout de la FSH pour ces sécrétions sont significatives entre les follicules qui ont reçu la dose de 5 ng et les témoins (A: $P < 0,01$; T: $P < 0,05$), mais pas entre ceux soumis à la dose de 1 ng et les témoins. Pour l'A, les follicules non soumis à la FSH ou à la dose de 1 ng/ml présentent une sécrétion qui diminue entre l'heure 0,5 et l'heure 5, ceux qui reçoivent la dose de 5 ng/ml montrent une augmentation. La sécrétion de T reste sensiblement identique entre ces deux heures, sauf pour la dose de 5 ng/ml ou une augmentation est observée.

La sécrétion moyenne d'E₂ (figure 30) est plus élevée quand le milieu contient 1 et 5 ng/ml de FSH. Les différences entre les sécrétions du lot témoin et celles des deux lots stimulés sont significatives (1 ng/ml: $P < 0,01$; 5 ng/ml: $P < 0,05$). On n'observe pas d'augmentation importante de la sécrétion entre l'heure 0,5 et l'heure 5 pour les follicules soumis à la dose de 1 ng/ml de FSH, mais bien pour la dose de 5 ng/ml.

La sécrétion de P₄ montre une variation importante dans le temps. Elle est significativement plus faible entre les heures 1 et 2,5 de la culture pour le lot soumis à la dose de 5 ng/ml de FSH ($P < 0,01$).

Pour le lot recevant 5 ng/ml de FSH, le follicule 9 (figure 31) montre une sécrétion d'E₂ qui augmente de l'heure 0,5 à l'heure 5, alors que chez le follicule 8

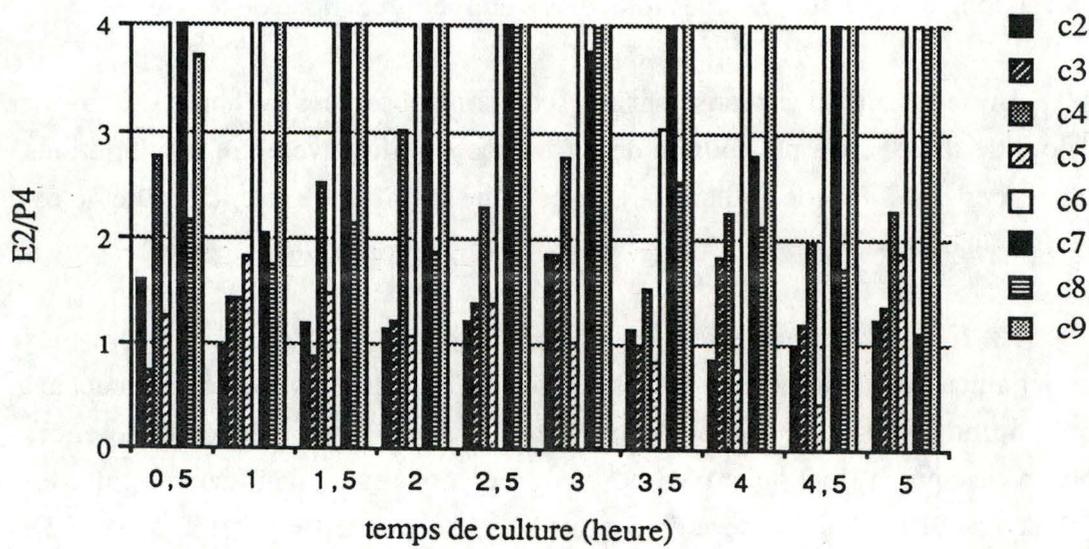


FIGURE 32: Rapport des concentrations E₂/P₄ par follicules, en fonction du temps de culture.

cette sécrétion reste constante et que, chez le follicule 7, elle augmente après l'ajout de FSH pour diminuer par la suite. Les follicules des deux autres lots présentent une sécrétion qui a tendance à diminuer, sauf pour le follicule 6 ou elle augmente et le 3 ou elle diminue après une augmentation.

La sécrétion d'A diminue entre l'heure 0,5 et 5 chez les follicules 2, 3, 4 et 5; augmente chez les follicules 6, 7 et 8; et se maintient pour le 9.

La T ne présente pas d'évolution particulière dans ses sécrétions, sauf pour les follicules 7, 8 et 9 ou elle a tendance à augmenter et à se maintenir.

Une variabilité importante, entre les follicules ainsi que dans le temps, est observée pour la P4.

Les follicules 4, 6, 7, 8 et 9 montrent un rapport $E_2/P_4 > 1$ tout au long de la culture alors que pour les follicules 2, 3 et 5 celui-ci est parfois < 1 (figure 32).

CHAPITRE IV: DISCUSSION.

1. TEMPERATURE DE TRANSPORT.

Au cours de l'essai 2, une meilleur survie des follicules est obtenue pour les ovaires transportés à 38°C plutôt qu'à 4°C. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les ovaires de brebis sont des organes qui dans l'organisme restent à une température constante de 38°C et supporteraient mal, de ce fait, des écarts trop grands de température. Au moment de la dissection, il y aurait moins de follicules sains à la surface des ovaires transportés à 4°C, ces follicules ayant entrepris le processus d'atréisie. Cependant, certains auteurs transportent, stockent et disséquent les ovaires à la température de 4°C et obtiennent de bons résultats (Bahr et al., 1980; Skinner et Osteen, 1988). Il se pourrait que lors de ces essais, les ovaires ne soit maintenus que peu de temps à cette température; dans notre cas, le transport de l'abattoir d'Anderlecht à Namur est assez long. D'autres auteurs travaillent à la température de la pièce ou à 38°C plutôt qu'à 4°C (Anderson et al., 1988; Terqui et al., 1988; Tonetta et al., 1988). Timmermans (résultats non publiés) a montré que le transport d'ovaires à une température inférieure à 20°C réduit très fort le nombre d'ovocytes (entourés de leur cumulus) qui peuvent maturer *in vitro*. De basses températures entraînent certainement des lésions au niveau de l'ovocyte, mais peut-être aussi au niveau des cellules de la granulosa, qui interviennent également lors de la maturation de l'ovocyte.

L'effet de la température sur la survie n'est pas clair. Il se pourrait que la survie plus faible observée pour les follicules refroidis à 4°C, comme il sera discuté plus tard, soit due au fait que les follicules étaient placés par 4 dans les chambres. Il serait dès lors intéressant de réaliser la même expérience en ne plaçant qu'un follicule par chambre.

Contrairement à ce qui se passe pour la survie, la sécrétion stéroïdienne est apparemment plus importante chez les follicules refroidis à 4°C. La différence n'est significative que pour l'E₂. Cependant, comme le montre la figure 18, 2 des chambres contenant les follicules refroidis à 4°C présentent, en début de culture, une sécrétion importante d'E₂. Ces deux chambres contenaient peut être des follicules possédant des capacités de stéroïdogénèse plus importantes que les autres follicules, ce qui aurait provoqué cette sécrétion importante d'E₂. Lors de l'expérience 7, on a également observé un follicule, qui dès la première demi-heure de culture, sécrétait de grandes quantités d'E₂. Webb et al. (1989) ont d'ailleurs observé la présence sur l'ovaire de brebis de follicules qu'ils ont appelés oestrogènes actifs. Ces follicules ont la capacité, *in vitro*, de sécréter plus d'E₂ que

les autres follicules du même ovaire. Jacques (1989) a également montré l'existence de populations de follicules possédant des capacités différentes de stéroïdogénèse.

2. COMPOSITION DU MILIEU.

La 3^{ème} culture, réalisée avec du milieu contenant du sérum de veau foetal (2% v/v), montre une meilleure survie que les précédentes réalisées sans sérum. Les deux follicules sains à la 25^{ème} heure sont en faveur d'un temps de survie qui pourrait être supérieur. Ce meilleur résultat est certainement dû aux facteurs de croissance présents dans le sérum qui auront stimulé favorablement les follicules.

La 4^{ème} culture, réalisée dans les mêmes conditions que la 3^{ème}, montre aussi une survie totale jusqu'à la 10^{ème} heure, mais plus faible par la suite. Ce qui pourrait être dû au temps écoulé entre la récolte des ovaires et la dissection des follicules. Les brebis étant peu nombreuses ce jour-là à l'abattoir, le temps nécessaire à la récolte d'un nombre suffisant d'ovaires fut plus long. De plus, des problèmes rencontrés sur le chemin du retour ont augmenté le temps de transport. Les ovaires sont donc restés plus longtemps stockés avant la dissection et les follicules ont peut-être plus souffert.

Comme pour la température, l'effet observé du sérum de veau foetal sur la survie n'est pas concluant. La réalisation de cultures de follicules isolés et de plus longue durée avec du milieu additionné ou non de sérum de veau foetal devrait mieux mettre cet effet en évidence. On peut en effet, de cette manière, suivre l'état physiologique du follicule en se basant sur ses sécrétions, et ainsi cerner le moment du début de son atresie.

Il est difficile, suite aux différences observées entre les résultats des cultures 3 et 4, de tirer des conclusions quand à l'effet de l'addition de sérum de veau foetal au milieu sur les sécrétions.

On remarque, pour la culture 4, des sécrétions d'A, T et E₂ plus faibles et de P₄ plus élevées que pour la culture 3. L'atresie plus importante observée lors de la culture 4 serait à mettre en rapport avec ces différences de sécrétions, en effet l'atresie entraîne une chute de la sécrétion d'E₂ et une augmentation de celle de P₄.

On peut cependant remarquer que pour ces cultures 3 et 4, la sécrétion d'E₂ est significativement plus élevée que lors de la 2^{ème}, cette sécrétion est peut-être plus sensible à un effet du sérum. Celui-ci, par les facteurs de croissance qu'il contient, est connu pour stimuler la stéroïdogénèse (Skinner et Osteen, 1988).

3. EVOLUTION DES SECRETIONS AU COURS DES CULTURES.

Les figures 18, 21, 22, 25 et 28 indiquent que les sécrétions de stéroïdes pour les différentes chambres ne montrent généralement pas d'évolution précise au cours des 25 heures d'incubation, mais ont toutefois tendance à augmenter ou à rester relativement constantes. On n'observe en tout cas pas de diminution exponentielle, ce qui correspondrait à une diffusion simple des stéroïdes du fluide folliculaire vers le milieu jusqu'à épuisement de ceux-ci. Un tel système de culture semble donc bien approprié pour l'étude des sécrétions de follicules entiers, capables de sécréter activement les stéroïdes. Ceci est en accord avec les observations de Bahr et al. (1980) qui ont montré qu'un tel système de culture permet une sécrétion active des stéroïdes et non pas seulement un simple processus de diffusion passive. Ces auteurs ont également montré que des substances introduites dans la chambre ou sécrétées par le follicule sont éliminées suivant un mode de clearance typique qui dépend du volume et du débit du milieu dans la chambre. Le système de périfusion est donc un bon modèle pour des études de cinétique de sécrétion. Il permet aussi l'étude au cours du temps de l'influence de certaines substances sur les follicules, lorsqu'elles sont ajoutées de manière continue ou sous forme de pulses, ce qui est difficilement réalisable par une technique d'incubation statique.

4. COMPARAISON ENTRE L'OBSERVATION HISTOLOGIQUE ET LES SECRETIONS.

Les cultures réalisées en plaçant 4 follicules par chambre ne permettent pas une étude correcte des relations qui existent entre l'état physiologique des follicules et leurs sécrétions. Dans ce cas, en effet, des follicules de taille et d'état différents se trouvaient dans une même chambre. De plus les sécrétions de chaque chambre représentent une moyenne de sécrétion de ces follicules. L'observation histologique pouvait ne montrer qu'un follicule sain alors que les sécrétions restaient importantes, voir supérieur à celles d'une chambre avec 2 follicules sains ou plus. C'est ainsi que lors de l'essai 3, la chambre 4 ne contenait plus qu'un follicule sain à l'heure 20 alors que les sécrétions d'E₂ et de P₄ augmentèrent. Le follicule sain avait un diamètre de 6 mm et sécrétait certainement la plus grande partie de l'E₂ dosée, la P₄ provenant plutôt des follicules atrétiques.

Les cultures 5 et 6, à un seul follicule par chambre, montrent par contre une bonne corrélation entre l'état physiologique des follicules et leurs sécrétions (figures 27 et 31).

La sécrétion d'E₂ des follicules déterminés sains par l'observation histologique est supérieure, dès la 5^{ème} heure de culture, à celle des atrétiques; elle augmente ou se maintient pendant toute la durée de la culture. Cette observation est en accord avec le fait qu'un follicule antral sain possède une activité aromatasique élevée (Moor et al., 1979: cités par Webb et al., 1989).

Les follicules atrétiques secrètent significativement moins d'E₂ que les follicules sains. Une faible production d'E₂ par les follicules atrétiques a déjà été démontrée (Tsonis et al., 1984; Terqui et al., 1988); elle est due à la disparition de l'enzyme aromatasase dès les premiers stades de l'atrésie.

Cependant, les follicules atrétiques conservent la capacité de sécréter de la P₄ et des androgènes. Ce qui a été observé par Terqui et al. (1988). Ceux-ci ont également montré que ces follicules conservent une certaine sensibilité aux hormones gonadotropiques tout au long de la périfusion. Lors des cultures 5 et 6, on observe bien que les follicules atrétiques secrètent peu d'E₂ mais que leurs sécrétions d'A, T et P₄ restent semblables à celles des follicules sains. Ce qui suggère que l'atrésie entraîne bien une chute de l'activité aromatasase, donc de la production d'E₂, mais que les autres stéroïdes sont toujours sécrétés normalement.

Les follicules atrétiques des essais 5 et 6 secrètent peu d'E₂ dès la 5^{ème} heure et maintiennent cette faible sécrétion pendant toute la durée de la culture; cela semble indiquer que ces follicules étaient atrétiques avant leur mise en culture, ou avaient déjà entamer le processus d'atrésie.

Le rapport E₂/P₄ défini par Bellin et Ax (1984) est bien en relation avec l'état physiologique des follicules. Ce rapport est > 1 pour les follicules sains et < 1 pour les atrétiques (figures 24 et 27).

Les follicules en atrésie précoce présentent un rapport qui reste proche de 1 montrant que l'activité aromatasase chute rapidement mais pas totalement.

Les cultures réalisées avec 4 follicules par chambre, on observe que soit les follicules sont sains, soit ils sont atrétiques; mais on n'observe pas d'état intermédiaire. On peut cependant observer des atrésies précoces ou des lésions de la granulosa au cours des essais 5 et 6 réalisés en plaçant un seul follicule par chambre. Ceci suggère que des interactions de type paracrine se soient produites entre les follicules d'une même chambre lors des 4 premiers essais. Un follicule ayant atteint un stade de maturation suffisant peut, selon l'hypothèse de l'élimination active (voir chapitre 2.4.2.), sécréter des facteurs inhibant la

TABLEAU 4: Somme des survies observées au cours du temps pour les cultures 3 et 4 ainsi que 5 et 6.

Temps de culture (heures)	cultures 3 et 4	cultures 5 et 6
5	8/8	-
10	8/8	-
15	3/8	2/6
20	3/8	4/6
25	2/8	4/6

croissance des autres follicules. De telles interactions sont, pour certains auteurs, possibles *in vitro* (Terqui et al., 1988).

Pour les cultures 5 et 6, les figures 21 et 22 montrent que les follicules qui présentent des lésions de la granulosa mais dont le reste de la granulosa est sain, gardent la capacité de sécréter de grandes quantités d'E₂, le rapport E₂/P₄ est d'ailleurs > 1; ces follicules peuvent donc être considérés comme sains. On obtient ainsi pour la survie, un nombre de 1, 2 et 1 follicules sains aux heures 15, 20 et 25 pour la culture 5 et de 1, 2, 3 pour la culture 6 sur les trois follicules ôtés de leur chambre à ces heures. Si on compare la somme des survies des cultures 3 et 4 à celle des cultures 5 et 6 (tableau 4), on remarque que cette survie est supérieure lors des cultures de follicules isolés. Ceci pourrait renforcer l'hypothèse que des interactions paracrines peuvent influencer la survie des follicules.

5. EFFETS DES STIMULATIONS.

Les deux doses de FSH (1 et 5 ng/ml) utilisées lors de l'essai 7 maintiennent de façon significative les sécrétions moyennes d'E₂ plus élevées que celles enregistrées pour les follicules témoins. Cette observation concorde bien avec le fait que la FSH stimule la sécrétion d'E₂ aussi bien *in vivo* (Bister, 1982) qu'*in vitro* (Roy et Greenwald, 1987).

En fait, l'apport de FSH ne provoque pas d'augmentation marquée des sécrétions d'E₂, mais maintient ces sécrétions à un niveau constant, alors qu'avec les follicules témoins on observe une diminution. Seul le follicule 9 présente une augmentation importante, peut être parce qu'il est plus sensible à la FSH.

Il est possible que l'absence de hausse importante de la sécrétion d'E₂ soit due aux doses de FSH utilisées qui sont faibles. Elles ne dépassent pas en effet le taux de base observé chez l'animal qui est de 5 à 6 ng/ml de FSH (Derivaux et Ectors, 1986). En général, les auteurs utilisent des concentrations en FSH ≥ 10 ng/ml. Roy et Greenwald (1987) ont utilisé des doses de 1, 5 et 25 ng/ml et n'ont observé un effet significatif que pour la dose de 25 ng/ml.

L'A et la T sont sécrétées en plus grande quantité par les follicules soumis à la dose de 5 ng/ml de FSH. Cet effet de la FSH a déjà été observé *in vitro* par Roy et Greenwald (1987) pour l'A et par Terqui et al. (1988) pour la T.

La FSH n'a apparemment pas d'effet sur la sécrétion de P₄, celle-ci varie dans le temps mais reste cependant proche d'une même valeur. Skinner et al. (1988) ont d'ailleurs montré que la FSH diminue la sécrétion de P₄ par les cellules

de la granulosa provenant de petits et de moyens follicules, mais n'avait pas d'effet sur ces mêmes cellules provenant de gros follicules. Terqui et al. (1988) ont observé une sécrétion plus importante de P4 par des follicules stimulés avec de la FSH.

Nos résultats montrent que pour la dose de 5 ng/ml de FSH une hausse de la sécrétion d'E2 est accompagnée d'une hausse de celles d'A et de T, ainsi que d'un maintien de celle de P4.

Or, la P4 est formée à partir du cholestérol pour être ensuite transformée en androgènes qui donneront pour finir l'E2.

Nos résultats suggèrent donc que la FSH aurait un effet stimulateur sur la sécrétion de ces 4 stéroïdes.

Si l'effet était localisé à une des étapes de la stéroïdogénèse, l'augmentation d'un stéroïde s'accompagnerait d'une diminution d'un ou des stéroïdes se trouvant à une étape antérieure de la voie métabolique.

Cependant, ce 7^{ème} essai a été réalisé avec des doses de FSH assez faibles et sur un petit nombre de follicules. Des essais réalisés avec une dose plus élevée de FSH, sur un plus grand nombre de follicules permettraient de vérifier nos résultats.

6. VALEUR DE LA TECHNIQUE.

A la vue des résultats discutés précédemment, nous pouvons conclure que la technique permet de maintenir en vie des follicules pendant une durée d'au moins 25 heures, ainsi qu'une sécrétion active des stéroïdes par les follicules sains. Il est également possible par cette technique de réaliser des études de la cinétique des sécrétions, par exemple, lors d'une stimulation hormonale. On peut aussi observer, lors des cultures de follicules isolés, le maintien d'une relation entre l'état physiologique du follicule et ses sécrétions.

CONCLUSIONS.

La technique de culture *in vitro* de la périfusion montre, pour cette première approche au laboratoire, de bons résultats et permettra, après avoir vérifié certains points, de réaliser les études envisagées sur la physiologie des follicules. Dès à présent, nous pouvons tirer les conclusions suivantes.

Cette technique permet de maintenir des follicules en vie pendant une durée d'au moins 25 heures.

Une certaine dynamique dans la sécrétion des stéroïdes a été observée, montrant qu'il y a bien synthèse de ceux-ci par les follicules. De plus, les follicules sains présentent une sécrétion importante d'E₂ tout au long de la culture, ce qui n'est pas observé chez les follicules atrophiques.

Chez les follicules atrophiques, la sécrétion d'E₂ diminue tandis que celle des autres stéroïdes se maintient, l'atrophie semble donc bien être associée à une perte de l'activité aromatisique tandis que l'activité des autres enzymes ne semblent pas affectée.

Lors des cultures réalisées avec un follicule par chambre, on observe une bonne relation entre l'état physiologique des follicules et leurs sécrétions.

Les résultats des cultures réalisées avec des stimulations à la FSH suggèrent que celle-ci agit à trois niveaux de la voie de synthèse des stéroïdes. Elle stimulerait la synthèse de la P₄, des androgènes et de l'E₂.

Les effets de la température de transport et du sérum de veau foetal sur la survie et sur les sécrétions ne sont pas clairs et demandent à être vérifiés.

Il semblerait qu'il soit préférable de réaliser les cultures avec 1 seul follicule par chambre et ce pour éviter les éventuelles régulations paracrines qui pourrait exister entre les follicules.

BIBLIOGRAPHIE.

- ACRITOPOULOU S., HARESIGN W., FOSTER J.P. et LAMMING G.E., 1977. Plasma progesterone and LH concentrations in ewes after injections of analogue of prostaglandin F₂. *J. Reprod. Fert.*, 49, 337-340.
- ANDERSON E., SALIG M., LEE G.Y. et LITTLE B., 1988. An in vitro study of the effects of androgens on the cytoskeleton of ovarian granulosa cells with special reference to actin. *Tissue & Cell*, 20, 855-874.
- ARMSTRONG D.T., DANIEL S.A.J. et GORE-LONGTON R.E., 1987. Intra-ovarian actions of steroids in regulation of follicular steroid biosynthesis. Dans: *Endocrinology and physiology of reproduction* (LEUNG P.C.K., ARMSTRONG D.T., RUF K.B., MOGER W.H. et FRIESEN H.G., eds), p.177-195, Plenum press, New York.
- BAHR J., GARDNER R., SCHENEK P. et SHAHABI N., 1980. Follicular steroidogenesis: effect of reproductive condition. *Biol Reprod*, 22, 817-826.
- BELLIN M.E. et AX R.L., 1984. Chondroitin sulfate: an indicator of atresia in bovine follicles. *Endocrinology*, 114, 428-434.
- BICSAK H.A., TUCKER E.M., CAPPEL S., VAUGHAN O., RIVIER J., VALE W. et HSUCH A.J.W., 1986. Hormonal regulation of granulosa cell inhibine biosynthesis. *The endocrine society*, 119, 2711-2718.
- BISTER J.L. et PAQUAY R., 1983. Fluctuation in the plasma levels of the follicle-stimulating hormone during oestrus cycle, anoestrus, gestation and lactation in the ewe: evidence for an endogenous rhythm of FSH release. *Theriogenology*, 25, 53-70.
- BISTER J.L., 1980. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences: Influence de la photopériode sur la physiologie de la reproduction de la brebis Texel. *Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur*.
- BISTER J.L., 1982. Cycle sexuel des mammifères femelles. *Probiorevue*, 5, 167-182.

- BISTER J.L., 1989. Physiologie spéciale 2., Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur.
- BRÄNNSTRÖM M., 1988. Mechanism of ovulation. Studies using the in Vitro perfused rat ovary. Department of physiology. University of Göteborg.
- CAHILL L.P. et MAULEON P., 1980. Influence of season, cycle and breed on follicular growth rate in sheep. *J. reprod. fert.*, 58, 321-328.
- CALLENSSEN H., GREVE T. et HYTTEL P., 1986. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology*, 25, 71-86.
- CHAN W.K. et TAN C.H., 1987. Induction of aromatase activity in porcine granulosa cells by FSH and cyclic AMP. *Endocrine Research*, 13, 285-299.
- CORREDOR A. et FLICKINGER G.L., 1983. Hormonal regulation of progesterone secretion by cultured mouse granulosa cells. *Biol Reprod*, 29, 1142-1146.
- DARGA N.C. et REICHERT L.F., 1979. Evidence of a low molecular weight follitropin binding inhibitor in bovine follicular fluid. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 112, 283-288.
- DERIVAUX J. et ECTORS F., 1986. *Reproduction chez les animaux domestiques*. Cabay, Louvain la Neuve, troisième édition.
- DiZEREGA G.S. et HODGEN G.D., 1980. The primate ovarian cycle: suppression of human menopausal gonadotrophin-induced follicular growth in the presence of the dominant follicle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 50, 819-825.
- DiZEREGA G.S. et HODGEN G.D., 1981. Folliculogenesis in the primate ovarian cycle. *Endocr. Rev.*, 2, 27-49.
- DiZEREGA G.S., ARRS R.P., ROCHE P.C., CAMPEAU J.D. et KLING O.R., 1983. Identification of proteins in pooled human follicular fluid which suppress follicular response to gonadotrophins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 56, 35-41.

DIZEREGA G.S., GOEBELSMANN U. et NARAMURA K., 1982. Identification of protein(s) secreted by the preovulatory ovary which suppresses the follicular response to gonadotrophins. *J. Reprod. Fert.*, 80, 207-212.

DRIANCOURT M.A. et CAHILL L.P., 1984. Preovulatory follicular events in sheep. *J. reprod. fert.*, 71, 205-211.

DRIANCOURT M.A., CAHILL C.P. et BINDON B.M., 1985. Ovarian follicular population and preovulatory enlargement in Booroola and control Merino ewes. *J. Reprod. Fert.*, 73, 93-107.

DRIANCOURT M.A., FRY R.C., CLARKE I.J. et CAHILL L.P., 1987. Follicular growth and regression during the 8 days after hypophysectomy in sheep. *J. reprod. fert.*, 79, 635-641.

DRIANCOURT M.A., GIBSON W.R. et CAHILL L.P., 1984. Follicular dynamics throughout the oestrus cycle in sheep. A review. *Reprod. Nutr. Develop.*, 25, 1-15.

DUFOUR J., CAHILL L.P. et MAULEON P., 1979. Short and long term effects of hypophysectomy and unilateral ovariectomy on follicular population in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, 57, 301-309.

ERICKSON G.F., MAGOFFIN D.A., DUER C.A. et HOFEDITZ C., 1985. The ovarian androgen producing cells: a review of structure-function relationships. *Endocrine reviews*, 6, 371-399.

FENG P., CATT K.J. et KNECHT M., 1988., Transforming growth factor- β stimulates meiotic maturation of the rat oocyte. *Endoc.*, 122, 181-186.

FINNEY D.J., 1976. Radioland Assay., *Biometrics*, 32, 721-740.

FORTUNE J.E. et VINCENT S.E., 1983. Progesterone inhibits the induction of aromatase activity in rat granulosa cells in vitro. *Biol. Reprod.*, 28, 1078-1089.

FRANCHIMONT P., DRIANCOURT M.A., THILBAULT C., LOUMOYE E. et HODGEN G-D., 1986. Voyage à l'intérieure du follicule. *Gyn. Obs.*, 159, 8-11.

FULKA J., MOTLIK J. et LEFEVRE B., 1989. Les cellules sexuelles. *La Recherche*, 213, 1020-1030.

GELDAR H., DOWN G.J., SCARAMUZZI R.J., HOSKINSON R.M., COX R.I. et BEELS C.M., 1984. Immunisation of ewes with polyandroalbumin to improve fecundity. *Aust. Veter. J.*, 61, 4, 130.

GOSPODARONVICZ D., VLODAVSKY I., BIALECKI H. et BROWN K.D., 1978. The control of proliferation of ovarian cells by the epidermal and fibroblast growth factors. *Reproductive Physiology.*, 108, 178.

GRUMMER R.R. et CARROLL D.G., 1988. A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian function. *J. Anim. Sci.*, 66, 3160-3173.

HARTSHORNE G.M., 1988. Effects of growth factors on the differentiation of granulosa cells. *Research in reproduction*, 20, 2-3.

HUBBARD J.C. et PRICE J., 1988. The effect of follicle stimulating hormone and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate on cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase and resumption of meiosis in hamster cumulus-oocyte complexes. *Biol reprod*, 39, 829-838.

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.

JUNQUEIRA L.C., MAGOFFIN D.A. et LONG J.A., 1986. Basic histology. Appelton-Century-Crofts, Norwalk, (5^{ème} édition).

LIEBERMAN M.E., AHREN K., TSAFRIRI A., BAUMINGER S. et LINDNER H.R., 1975. Relationship between glycolysis and steroidogenesis in cultured graafian follicles stimulated by LH or prostaglandin E₂. *Journal of Steroid Biochemistry*, 6, 1445-1449.

- MAY J.V., FROST J.P. et SCHOMBERG D.W., 1988. Differential effects of epidermal growth factor, somatomedine-c, insuline-like growth factor I and transforming growth factor- β on porcine granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation. *Endoc.*, 123, 168-179.
- McNATTY K.P., GIBB M., DOBSON C. et THURLEY D.C., 1981. Evidence that changes in luteinizing hormone secretion regulate the growth of the preovulatory follicle in the ewe. *J. endoc.*, 90, 375-389.
- McNEILLY 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.
- MONDSCHHEIN J.S., CANNING S.F. et HAMMOND J.M., 1988. Effects of transforming growth factor- β on the production of immunoreactive insuline-like growth factor I and progesterone on [3 H] thymidine incorporation in porcine granulosa cell culture. *Endoc.*, 122, 1970-1976.
- NOEL B., 1989. Etude de l'action de la PMSG sur les mécanismes d'ovulation de la brebis Suffolk. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de licencié en sciences biologiques. F.N.D.P. Namur.
- OUSSAID 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.
- PELLICER A., PARMER T., STOANE J.M. et BEHRMON H.R., 1989. Desensitization to follicle stimulating hormone in cumulus cells is coincident with hormone induction of oocyte maturation in the rat follicle. *Molecular and cellular endocrinology*, 64, 179-188.
- PHILIPPON P., 1988. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de licencié en sciences agronomiques: vaccination contre l'androstènedione de brebis Merinos d'Arles: Effet sur le taux d'ovulation dans différents systèmes de conduite. Académie de Montpellier, France.

- PLACHOT M., 1989. La maturation ovocytaire. Contraception-fertilité-sexualité, 1988, 33-43.
- ROBERTSON H.A., 1977. Reproduction in the ewe and the goat. Dans: Reproduction in domestic animals. Ed: Cole H.H. et Cupps E.T., p 477-496. Academic Press. New York.
- ROY S.K. et GREENWALD G.S., 1987. In vitro steroidogenesis by primary to antral follicles in the hamster during the periovulatory period: Effects of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and prolactin. Biol reprod, 37, 39-46.
- ROY S.K. et GREENWALD G.S., 1989. Hormonal requirements for the growth and differentiation of hamster preantral follicles in long-term culture. J. reprod. fert., 87, 103-114.
- SKINNER M.K. et COFFEY R.J.Jr., 1988. Regulation of ovarian cell growth through factor- α by theca cells. Endoc., 123, 2632-2638.
- SKINNER M.K. et OSTEEN K.G., 1988. Developmental and hormonal regulation of bovine granulosa cell function in the preovulatory follicle. Endocrinology, 123, 1668-1675.
- SKINNER M.K., LOBB D. et DORRINGTON J.H., 1987. Ovarian thecal interstitial cells produce an epidermal growth factor-like substance. Endoc., 121, 1892-1899.
- TERQUI M., BERTHELOT F. et DRIANCOURT M.-A., 1988. Morphological and functional features of ovine follicles in perfusion with pulsatile hormone delivery. Reprod. Nutr. Develop., 28, 1093-1104.
- THIBAUT C., 1977. Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes? J. reprod. fert., 51, 1-15.
- THIBAUT C., SZÖLLÖSI D. et GERARD M., 1987. Mammalian oocyte maturation. Reprod. Nutr. Develop., 27, 865-896.

- TONETTA S.A. et DiZEREGA G.S., 1989. Intraovularian regulation of follicular maturation. *The endocrine society*, 10, 205-229.
- TONETTA S.A., YANAGIHARA D.L., DeVINNA R.S. et DiZEREGA G.S., 1988. Secretion of follicle-regulatory protein by porcine granulosa cells. *Biol reprod*, 38, 1001-1005.
- TSANG B.K., LI M. et CARNEGIE J.A., 1988. Microfilaments and FSH stimulation of rat granulosa cell steroidogenesis in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 83, 263-271.
- TSONIS C.G., CARSON R.S. et FINDLAY J.K., 1984. The relationships between aromatase activity, follicular fluid oestradiol-17 β and testosterone concentrations, diameter and atresia of individual ovine follicles. *J. Reprod. Fert.*, 72, 153-163.
- TSUIKI A., PREYER J. et HUNG T.T., 1988. Fibronectin and glycosaminoglycans in human preovulatory follicular fluid and their correlation to follicular maturation. *Human Reproduction*, 3, 425-429.
- VAN LOOK P.F.A., CLARKE I.J., DAVIDSON W.G. et SCARAMUZZI R.J., 1978. Ovulation and lambing rates in ewes actively immunized against androstenedione. *J. Reprod. Fert.*, 53, 129.
- WEBB R. et ENGLAND B.G., 1982. Identification of the ovulatory follicle in the ewe: associated changes in follicular size, thecal and granulosa cell luteinizing hormone receptors, antral fluid steroids, and circulating hormones during the preovulatory period. *Endocr.*, 110, 873-881.
- WEBB R. et GAULT I.K., 1984. Final maturation of the preovulatory follicle in the ewe. *Période péri-ovulatoire*. Ed: Sarot-Baroux J. et Thibault Ch., 21-31, Masson.
- WEBB R., GAULD I.K. et DRIANCOURT M.A., 1989. Morphological and functional characterisation of large antral follicles in three breeds of sheep with different ovulation rates. *J. Reprod. Fert.*, 87, 243-245.

ANNEXES.

TECHNIQUE HISTOLOGIQUE.

MANIPULATIONS.

A la fin de la culture, les follicules sont fixés dans du Bouin Hollande pendant une durée de 48 à 72 heures.

Les follicules sont ensuite préparés pour la réalisation des coupes; les étapes nécessaires à cette opération sont:

- déshydratation par 3 bains successifs de 30 min. dans du méthanol absolu,
- préparation à l'inclusion dans 3 bains successifs de 30 min. de toluol,
- inclusion dans 3 bains successifs de 30 min. de Surgipath,
- enrobage et préparation du bloc à la découpe,
- réalisation de coupes de 3 à 4 μm d'épaisseur,
- étalement des coupes sur lame.

Les coupes sont ensuite colorées d'après le schéma suivant:

- déparafinage dans 2 bains successifs de 3 min. dans du toluol,
- 2 bains de 3 min. dans du méthanol,
- 1 bain de 5 min. d'alcool iodé,
- 1 passage dans une solution de bisulfite de Na,
- rinçage à l'eau de source,
- 1 bain d'Hémalun d'une durée de 5 à 6 min.,
- rinçage à l'eau de source,
- différenciation dans l'alcool HCl: 1 à 3 min.,
- eau courante pendant 10 min.,
- 1 bain d'Erythrosine d'une durée de 6 min.,
- rinçage à l'eau de source,
- différenciation dans l'alcool éthylique à 70° pendant 2 à 3 min.,
- déshydratation dans 2 bains d'alcool isopropylique absolu,
- 1 bain de Safran d'une durée de 6 à 8 min.,
- rinçage dans 3 bains d'alcool isopropylique absolu,
- passage dans 3 bains de toluol,
- montage de la lame couvre objet au D.P.X.

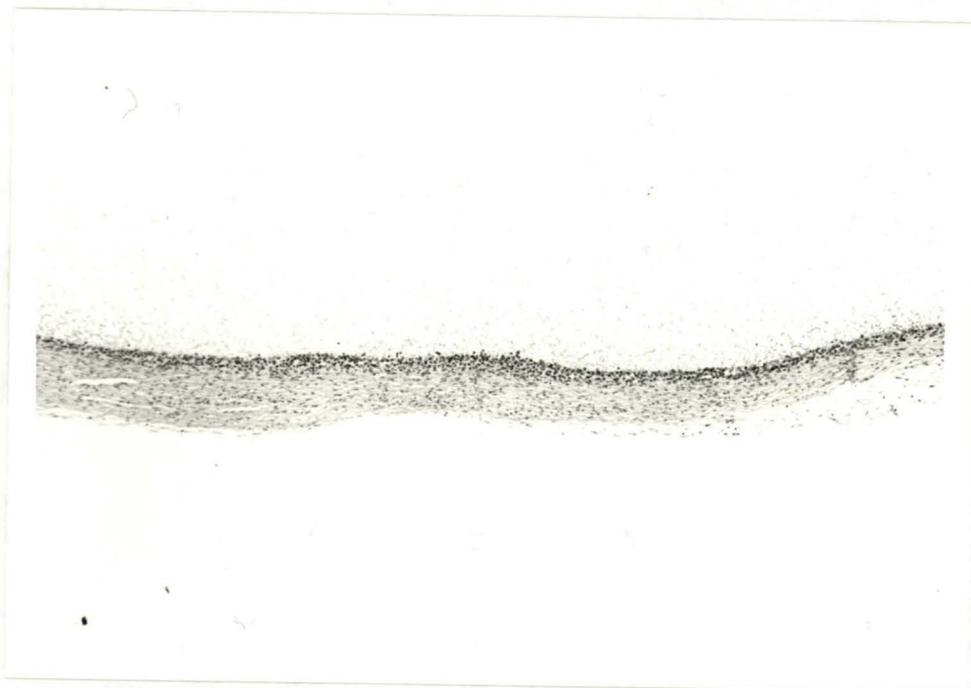


PHOTO 1: Granulosa de follicule sain.



PHOTO 2: Granulosa de follicule en atresie précoce.

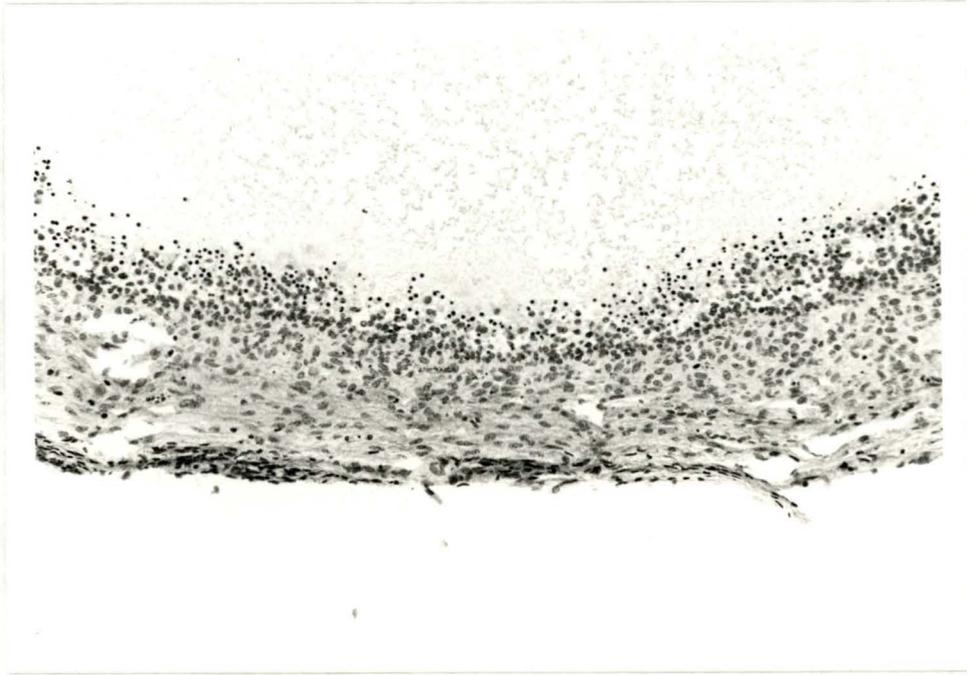


PHOTO 3: Granulosa de follicule en atresie avancée.

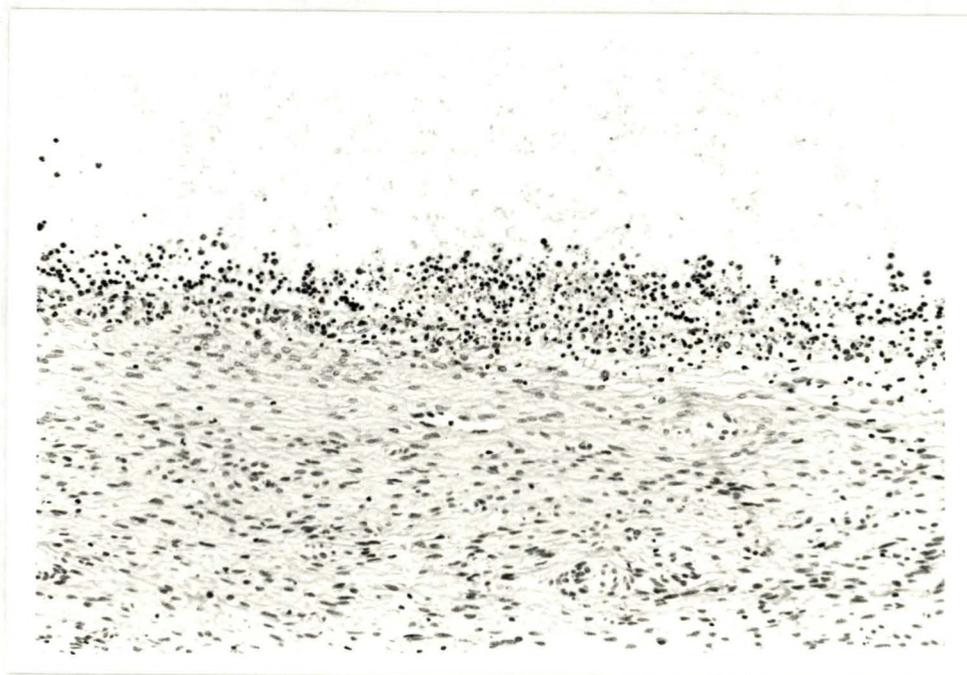


PHOTO 4: Granulosa de follicule en atresie tardive.