

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Mise en évidence de récepteurs hormonaux par autoradiographie sur les follicules ovariens de brebis: influence de la taille folliculaire et de traitements réalisés in vitro par des facteurs de croissance sur l'évolution de ces récepteurs

BOONEN, France

Award date:
1994

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.

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

**Mise en évidence de récepteurs hormonaux par autoradiographie
sur les follicules ovariens de brebis. Influence de la taille
folliculaire et de traitements réalisés *in vitro* par des facteurs de
croissance sur l'évolution de ces récepteurs.**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par
BOONEN France
1994**

Mise en évidence de récepteurs hormonaux par autoradiographie sur les follicules ovariens de brebis. Influence de la taille folliculaire et de traitements réalisés *in vitro* par des facteurs de croissance sur l'évolution de ces récepteurs.

BOONEN France

Résumé

Notre premier objectif était d'adapter la technique d'autoradiographie au Laboratoire en vue de détecter et de localiser les récepteurs aux gonadotropines (LH et FSH) et à l'IGF-I dans la thèque et la granulosa des follicules ovariens. Nous avons ensuite étudié l'influence de la taille des follicules sur l'évolution de ces récepteurs et sur les profils des sécrétions stéroïdiennes. Enfin, nous avons stimulé *in vitro* des follicules prélevés en phase folliculaire au milieu de la saison de reproduction par les facteurs de croissance IGF-I et EGF afin d'étudier les effets sur l'évolution des récepteurs ovariens. Nous aboutissons aux conclusions suivantes:

- les récepteurs à la FSH et à l'IGF-I sont localisés préférentiellement dans la granulosa de la plupart des follicules étudiés. La quantité de récepteurs à la LH par unité de surface dans la granulosa varie en fonction du stade de développement du follicule.
- la taille des follicules de diamètre supérieur à 2 mm n'a aucun effet sur la quantité de récepteurs à l'IGF-I. Par contre, on observe une augmentation du nombre de récepteurs aux gonadotropines.
- le nombre de récepteurs aux gonadotropines et à l'IGF-I dans la granulosa et la thèque des follicules stimulés *in vitro* par l'IGF-I augmente. L'EGF, quant à lui, exerce un effet inhibiteur sur l'évolution de ces récepteurs.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Décembre 1994

Promoteur : R. PAQUAY

Co-promoteur : J.-L. BISTER

Le mémoire de fin d'études est comme l'accomplissement de celles-ci et constitue pour l'étudiant le premier travail personnel qui déclenche le signal d'une prochaine entrée dans la vie professionnelle avec ses responsabilités, ses décisions, ses choix... C'est un moment important qui rend plus précieuse encore l'aide de tous ceux qui ont contribué à me conduire au terme de cette recherche et auxquels je voudrais ici exprimer toute ma reconnaissance.

Je remercie mon promoteur le Professeur R. Paquay, Directeur du Département de Physiologie Animale, qui m'a offert de son temps pourtant bien rare pour corriger mes épreuves et me communiquer par ses encouragements un peu de son dynamisme et de son énergie.

Le Docteur J.L. Bister a lui aussi lu mes premières rédactions en y notant des remarques utiles, je l'en remercie de même que le Docteur Bénédicte Noël qui a multiplié pour moi ses observations, explications et conseils, me fournissant une aide particulièrement efficace.

Parmi tous ceux qui m'ont épaulée, je cite également Mademoiselle Bernadette Perrad et je remercie très chaleureusement tous les membres du personnel du Laboratoire de Physiologie Animale et du Centre de Recherches Ovines de Faulx-les-Tombes qui n'ont refusé aucun effort pour me procurer régulièrement le matériel nécessaire.

Les explications du Docteur Monget de l'INRA (Nouzilly) et de ses collaborateurs sur la technique d'autoradiographie sont pratiquement à la base de la plus grande partie de mes manipulations. Sans eux, je n'aurais pu mener ma tâche à son terme de même que sans l'accueil toujours aimable des membres des laboratoires d'Histologie et de Biochimie Cellulaire qui ont mis à ma disposition, chaque fois que j'en avais besoin, leurs matériel et installations.

Le Professeur Leloup ne s'est peut-être pas aperçu que chacun de ses sourires et de ses clins d'oeil dans les couloirs de même que son intérêt pour l'avancement de mon mémoire ravivaient mon courage, je voudrais le lui dire et remercier également Raphaël pour tous ses conseils, ses encouragements et sa constante disponibilité.

La patience de Monsieur Lombet lors des séances de photos et celle de Marc pour me faire comprendre le fonctionnement difficile du logiciel du SUN sont des jalons précieux au long de la marche un peu forcée qu'est l'accomplissement d'un mémoire... Je ne les oublierai pas.

Je remercie ma maman qui a accompagné mes longues soirées de veille et d'étude de sa tendresse et de sa musique et avec elle toute ma famille qui a soutenu mes efforts, calmé mes angoisses, écouté mes plaintes et veillé sur ma santé.

Merci enfin à Luis, qui va sans doute faire avec moi une longue route, dont il a rendu beaucoup moins pénible, à mes côtés, ce bout de chemin difficile.

OBJECTIFS POURSUIVIS	1
-----------------------------------	---

PARTIE I: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Aperçus généraux concernant le cycle oestral de la brebis.....	2
I.1. Introduction.....	2
I.2. Description histologique de l'ovaire.....	2
I.3. Hormones impliquées lors du cycle oestral chez la brebis.....	3
I.3.1. L'hormone hypophysaire GnRH ou la gonadolibérine.....	3
I.3.1.1. Structure et mode d'action.....	3
I.3.1.2. Rôles.....	4
I.3.2. Les gonadotropines hypophysaires.....	4
I.3.2.1. Structure.....	4
I.3.2.2. Mode de sécrétion.....	4
I.3.2.3. Régulation de la sécrétion.....	5
I.3.2.4. Mode d'action.....	6
I.3.2.5. Rôles.....	6
I.3.3. Les hormones stéroïdiennes.....	7
I.3.3.1. Structure.....	7
I.3.3.2. La stéroïdogénèse et son contrôle.....	7
I.3.3.3. Emissions au cours du cycle.....	8
I.3.3.4. Mode d'action.....	9
I.3.3.5. Rôles.....	9
I.3.3.5.1. L'oestradiol (E ₂).....	9
I.3.3.5.2. La progestérone (P ₄).....	9
I.3.4. Les facteurs de croissance.....	10
I.3.4.1. Le système IGF (Insulin-like Growth Factor).....	10
I.3.4.1.1. Structure.....	10
I.3.4.1.2. Lieu de synthèse et évolution des taux sériques.....	11
I.3.4.1.3. Régulation de la synthèse.....	11
I.3.4.1.4. Les protéines de liaison (IGFBPs).....	12
I.3.4.1.4.1. Le grand complexe.....	12
I.3.4.1.4.2. Le petit complexe.....	13
I.3.4.1.4.3. Rôles des protéines de liaison.....	13
I.3.4.1.5. Rôles dans l'ovaire.....	14
I.3.4.1.5.1. Prolifération des cellules de la granulosa.....	14
I.3.4.1.5.2. Différenciation des cellules de la granulosa.....	14
I.3.4.1.5.3. Différenciation des cellules thécales.....	15
I.3.4.2. Le système EGF (Epidermal Growth Factor).....	15
I.3.4.2.1. Structure et synthèse.....	15
I.3.4.2.2. Rôles dans l'ovaire.....	15
II. Croissance, maturation et évolution folliculaires.....	17
II.1. La gamétogenèse.....	17
II.1.1. L'ovogenèse.....	17

II.1.2. La folliculogénèse.....	17
II.1.2.1. La folliculogénèse basale.....	17
II.1.2.2. La folliculogénèse terminale.....	19
II.1.2.2.1. Le recrutement.....	19
II.1.2.2.2. La sélection du follicule dominant.....	20
II.2. L'ovulation.....	21
II.3. L'atrésie folliculaire.....	21
II.4. Formation du corps jaune ou phase lutéale.....	22
III. Les récepteurs.....	23
III.1. Historique-Introduction.....	23
III.1.1. Action hormonale sur le noyau.....	23
III.1.2. Action hormonale sur des récepteurs membranaires.....	24
III.1.2.1. Les récepteurs liés aux canaux.....	24
III.1.2.2. Les récepteurs liés aux protéines G.....	24
III.1.2.3. Les récepteurs catalytiques.....	25
III.1.3. Action des grosses molécules lipophiles sur des récepteurs membranaires.....	25
III.2. Les récepteurs des gonadotropines.....	25
III.2.1. Structure.....	25
III.2.2. Interaction hormone-récepteur.....	26
III.2.3. Mode d'action des récepteurs.....	27
III.2.4. Régulation des récepteurs.....	27
III.2.5. Localisation, évolution et rôles des récepteurs au cours du cycle.....	29
III.3. Les récepteurs des IGFs.....	30
III.3.1. Le récepteur de type I.....	30
III.3.2. Le récepteur de type II.....	30
III.3.3. Rôles des récepteurs dans la médiation cellulaire.....	31
III.3.4. Régulation et répartition des récepteurs des IGFs dans l'ovaire.....	31
III.4. Le récepteur de l'EGF.....	32

PARTIE II: MATERIEL ET METHODES

I. Conditions expérimentales.....	33
II. Plans expérimentaux.....	33
II.1. Transport des follicules.....	33
II.2. Mise au point de la technique d'autoradiographie et étude comparative de la localisation des récepteurs dans les cellules de la thèque et de la granulosa.....	33
II.3. Recherche de l'influence de la taille des follicules sur la quantité de récepteurs.....	34
II.4. Influence des facteurs de croissance sur la quantité des récepteurs hormonaux.....	35
III. Techniques.....	35
III.1. Préparation du milieu de culture.....	35
III.2. Dissection des follicules.....	36
III.3. Techniques histologiques.....	36

III.3. Techniques histologiques.....	36
III.3.1. Cryofixation.....	36
III.3.2. Mise sur lame.....	36
III.3.3. Coloration des coupes à l'H.E.S. (Hémalun Erythrosine Safran).....	36
III.4. Techniques de culture <i>in vitro</i> de follicules.....	37
III.4.1. Description.....	37
III.4.2. Culture des follicules classés d'après leur taille.....	38
III.4.3. Cultures avec traitements de follicules.....	38
III.5. Dosages hormonaux.....	38
III.5.1. Principe du dosage radioimmunologique.....	38
III.5.2. Calcul des résultats.....	39
III.5.3. Dosage de la progestérone.....	40
III.5.3.1. Les réactifs.....	40
III.5.3.2. Manipulation et protocole.....	40
III.5.3.2.1. Extraction.....	40
III.5.3.2.2. Fixation Ag-Ac.....	40
III.5.3.2.3. Séparation.....	41
III.5.3.2.4. Comptage.....	41
III.5.4. Dosage de l'oestradiol.....	41
III.5.4.1. Les réactifs.....	41
III.5.4.2. Manipulation et protocole.....	41
III.5.4.2.1. Extraction.....	41
III.5.4.2.2. Fixation Ag-Ac.....	42
III.5.4.2.3. Séparation des phases libre et liée.....	42
III.5.4.2.4. Comptage.....	42
III.5.5. Dosage de l'androstènedione.....	42
III.5.5.1. Les réactifs.....	42
III.5.5.2. Manipulation et protocole.....	43

PARTIE III: MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE D'AUTORADIOGRAPHIE

I. Description de la technique.....	44
I.1. Marquage des hormones.....	44
I.2. Préfixation.....	44
I.3. Incubation.....	45
I.4. Postfixation.....	45
I.5. Emulsion.....	46
I.6. Révélation, fixation et coloration.....	46
I.6.1. Révélation.....	46
I.6.2. Fixation.....	46
I.6.3. Coloration.....	47
II. Système de comptage des récepteurs.....	47
III. Adaptation de la technique d'autoradiographie au laboratoire.....	48
III.1. Choix du temps d'incubation.....	48
III.1.1. Description.....	48
III.1.2. Résultats et discussion.....	48

III.2. Choix de la température d'incubation.....	49
III.2.1. Description.....	49
III.2.2. Résultats et discussion.....	49
III.3. Recherche de la concentration optimale d'hormone marquée à ajouter au cours de l'incubation à 4°C.....	50
III.3.1. Description.....	50
III.3.2. Résultats et discussion.....	51
IV. Conclusions.....	52

PARTIE IV: RESULTATS ET DISCUSSION

I. Localisation des récepteurs dans le follicule.....	53
I.1. Description.....	53
I.2. Résultats.....	53
I.3. Discussion.....	53
I.3.1. Localisation des récepteurs à la LH.....	53
I.3.2. Localisation des récepteurs à la FSH.....	54
I.3.3. Localisation des récepteurs à l'IGF-I.....	54
II. Influence de la taille des follicules sur la quantité des récepteurs aux hormones hypophysaires et à l'IGF-I.....	54
II.1. Description.....	54
II.2. Résultats.....	55
II.2.1. Evolution du nombre des récepteurs suivant la taille du follicule...55	
II.2.2. Profils des sécrétions stéroïdiennes attribués aux follicules de tailles différentes.....	56
II.3. Discussion.....	56
II.3.1. Influence de la taille du follicule sur la quantité et la localisation des récepteurs aux gonadotropines.....	57
II.3.2. Influence de la taille du follicule sur la quantité et la localisation des récepteurs à l'IGF-I.....	58
II.3.3. Evolution des sécrétions stéroïdiennes au cours de la culture <i>in vitro</i> et influence de la taille des follicules sur ces sécrétions....	58
II.3.4. Relation entre la quantité et la localisation des récepteurs aux gonadotropines et les sécrétions stéroïdiennes des différents types de follicules.....	59
III. Influence des stimulations réalisées <i>in vitro</i> par les facteurs de croissance IGF-I et EGF sur les trois types de récepteurs étudiés.....	60
III.1. Description.....	60
III.2. Résultats.....	60
III.2.1. Traitement à l'IGF-I.....	60
III.2.2. Traitement à l'EGF.....	61
III.3. Discussion.....	62
III.3.1. Traitement à l'IGF-I.....	62
III.3.1.1. Influence sur le nombre de récepteurs aux gonadotropines.....	62
III.3.1.2. Influence sur la quantité de récepteurs à l'IGF-I.....	62

III.3.2. Traitement à l'EGF.....	62
III.3.2.1. Influence sur les récepteurs des gonadotropines.....	62
III.3.2.2. Influence sur les récepteurs de l'IGF-I.....	63
III.3.3. Influence du traitement aux facteurs de croissance sur la sécrétion stéroïdienne des follicules et comparaison avec l'évolution du nombre de récepteurs aux gonadotropines.....	63
III.3.3.1. Traitement des follicules à l'IGF-I.....	63
III.3.3.2. Traitement des follicules à l'EGF.....	63
IV. Conclusions.....	64

BIBLIOGRAPHIE

Liste des abréviations:

AMPC: Adénosine Monophosphate cyclique.
ARG: Autoradiographie.
BP: Binding Protein.
CG: Choriogonadotropine.
cpm: coups par minute.
 Δ_4 : Androstènedione.
DAG: Diacylglycérol.
E₂: Oestradiol.
EGF: Epidermal Growth Factor.
FGA: Fluorogestone acétate.
FSH: Follicle Stimulating Hormone.
FSH-RBI: FSH Receptor Binding Inhibitor.
GH: Growth Hormone.
Gi: Protéine G inhibitrice.
GnRH: Gonadotropine Releasing Hormone.
Gs: Protéine G stimulatrice.
GTP: Guanine Triphosphate.
IGF: Insulin-like Growth Factor.
IL-I: Interleukine I.
IP₃: Phosphatidyl Inositol triphosphate.
Kd: Constante de dissociation.
KDa: KiloDalton
LDL: Lipoprotéine de basse densité.
LH: Luteinizing Hormone.
LH-RBI: LH Receptor Binding Inhibitor.
M6P: Mannose-6-phosphate.
P₄: Progestérone.
PG: Prostaglandine.
PIP₂: Phosphatidyl Inositol biphosphate.
PK-C: Protéine Kinase C.
PLC: Phospholipase C
PMSG: Pregnant Mare Serum Gonadotropin.
PP-12: Placental Protein-12.
PRL: Prolactine.
TGF β : Transforming Growth Factor β .

Objectifs poursuivis.

Depuis plusieurs années, les mécanismes de croissance folliculaire chez la brebis et l'influence de divers traitements hormonaux sur ces mécanismes furent l'objet de recherches au laboratoire de Physiologie Animale.

L'importance des facteurs de croissance dans ces mécanismes a notamment été mise en évidence (Botspoel, 1993) de même que celle de la régulation des récepteurs hormonaux présents dans les follicules ovariens (Qewet, 1993). C'est dans cette optique que se situe notre travail de fin d'études. Nous nous sommes assignés quatre objectifs:

- mettre au point la technique de détection des récepteurs aux gonadotropines et au facteur de croissance IGF-I (Insulin-like Growth Factor) à la surface des cellules des follicules ovariens.

- mettre en évidence l'existence préférentielle de ces récepteurs sur les cellules de la thèque et de la granulosa.

- rechercher l'influence de la taille des follicules sur la quantité de récepteurs.

- déterminer les conséquences d'un traitement *in vitro* des follicules par des facteurs de croissance sur la quantité des récepteurs.

Le travail proposé débutera par une revue bibliographique avant d'aborder l'exposé de nos recherches.

Revue bibliographique.

Epithélium germinatif

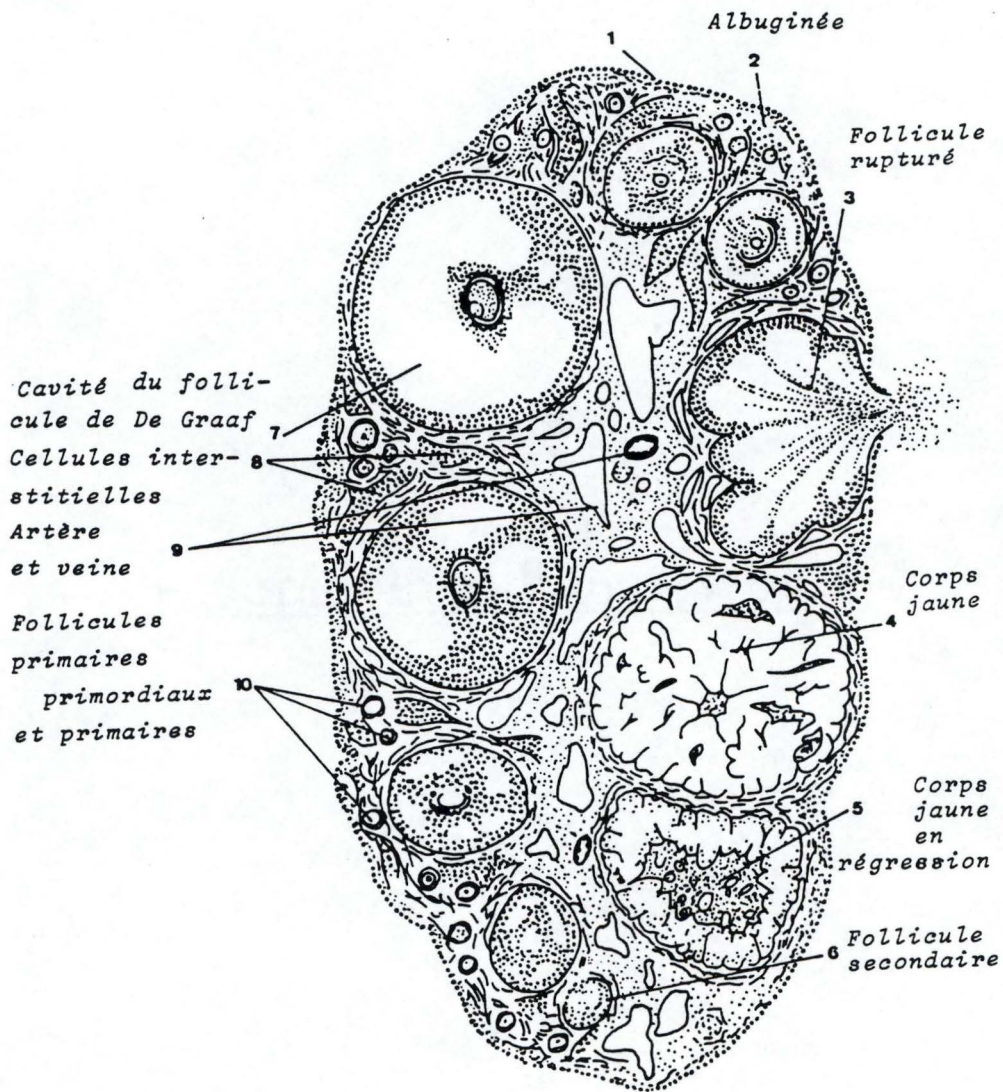


Figure 1: Structure et organisation de l'ovaire (Dérivaux et Ectors, 1986).

I. Aperçus généraux concernant le cycle oestral de la brebis.

I.1 Introduction.

Le mouton domestique est une espèce polyoestrienne à cycles saisonniers, il présente par conséquent une succession de cycles oestraux pendant une saison déterminée.

L'activité ovulatoire de la brebis débute généralement au moment où la luminosité se réduit et donc lorsque les jours se raccourcissent (Dérivaux et Ectors, 1986). Ce qui signifie que dans notre hémisphère la saison de reproduction de la brebis commence en fin juillet et septembre et se termine entre février et avril. Le restant de l'année, la brebis est en anoestrus. Pendant cette période, la folliculogénèse se maintient mais aucun follicule n'atteint le stade ovulatoire.

La durée du cycle oestral chez la brebis s'étend de 16 à 17 jours, le jour de l'ovulation étant cité, par convention, jour 0. Deux phases distinctes peuvent définir ce cycle (Dérivaux et Ectors, 1986; Ruckebusch *et al.*, 1991):

- la phase lutéale s'étend du jour 1, où débute la formation du corps jaune, au jour 13, moment de la lutéolyse ou de la régression du corps jaune.
- la phase folliculaire se déroule du jour 14 au jour 17 du cycle. Elle consiste en la croissance terminale des follicules et en l'ovulation de certains d'entre eux.

I.2. Description histologique de l'ovaire (Junqueira *et al.*, 1989; Bister 1991).

L'ovaire de la brebis est un organe de 1 à 3 cm de long et de 1 à 1.5 cm de large pesant à peu près 15 g.

L'ovaire comporte deux régions distinctes, à savoir (fig. 1):

- une zone corticale, siège de l'activité folliculaire, composée de l'épithélium germinatif et du stroma cortical séparés par l'albuginée ou tunica albuginea, et de nombreux follicules à différents stades de leur développement.
- une zone médullaire, constituée d'une région parenchymateuse faite de tissu conjonctif lâche, et d'une région fibreuse, le rete ovarii, par où pénètrent l'innervation et la vascularisation sanguine et lymphatique.

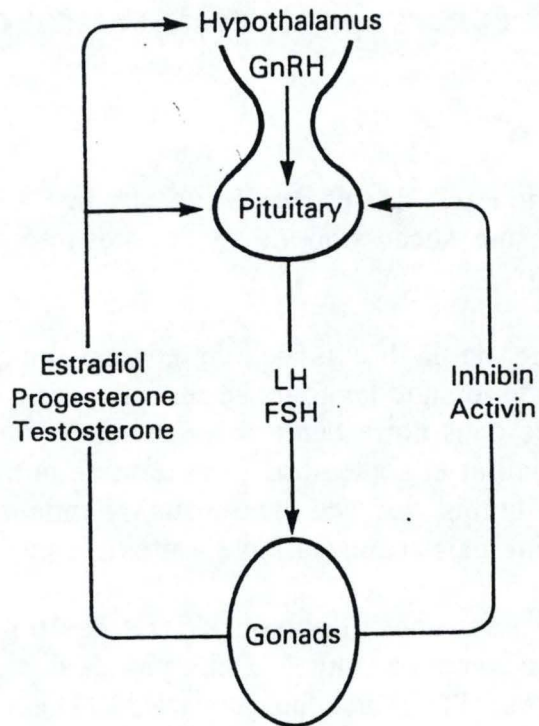


Figure 2: Contrôle exercé par divers facteurs sur les sécrétions de l'axe hypothalamo-hypophysio-ovarien (Yen et Jaffe, 1991).

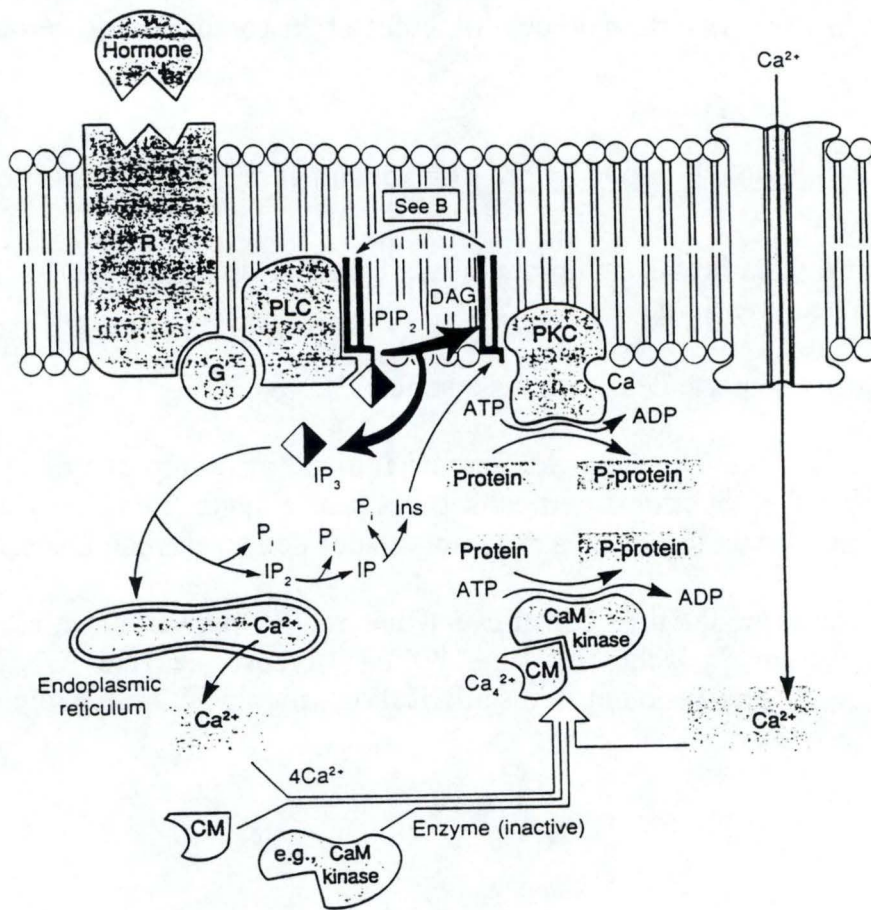


Figure 3: Mode d'action de la GnRH (Widnell et Pfinninger, 1990).

I.3. Hormones impliquées lors du cycle oestral chez la brebis.

Le déroulement du cycle oestral requiert des substances hormonales sécrétées par l'axe hypothalamus-hypophyse-ovaire-utérus.

Dans le cadre de notre travail, nous nous limiterons à la régulation du cycle oestral par les hormones hypothalamiques (GnRH ou Gonadotropine Releasing hormone), hypophysaires (FSH ou Follicle Stimulating Hormone et LH ou Luteinizing Hormone), et gonadiques (oestrogènes et progestagènes) et par les facteurs de croissance IGFs (Insulin-like Growth Factors) et EGF (Epidermal Growth Factor).

I.3.1. L'hormone hypophysaire GnRH ou la gonadolibérine.

I.3.1.1. Structure et mode d'action.

La GnRH est un décapeptide dont le poids moléculaire se situe entre 12 et 14 KDa. Cette hormone, dont le temps de demi-vie est de deux à quatre minutes, est catabolisée dans le rein (Dérivaux et Ectors, 1986). La GnRH est synthétisée dans les cellules nerveuses de l'hypothalamus et est émise de façon pulsatile. Sa sécrétion ne varie pas durant le cycle oestral excepté en période ovulatoire où elle s'intensifie (Bister, 1991). Cette augmentation de la fréquence des décharges de GnRH se fait sous l'influence d'un feed-back positif exercé par l'oestradiol (E_2) circulant (fig.2; Brännström, 1988).

La GnRH sécrétée accède à la circulation locale existant entre l'hypothalamus et l'antéhypophyse et se fixe sur des récepteurs situés à la surface des cellules gonadotropes de l'antéhypophyse. Ces récepteurs forment un complexe membranaire couplé avec une protéine Gs qui, activée, va induire une phospholipase C (PLC). L'activité enzymatique de celle-ci provoque l'hydrolyse du phosphatidyl inositol 4,5-biphosphate (PIP_2) en deux messagers secondaires (fig. 3):

- le phosphatidyl inositol triphosphate (IP_3) mobilise l'ion calcium (Ca^{2+}) intracellulaire et provoque l'ouverture des canaux à Ca^{2+} . Cette hausse de la concentration en ions Ca^{2+} intracellulaires initie la libération des gonadotropines préformées.
- le diacylglycérol (DAG), quant à lui, active une protéine kinase C (PK-C), qui, par l'intermédiaire d'une cascade de phosphorylations, régule la synthèse et la glycosylation des gonadotropines et provoque une augmentation des récepteurs à la GnRH (Yen et Jaffe, 1991).

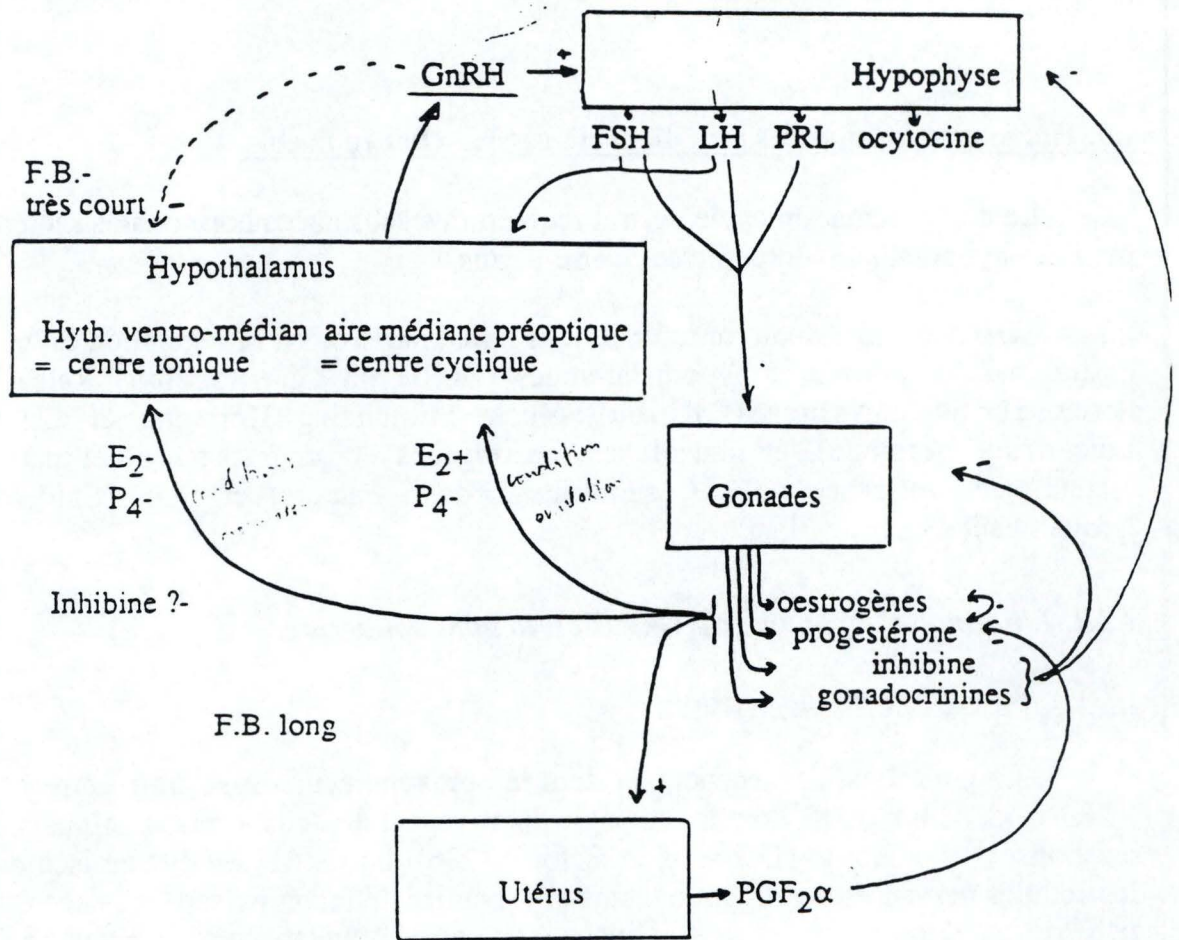


Figure 4: Contrôle endocrinien du cycle oestral (Bister, 1991).

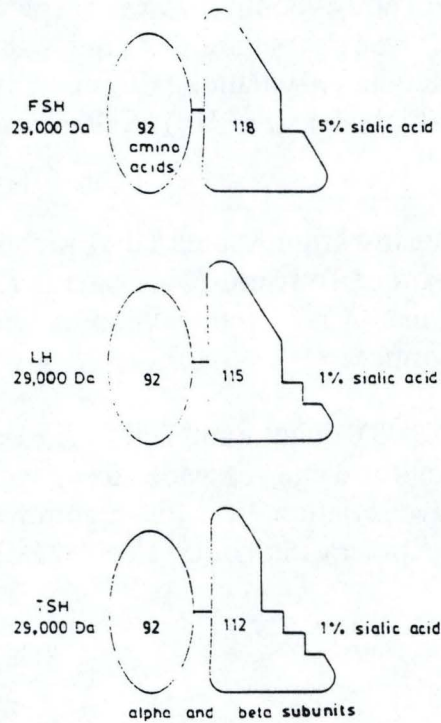


Figure 5: Représentation des trois glycoprotéines hypophysaires dont la spécificité est assurée par la sous-unité β (Ruckebusch *et al.*, 1991).

I.3.1.2. Rôles.

Le rôle principal de la GnRH est la régulation des sécrétions des hormones gonadotropes par l'hypophyse (fig. 4). La gonadolibérine agit donc indirectement sur la production des stéroïdes sexuels par l'ovaire et ainsi sur la croissance et la maturation folliculaires (Marschall *et al.*, 1991).

De même, la GnRH contrôle ses propres synthèse et sécrétion (Ruckebusch *et al.*, 1991) et régule elle-même ses récepteurs (Braden et Conn, 1992).

I.3.2 Les gonadotropines hypophysaires.

I.3.2.1. Structure.

Les gonadotropines follitropine (FSH) et lutropine (LH) font partie de la famille des hormones glycoprotéiques ainsi que la thyrotropine (TSH) et la choriogonadotropine (CG) sécrétée en quantité importante au cours de la gestation chez les primates (Thibault et Levasseur, 1991).

Les hormones glycoprotéiques sont composées de deux sous-unités distinctes α et β , dont les chaînes polypeptidiques sont associées de manière non covalente (Yen et Jaffe, 1991). Dans une espèce donnée, la chaîne polypeptidique de la sous-unité α est identique pour toutes les hormones glycoprotéiques hypophysaires et placentaires. Elle est le produit d'un seul et même gène, tandis que les sous-unités β sont spécifiques de chaque hormone (fig. 5).

Ces hormones diffèrent également par leur composition en hydrates de carbone et par leur teneur en acides sialiques. Celle-ci détermine le temps de demi-vie des hormones. En effet, les teneurs en acides sialiques de la LH et de la FSH sont respectivement de 1% et de 5%, ce qui entraîne un temps de demi-vie de 20 minutes pour la LH et de quelques heures pour la FSH (Williams, 1972).

Les poids moléculaires de la LH et de la FSH sont de 30 et de 32 KDa (Dérivaux et Ectors, 1986).

I.3.2.2. Mode de sécrétion (fig. 6).

La FSH est émise sous forme de trois vagues successives de sécrétion au cours du cycle oestral, suivant un rythme endogène de cinq jours. La première vague, au jour 0 du cycle, présente un pic dont le taux plasmatique de FSH atteint trois fois le taux basal et une seconde élévation moins marquée trente à quarante heures plus tard (Bister et Paquay, 1983). Les deux autres vagues atteignent des maxima semblables au cours de la phase lutéale.

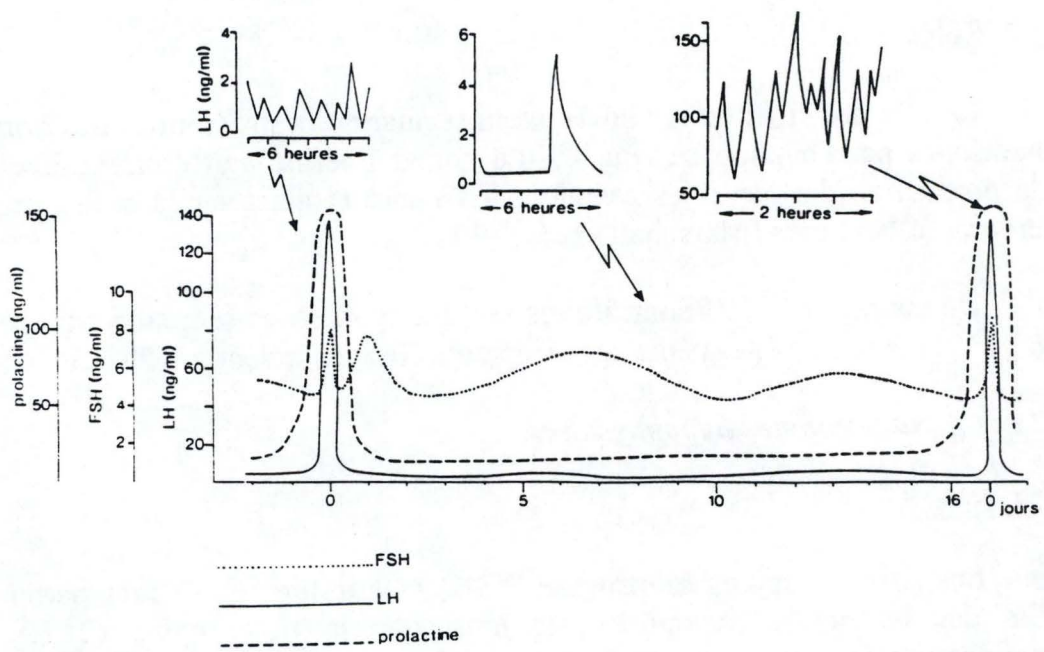


Figure 6: Profils hormonaux des gonadotropines et de la prolactine tout au long du cycle oestral chez la brebis (Thibault et Levasseur, 1991).

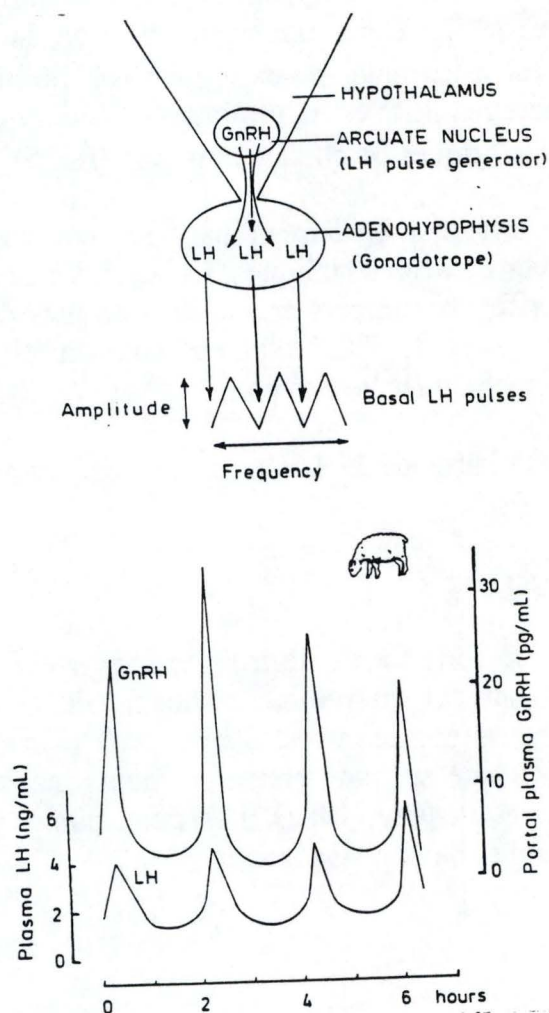


Figure 7: Relation entre les sécrétions de GnRH et de LH (Ruckebusch *et al.*, 1991).

La LH est émise de manière pulsatile. Dans la plupart des follicules, le taux de LH est d'environ 4 ng/ml de liquide folliculaire (Mc Natty *et al.* , 1981). La fréquence de la décharge est de un pulse toutes les deux heures et va augmenter progressivement pendant la phase folliculaire du cycle pour provoquer la sommation de LH circulante, qui se manifeste par une forte hausse des taux plasmatiques de LH. Ce pic préovulatoire atteint des valeurs de l'ordre de 5 à 50 ng de LH par ml de plasma (Mandiki, 1991). Les intervalles entre deux pulses de LH ne sont cependant pas réguliers. Ils sont moindres au sein de la saison de reproduction et s'élèvent en fin de celle-ci. Ces fluctuations observées varient donc en parallèle aux transitions graduelles saisonnières, et sont sujettes à un rythme endogène au niveau de l'axe hypothalamo-pituitaire de la brebis, la photopériode (Currie *et al.* , 1993).

I.3.2.3. Régulation de la sécrétion.

Les sécrétions de LH et de FSH dépendent de la GnRH. Celle-ci, par l'intermédiaire de l'axe hypothalamo-hypophysaire, influence leurs synthèse et sécrétion. En effet, à chaque pulse de GnRH suit une décharge de LH (fig. 7). De plus, on observe une intensification du nombre de récepteurs à la GnRH au moment de la décharge préovulatoire de LH qui précède l'ovulation (Crowder et Nett, 1984).

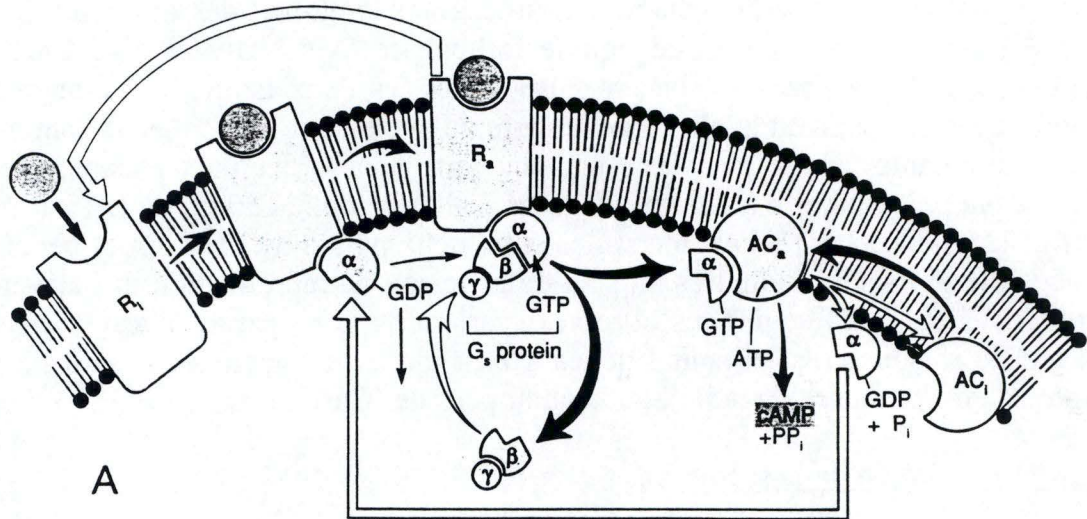
En phase lutéale, le corps jaune secrète une hormone stéroïde en grande quantité, la progestérone. Celle-ci semble agir en synergie avec l'oestradiol, sécrétée par les follicules en croissance, et occasionner un feed-back négatif au niveau de l'hypothalamus, ce qui limite la sécrétion de LH et de FSH (Karsch *et al.*, 1980; Mann *et al.* , 1991).

En phase folliculaire, l'oestradiol augmente la fréquence des pulses de LH et la libération de FSH. En effet, les taux plasmatiques de progestérone régressent et le feed-back exercé par l'oestradiol sur l'hypothalamus devient positif (Joseph *et al.* , 1994).

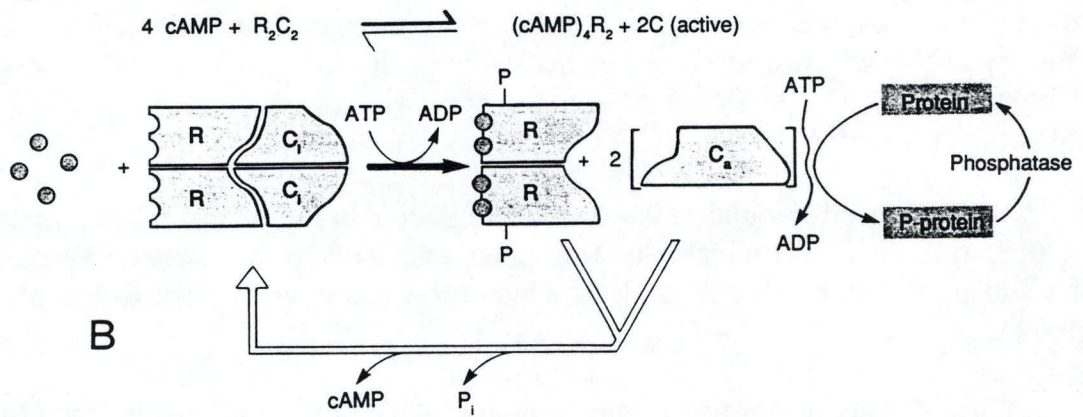
Certaines cybernines interviennent également lors de la sécrétion des gonadotropines:

- l'inhibine, originaire de la prostate, est capable d'inhiber sélectivement l'élaboration de la FSH par l'hypophyse, mais aussi d'en réduire la libération (Tsonis et Sharpe, 1986; Carroll *et al.* , 1991), et l'activine potentialise l'activité biologique de la FSH (Schneyer *et al.* , 1991).

- la gonadocrinine bénéficie des mêmes propriétés que la GnRH hypothalamique et stimule donc la sécrétion de la LH et de la FSH hypophysaires (Dérivaux et Ectors, 1986).



R_i, R_a = inactive and activated receptor, respectively
 AC_i, AC_a = inactive and activated adenylyl cyclase, respectively



R = regulatory subunit
 C_i, C_a = inactive and active catalytic subunit, respectively

Figure 8: Activation de l'adénylate cyclase et des protéines kinases dépendantes de l'AMP cyclique (Widnell et Pfinninger, 1990).

I.3.2.4. Mode d'action.

La sécrétion des gonadotropines s'effectue par exocytose des granules de sécrétion contenant ces hormones. L'étape finale de glycosylation au moment de la biosynthèse de l'hormone pourrait servir de signal pour l'emballage dans les vésicules de sécrétion (Ronin, 1989 ; Ruckebusch, 1991).

Le message hormonal porté par les gonadotropines est transmis à leurs cellules cibles par l'intermédiaire d'un récepteur glycoprotéique membranaire spécifique. L'interaction hormone-récepteur conduit à l'activation d'une protéine G par la fixation d'un résidu GTP sur sa sous-unité α (fig. 8). Cette entité stimule l'activité de la sous-unité catalytique de l'adénylate cyclase située sur la face interne de la membrane plasmique. L'accumulation d'AMPc, induite par cette dernière hormone, va provoquer une cascade d'activations protéiniques (Thibault et Levasseur, 1991).

Le polymorphisme des gonadotropines a rapidement été associé à des variations d'activité biologique, ou plus simplement à la capacité d'être reconnues par leur récepteur spécifique. Le rôle et l'hétérogénéité des motifs glucidiques, et plus particulièrement des acides sialiques chargés négativement, dans la transduction ont, à cet égard, été bien mis en évidence. Il semblerait que les isoformes les plus basiques soient les plus actives (Ronin, 1989). La spécificité de reconnaissance implique la sous-unité β .

I.3.2.5. Rôles.

Les actions biologiques principales des gonadotropines sont les stimulations de la maturation et de la fonction ovariennes, et la régulation de la gamétogenèse et de la stéroïdogénèse dans les gonades.

La LH est une hormone lutéinisante qui, après avoir induit l'ovulation, potentialise la production de progestérone par les cellules lutéales du corps jaune (Harrison *et al.* , 1987). De plus, des observations indiquent que la LH favorise l'expression génique des récepteurs à la progestérone dans les cellules de la granulosa porcine (Iwai *et al.* , 1991).

Le pic préovulatoire de LH favorise également la maturation folliculaire avec la reprise de la division méiotique de l'ovocyte qui s'était interrompue au cours de la vie foetale (Hsueh *et al.* , 1989; Thibault et Levasseur, 1991).

De même, la LH agit sur l'activation des cellules thécales et les potentialise à sécréter des androgènes qui vont diffuser dans la granulosa pour être synthétisés, sous l'influence de la FSH, en oestrogènes (Bogovich *et al.* , 1981).

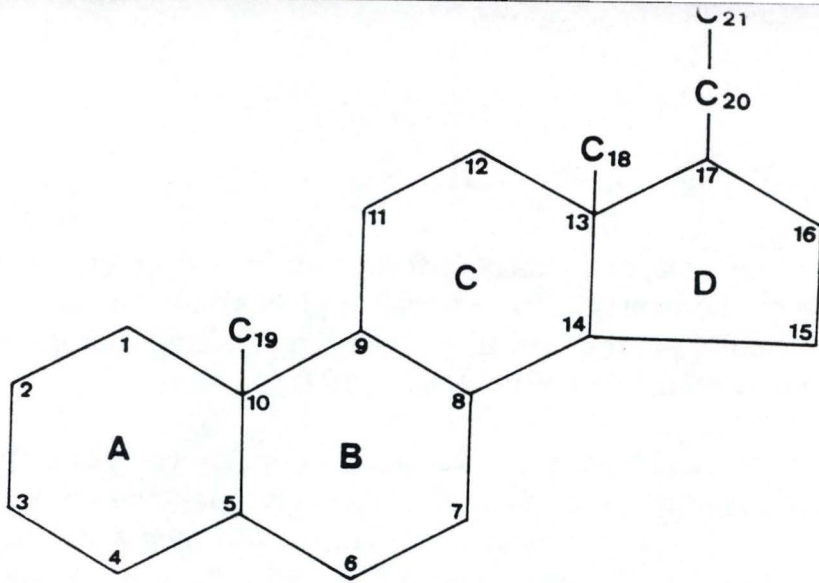


Figure 9: Structure du noyau cyclopentanoperhydrophénantrène (Dérivaux et Ectors, 1986).

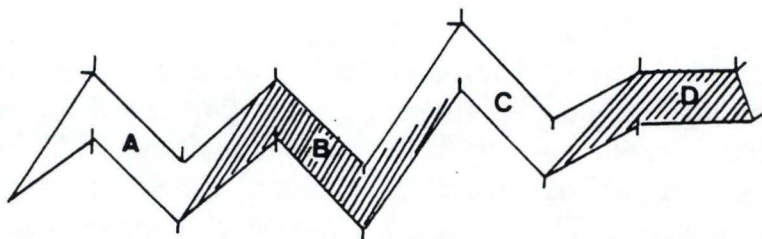
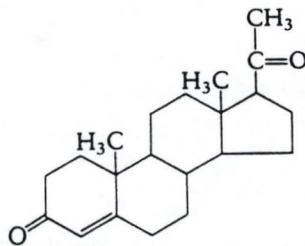


Figure 10: Disposition spatiale du noyau cyclopentanoperhydrophénantrène (Dérivaux et Ectors, 1986).

STEROIDES
Progesterone



Œstradiol
(l'un des trois œstrogènes)

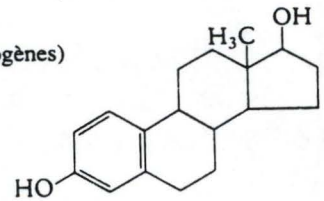


Figure 11: Structure de l'œstradiol et de la progestérone (Darnell *et al.*, 1993).

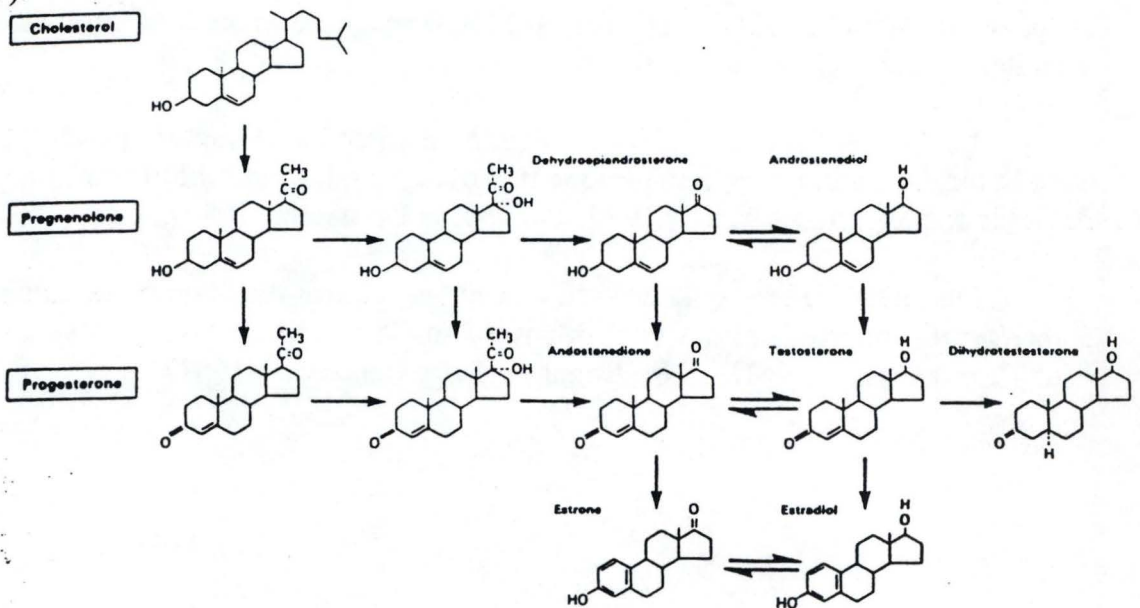


Figure 12: Les différentes étapes de la synthèse des œstrogènes et androgènes (Yen et Jaffe, 1991).

La LH contribue également aux maturations folliculaire et ovocytaire (Yen et Jaffe, 1991). Au niveau des cellules de la granulosa ovariennes, la LH induit à la fois le turnover des phospholipides et la synthèse de prostaglandines (Yen et Jaffe, 1991).

Dans l'ovaire, la FSH assure la croissance et la maturation folliculaires jusqu'au stade antral, agissant en synergie avec l'oestradiol et la LH (Yen et Jaffe, 1991). En fait, elle conditionne la croissance des cellules granulosales et les prépare à se transformer en cellules lutéales sous l'action de la LH (Morbeck *et al.*, 1983).

En outre, la FSH stimule l'apparition de récepteurs à la LH sur les cellules thécales et granulosales pour permettre la lutéinisation et inhibe l'atrésie des follicules à antrum (Bogovich *et al.*, 1981; Kameko *et al.*, 1991).

La follitropine est aussi requise pour faire office de stimulateur de la synthèse de plusieurs enzymes telles que la β -désydrogénase, indispensable à la transformation du prégnénolone en progestérone, ou l'aromatase, nécessaire à la conversion des androgènes en oestradiol.

1.3.3. Les hormones stéroïdiennes.

1.3.3.1. Structure.

Les oestrogènes, androgènes et progestagènes appartiennent au groupe des hormones stéroïdes et leur structure de base est représentée par le noyau cycloperhydropentanophénantrène, dont le squelette est analogue à celui du cholestérol (fig. 9, 10 et 11).

1.3.3.2. La stéroïdogénèse et son contrôle (fig. 12 et 13).

Les besoins de la cellule en cholestérol stéroïdogène sont assurés par les esters du cholestérol véhiculés par les lipoprotéines de basse densité (LDL). L'acétyl coenzyme A est également une source de cholestérol, mais celle-ci reste mineure (Thibault et Levasseur, 1991).

La première étape de la biosynthèse des stéroïdes sexuels est une rupture de la chaîne latérale du cholestérol. Cette conversion du cholestérol (27 atomes de carbone) en Δ^5 -prégnénolone (21 atomes de carbone) est assurée par un complexe enzymatique constitué d'un cytochrome P-450 responsable de deux hydroxylations permettant le clivage de la chaîne latérale en C₂₀ (Yen et Jaffe, 1991). Les cellules de la thèque possèdent des récepteurs à la LH, celles-ci stimulant cette réaction de conversion (Amstrong *et al.*, 1981).

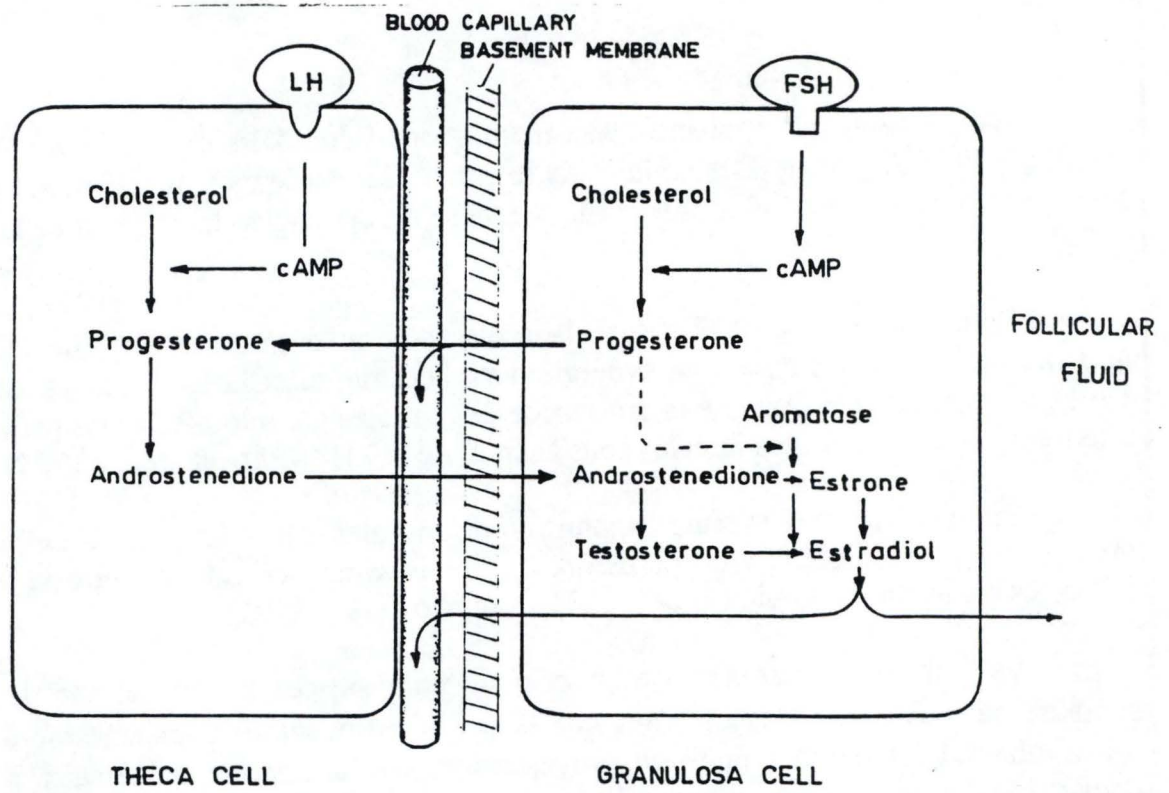


Figure 13: La stéroïdogénèse et son contrôle par les gonadotropines (Ruckebusch *et al.*, 1991).

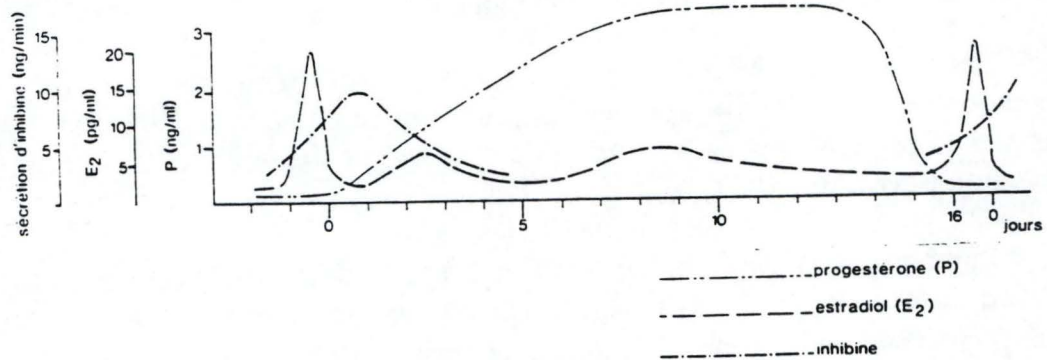


Figure 14: Emission des stéroïdes sexuels et de l'inhibine au cours du cycle oestral de la brebis (Thibault et Levasseur, 1991).

La prégnéolone prend place dans les mitochondries des cellules capables d'initier la stéroïdogénèse, à savoir les cellules granulosales et de la thèque interne. La transformation de cette dernière en progestérone suppose une oxydation de la fonction 3 β -hydroxyle et le transfert de la double liaison Δ 5-6 en Δ 4 sous l'action de la Δ 5-3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase et de la Δ 5-4-isomérase (Dérivaux et Ectors, 1986). La formation de progestérone est soutenue par les sécrétions de LH (Denning-kendall et Wathes, 1994). Toujours sous l'influence de la LH, une partie de la progestérone produite va être transformée dans la thèque en 17 α -hydroxyprogestérone via l'enzyme 17 α -hydrolase et par après en androstènedione (Δ 4) sous l'action d'une 17-20-desmolase (Dérivaux et Ectors, 1986). L'androstènedione constitue un intermédiaire important à la formation d'androgènes et d'oestrogènes.

Les cellules de la granulosa parsemées de récepteurs à la FSH vont importer les androgènes thécaux pour permettre leur synthèse en oestrogènes via une aromatasé activée par la FSH (Mc Neilly, 1984). Le principal oestrogène sécrété par les follicules est l'oestradiol-17 β .

I.3.3.3. Emissions au cours du cycle (fig. 14).

Durant la phase folliculaire, les follicules acquièrent la capacité d'activation de la fonction stéroïdogénique. Les sécrétions d'oestradiol s'intensifient parallèlement avec la taille des follicules jusqu'à leur stade majeur (Amstrong *et al.*, 1981; England *et al.*, 1981). Trois hausses de sécrétion d'oestradiol ont été enregistrées. La première se déroule trois jours avant l'oestrus ou le pic de LH annonçant l'ovulation (Mc Natty *et al.*, 1981). Les deux autres hauts niveaux périphériques d'oestradiol ont lieu entre le deuxième et le quatrième jours et entre le huitième et le dixième jours de la phase lutéale (Bister et Paquay, 1983). Les concentrations d'androstènedione subissent une augmentation parallèlement à celle de l'oestradiol (Baird, 1987).

Pendant la phase lutéale, le corps jaune sécrète presque exclusivement de la progestérone. Cette augmentation brusque des concentrations de progestérone empêcherait l'action stimulatrice exercée par l'oestradiol sur la sécrétion des hormones gonadotropes (Thimonier, 1979). Suite à la lutéolyse, ces taux de progestérone régressent jusqu'à atteindre leur minimum de sécrétion (Ruckebusch, 1991). Les oestrogènes sécrétés pendant la phase lutéale du cycle, quant à eux, proviennent des follicules de De Graaf en développement plutôt que du corps jaune (Thibault et Levasseur, 1991).

I.3.3.4. Mode d'action.

Les stéroïdes sexuels sont déversés dans le sang où ils se trouvent sous forme libre, liée ou conjuguée. La forme libre se lie à un récepteur cytosolique. Ce complexe va être transféré dans le noyau et agir au niveau de l'ADN. Les transcripts qui en dérivent seront traduits et synthétisés en protéines spécifiques dans le cytoplasme (Dérivaux et Ectors, 1986).

I.3.3.5. Rôles.

I.3.3.5.1. L'oestradiol (E_2).

L'oestradiol est un puissant régulateur de l'axe endocrinien. En période préovulatoire, les concentrations sériques d'oestradiol dépassent un certain seuil et provoquent un feed-back positif sur l'hypothalamus, ce qui facilite l'induction de l'ovulation. Par contre, dans des conditions normales, l'oestradiol régule sa propre sécrétion en renforçant le feed-back négatif exercé par la progestérone sur l'hypothalamus en phase lutéale (Mann *et al.*, 1992). Durant l'anoestrus, l'oestradiol se livre à une régulation inhibitrice puissante sur la sécrétion épisodique de GnRH, de FSH et de LH, tandis que de mêmes quantités d'oestradiol n'ont aucun effet en saison de reproduction (Goodman et Karsch, 1981; Karsch *et al.*, 1993). Selon certains auteurs, la mélatonine produite en quantité lors d'une photopériode à jours courts chez la brebis serait inductrice de ce changement de la sensibilité de l'axe hypothalamo-hypophysaire au rétrocontrôle pratiqué par l'oestradiol (Legan *et al.*, 1985; Martin *et al.*, 1988; Malpaux *et al.*, 1993).

Au niveau de l'ovaire, l'oestradiol, en synergie avec la FSH, régule la mitose des cellules granulosales, induit la production de ses propres récepteurs ainsi que ceux des gonadotropines (Chakrovorty, 1993).

L'oestradiol favorise également la sécrétion de la prostaglandine $PGF_{2\alpha}$ notamment dans l'utérus. Celle-ci bénéficie d'une action lytique. L'oestradiol est donc en partie responsable de la destruction du corps jaune et de la prochaine ovulation. Par ailleurs, l'oestradiol inhibe la production d'ocytocine, facteur renforçant l'activité contractile de différentes fibres musculaires dont celles du tractus génital (utérus, oviducte), à partir des cellules de la granulosa (Denning-Kendall et Wathes, 1994).

I.3.3.5.2. La progestérone (P_4).

La progestérone émise en grandes quantités par le corps jaune lors de la phase lutéale exerce un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus et ainsi empêche une libération des gonadotropines. En outre, elle permet le maintien du corps jaune et est indispensable tout au long de la gestation (Yen et Jaffe, 1991).

	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70
Bovine IGF-1 Sequence	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKA <u>PKSA</u>													
Adult oIGF-1 Polypeptide	GPETL-GAELVDALQFV-GDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQ													
Adult oIGF-1 Peptide 1	LVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYG													
Adult oIGF-1 Peptide 2	SSRRAPQTGIVDE													
Adult oIGF-1 Peptide 3	CCFRSCDLRRLE													
Adult oIGF-1 Peptide 4	MYCAPLKA <u>AKS</u>													
Adult oIGF-1 Peptide 5	MYCAPLKA <u>AKSA</u>													
Fetal oIGF-1 Polypeptide	GPETL-GAEL													
Ovine IGF-1 Sequence	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKA <u>AKSA</u>													

Figure 15: Comparaison des séquences des polypeptides IGFs-I ovins et bovins (Francis, 1989).

	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Bovine IGF-2 Sequence	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCDGRGFYFSRPSSRINRRSRGIVECCFRSCDLALLE <u>TYCA</u> PAKSE												
Major Adult oIGF-2 Polypeptide	AYRPSETL-GGELVDTLQFV-DGRGFYFSRPSSRINRRSRGIVE												
Major Adult oIGF-2 Peptide 6	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCDGRGFYFSRPS												
Major Adult oIGF-2 Peptide 7	CCFRSCDLALLE												
Major Adult oIGF-2 Peptide 8	TYCA <u>APAKSE</u>												
Minor Adult oIGF-2 Polypeptide	AYRPSETL-GGELVDTLQFV-DGRGFYFSRPS-RINRRSRG-VE												
Minor Adult oIGF-2 Peptide 9	AYRPSETLCGGE												
Minor Adult oIGF-2 Peptide 10	CCFRSCDLALLE												
Minor Adult oIGF-2 Peptide 11	TYCA <u>APAKSE</u>												
Fetal oIGF-2 Polypeptide	AYRPSETL-GGELVDTLQFV-DGRGFYFSRPSSRINRRSRGIVEE--F												
Fetal oIGF-2 Peptide 12	CCFRSCD												
Fetal oIGF-2 Peptide 13	YCA <u>APAKSE</u>												
Ovine IGF-2 Sequence	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCDGRGFYFSRPSSRINRRSRGIVECCFRSCDLALLE <u>TYCA</u> PAKSE												

Figure 16: Comparaison des séquences des polypeptides IGFs-II ovins et bovins (Francis, 1989).

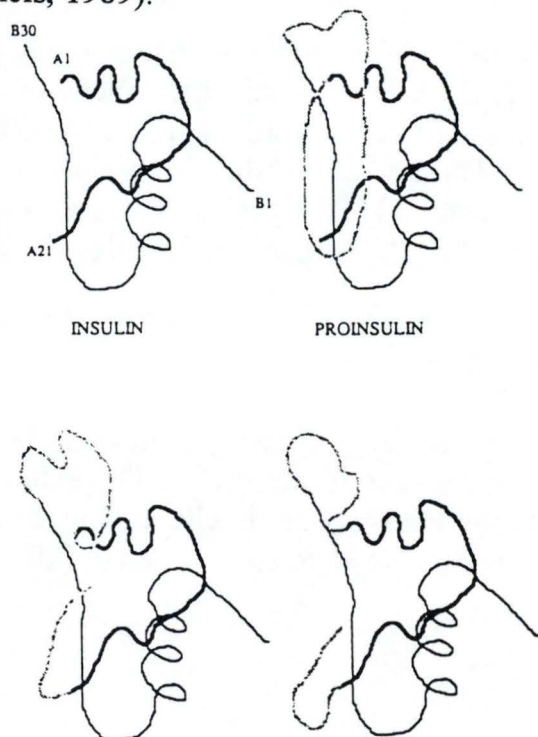


Figure 17: Homologie structurale entre la proinsuline, l'insuline et les IGFs (Giudice, 1992).

Dans les cellules de la granulosa, la progestérone empêche l'induction de l'activité aromatasase et par conséquent inhibe la production de E_2 des follicules en développement (Fortune et Vincent, 1983).

Suivant les doses et le moment d'administration de la progestérone, celle-ci peut renforcer l'induction de la LH sur l'ovulation, mais est incapable de stimuler une ovulation par elle-même (Brännström, 1988).

1.3.4. Les facteurs de croissance.

1.3.4.1. Le système IGF (Insulin-like Growth Factor).

Les IGFs sont des facteurs de croissance à petit poids moléculaire, qui régulent beaucoup de fonctions cellulaires. Leurs actions sont de type insulinique, elles induisent la mitose et la différenciation cellulaires et stimulent la catalysation de processus débouchant sur la production de macromolécules nécessaires à la formation des tissus et à l'accumulation d'énergie. Les IGFs jouent un rôle important dans le développement cyclique du follicule ovarien (Barreca *et al.*, 1990).

1.3.4.1.1. Structure.

La structure et la séquence des acides aminés des IGFs ovins offrent une grande similitude avec celles des IGFs humains et bovins (fig. 15 et 16).

Il existe deux grandes classes d'IGFs: l'IGF-I et l'IGF-II qui présentent entre elles 70% d'homologie. Les IGF-I ou somatomédine-C et IGF-II sont composés respectivement de 70 et 67 acides aminés et leurs poids moléculaires sont de 7646 Da et 7471 Da chez l'homme (Rutanen et Pekonen, 1990). Ce sont des polypeptides à simple chaîne, présentant trois ponts disulfures intrachâînes et intégrant des régions A et B aminotermiales, séparées par une région C. Ces trois régions partagent avec la proinsuline environ 40 à 43% de séquences identiques. Mais contrairement à la proinsuline, la séquence des IGFs se prolonge d'une région D carboxyterminale (Sara et Hall, 1990). De même, des modèles tridimensionnels indiquent que l'IGF-I et l'IGF-II ont des centres hydrophobiques identiques et une même conformation dans les résidus d'acides aminés par rapport aux régions A et B de l'insuline (fig. 17). Ils ont en commun des propriétés biochimiques, biologiques et immunologiques mais interagissent avec des protéines de liaison et des récepteurs spécifiques (Dorrington *et al.*, 1987; Czech, 1989).

Il a été suggéré que la région terminale du domaine B est importante pour la fixation de l'IGF-I à son récepteur et à ses protéines de liaison. Tandis que la fixation de l'IGF-II à son récepteur n'implique pas une région partagée avec l'insuline. Des

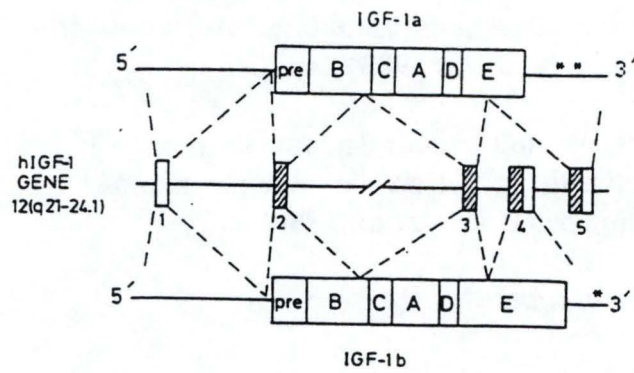


Figure 18: Structure du gène de l'IGF-I et ses différents transcripts; la variabilité de ceux-ci est portée par le domaine E du gène (Sara et Hall, 1990).

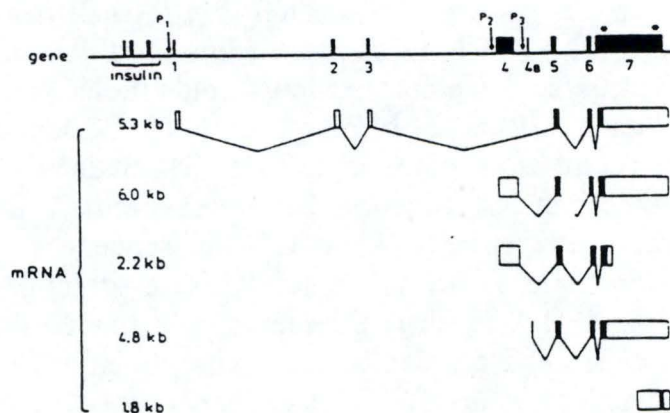


Figure 19: Structure du gène de l'IGF-II et emplacement de ses trois promoteurs (Sara et Hall, 1990).

études d'hybridation moléculaire supposent que la région A intervient dans les propriétés mitogéniques des IGFs (Sheickh *et al.*, 1987; cités par Sara et Hall, 1990).

Un seul gène code pour ces deux facteurs de croissance. L'hétérogénéité des mRNAs transcripts à partir des gènes de l'IGF-I et de l'IGF-II est due à un épissage alternatif du transcript primaire du gène et à l'utilisation de sites promoteurs variables (Rutanen et Pekonen, 1990). Ceci résulte en l'existence d'au moins deux formes de l'IGF-I (IGF-Ia et IGF-Ib) et génère des mRNAs de tailles variables (fig. 18 et 19).

1.3.4.1.2. Lieu de synthèse et évolution des taux sériques.

Les IGFs apparaissent tôt au cours de l'embryogenèse dans la plupart des tissus corporels, mais les taux sériques de ces facteurs sont très faibles. Par contre, ces taux sont élevés après la naissance (Hill, 1987).

Le site de production principal des IGFs est le foie mais leur synthèse est aussi réalisée par de nombreux tissus (Rotwein *et al.*, 1987; cités par Hill, 1989).

Dans l'ovaire de la ratte, de la truie et de la femme, les IGFs sont produits principalement par les cellules de la granulosa (Adashi *et al.*, 1985; Davoren et Hsueh, 1986; Hammond *et al.*, 1991). Une étude préliminaire vient de montrer récemment, par hybridation *in situ*, que chez la brebis l'IGF-I est exprimé principalement dans le corps jaune (Perks *et al.*, 1992; cités par Monget, 1993).

1.3.4.1.3. Régulation de la synthèse.

La complexité structurale du gène de l'IGF-I permet une variabilité importante de sa régulation aux niveaux transcriptionnel, traductionnel et postraductionnel. Les IGFs-I transcripts suivant un promoteur situé au début de l'exon 2 sont, dans le foie, principalement régulés par la GH (Growth Hormone), et pourraient coder pour la "forme endocrine" de l'IGF-I tandis que les transcripts contenant l'exon 1, pouvant être régulés par d'autres facteurs que la GH, constitueraient la forme "auto/paracrine" du peptide (Giudice, 1992). La GH stimule également l'expression des IGFs dans une grande partie des tissus: le rein (Hua *et al.*, 1993), l'ovaire (Davoren et Hsueh, 1986), le poumon, le testicule, le système nerveux central (Thibault et Levasseur, 1991), ...

Dans l'ovaire, la GH stimule la production des IGFs-I par les cellules de la thèque et de la granulosa (Giudice, 1992); de même, elle augmente le taux des IGFs-I dans le fluide folliculaire et dans le sérum. Inversement, la GH favorise une diminution du taux des IGFs-II dans le sérum et dans le liquide folliculaire (Samaras *et al.*, 1994).

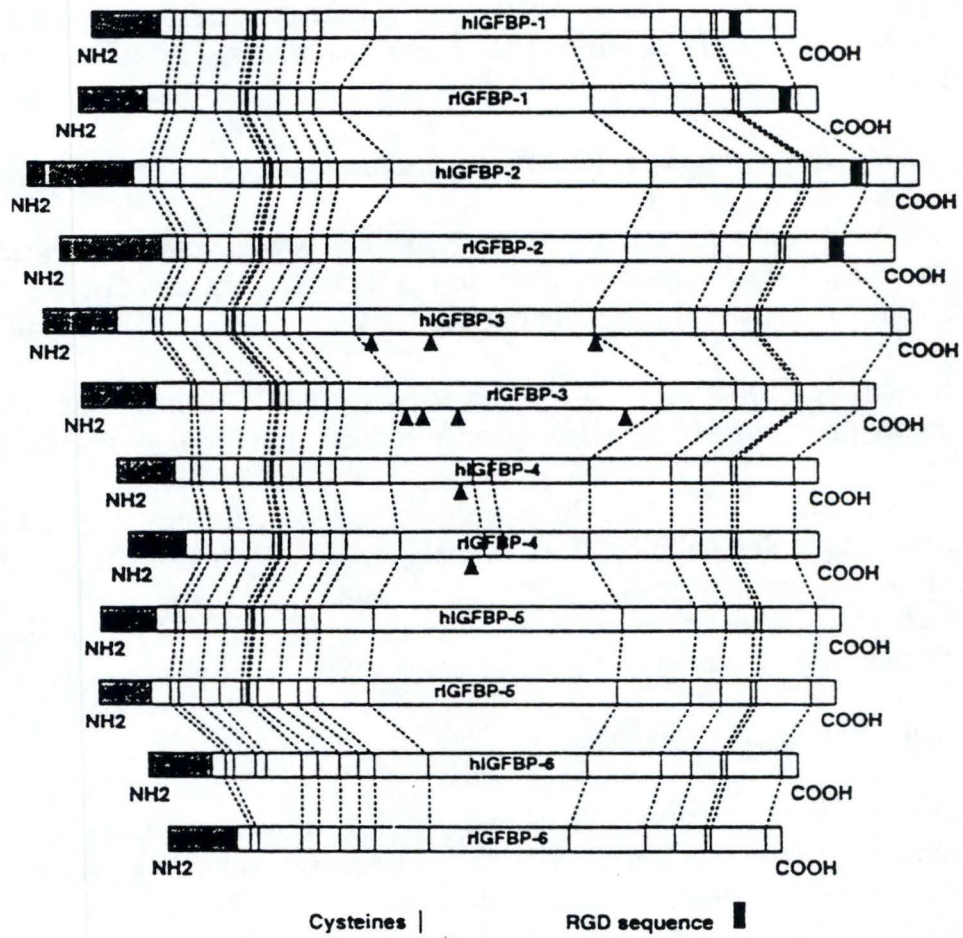


Figure 20: Représentation schématique des six protéines de liaison des IGFs (Giudice, 1992).

Les autres facteurs pouvant réguler l'émission des IGFs sont:

- un apport énergétique, notamment par la nutrition, qui induit une diminution du taux d'IGFs dans la circulation sanguine mais également dans la plupart des tissus (Underwood *et al.* , 1986).
- le génotype des brebis qui influence les concentrations plasmatiques des IGFs (Spicer *et al.* , 1993).
- l'oestradiol qui stimule l'expression de l'IGF-I dans l'ovaire (Giudice, 1992).
- la PMSG et la FSH, qui incitent une modeste hausse intrafolliculaire des IGFs-I (Hsu et Hammond, 1987; cités par Monget *et al.* , 1989) et une légère réduction des taux des IGFs-II dans le fluide folliculaire des ovaires de la truie (Samaras *et al.* , 1994).

Peu de choses sont connues à ce jour quant à la régulation de l'expression des différents mRNAs de l'IGF-II.

I.3.4.1.4. Les protéines de liaison (IGFBPs).

En 1974, Hintz fut le premier à mettre en évidence des protéines spécifiques transporteuses de la somatomédine C dans le sérum (Rutanen et Pekonen, 1990). Par après, six IGFBPs, codées par des gènes différents, furent identifiées chez l'homme, le rat, le porc (fig. 20) et le mouton (Monget, 1993). Leur affinité pour les IGFs est de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-9} M (Baxter, 1988; cité par Adashi *et al.* , 1991).

Ces IGFBPs se répartissent suivant deux complexes (Ooi et Helington, 1988; cités par Holly et Wass, 1989):

- le grand complexe, régulé par la GH, et dont fait partie l'IGFBP-3.
- le petit complexe, non régulé par la GH, et intégrant les autres protéines de liaison découvertes jusqu'à ce jour, à savoir: les BP-1, BP-2, BP-4, BP-5 et BP-6.

I.3.4.1.4.1. Le grand complexe.

Le grand complexe possède un poids moléculaire de 150 KDa et il se divise en trois sous-unités:

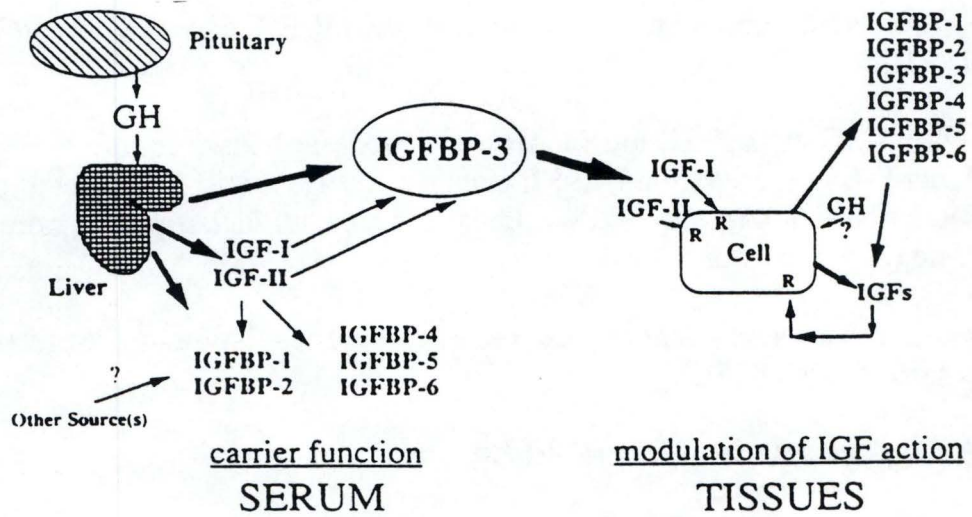


Figure 21: Diagramme illustrant les fonctions des protéines de liaison des IGFs. Elles font office de transporteurs des IGFs ou modulent les actions de ces facteurs de croissance sur les tissus cibles (Giudice, 1992).

- une sous-unité β composée de la protéine de liaison BP-3. Celle-ci est la protéine la plus fréquemment retrouvée dans le sérum. Elle lie l'IGF-I et l'IGF-II avec une affinité équivalente (Czech, 1989). Cette protéine se présente sous forme d'une glycoprotéine de poids moléculaire de 42 à 44 KDa (Monget *et al.*, 1993).

- une sous-unité γ , constituée de l'IGF-I ou de l'IGF-II.

- une sous-unité α , constituée d'une glycoprotéine de 85 KDa, labile à l'acide, et se liant à la BP-3 seulement en présence d'un IGF (Czech, 1989).

La majeure partie du grand complexe de liaison à l'IGF paraît être maintenue dans la circulation (Binoux et Hossenlopp, 1988; cités par Holly et Wass, 1989).

I.3.4.1.4.2. Le petit complexe.

Le petit complexe de liaison à l'IGF est constitué des petites protéines de liaison dont le poids moléculaire gravite autour de 30 KDa. La présence de ces protéines dans les tissus suppose qu'elles peuvent jouer un rôle plus actif et intéressant que celui du grand complexe (Holly et Wass, 1989). En effet, ces polypeptides sont pourvus d'une séquence Arg-Gly-Asp C terminale, nécessaire à l'acquisition d'une certaine adhérence à la surface cellulaire. Cette séquence n'est pas retrouvée dans le grand complexe (Rutanen et Pekonen, 1990).

L'affinité de ces protéines de liaison est plus importante pour l'IGF-II que pour l'IGF-I (Giudice, 1992).

La BP-1 est actuellement la plus connue des protéines de liaison faisant partie du petit complexe. A l'origine, l'IGFBP-1 fut identifiée dans le liquide amniotique et par après elle fut extraite du placenta maternel. Elle était alors nommée "placental protein-12" (PP-12) (Mondschein *et al.*, 1990). Cette protéine non glycosylée a un poids moléculaire de 35 KDa et est synthétisée principalement dans l'ovaire (Barreca *et al.*, 1990), l'endomètre (Rutanen et Pekonen, 1988) et le foie (Julkiainen *et al.*, 1988; cités par Martikainen *et al.*, 1991).

I.3.4.1.4.3. Rôles des protéines de liaison.

La principale fonction des IGFBPs est le transport des IGFs. En effet, le grand complexe véhicule la majorité de ces facteurs de croissance circulants dont les taux sont probablement largement déterminés par la disponibilité du complexe de fixation. Le grand complexe peut ainsi constituer une certaine forme de stockage des IGFs (Hodgkinson *et al.*, 1989), ceux-ci n'étant pas entreposés dans des granules de sécrétion (fig. 21; Holly et Wass, 1989).

ACTIONS OF IGF-1 AND FSH ON EWE GRANULOSA CELLS

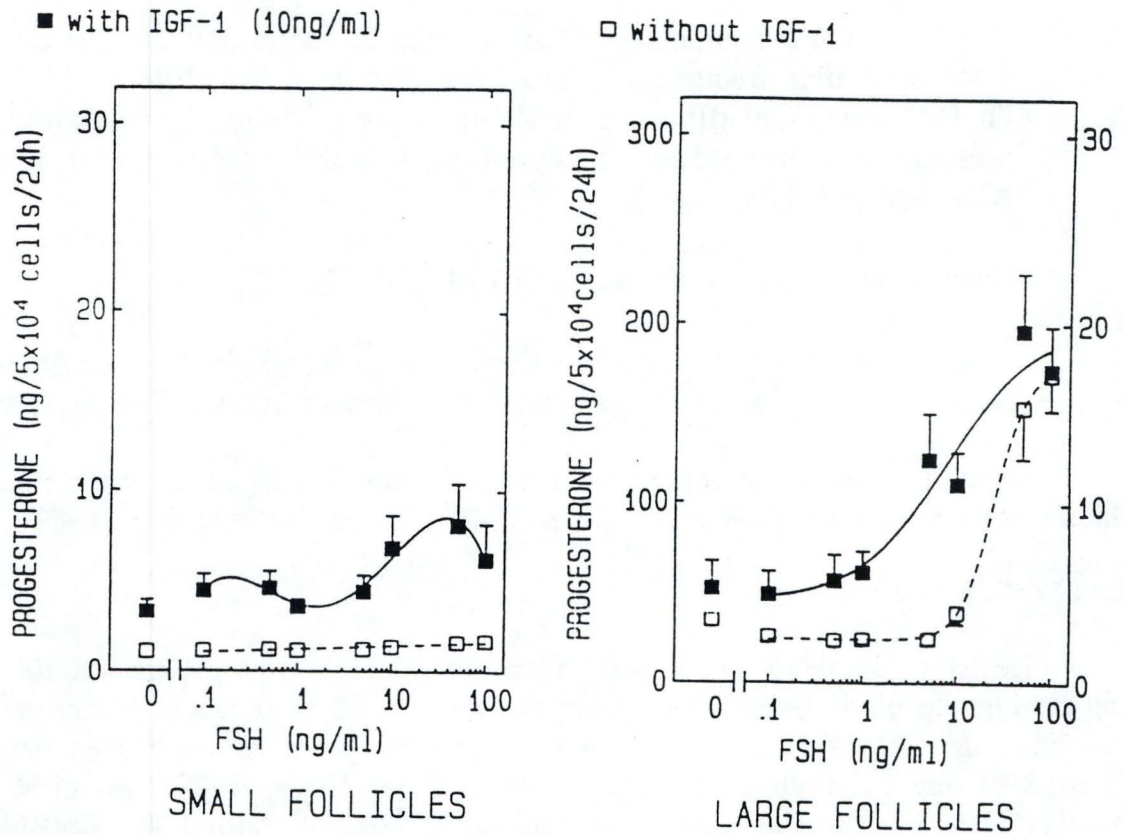


Figure 22: Effets de l'IGF-I et de la FSH sur la sécrétion de progestérone par les cellules granulosales ovariennes de brebis en culture (Monniaux et Pisselet, 1992).

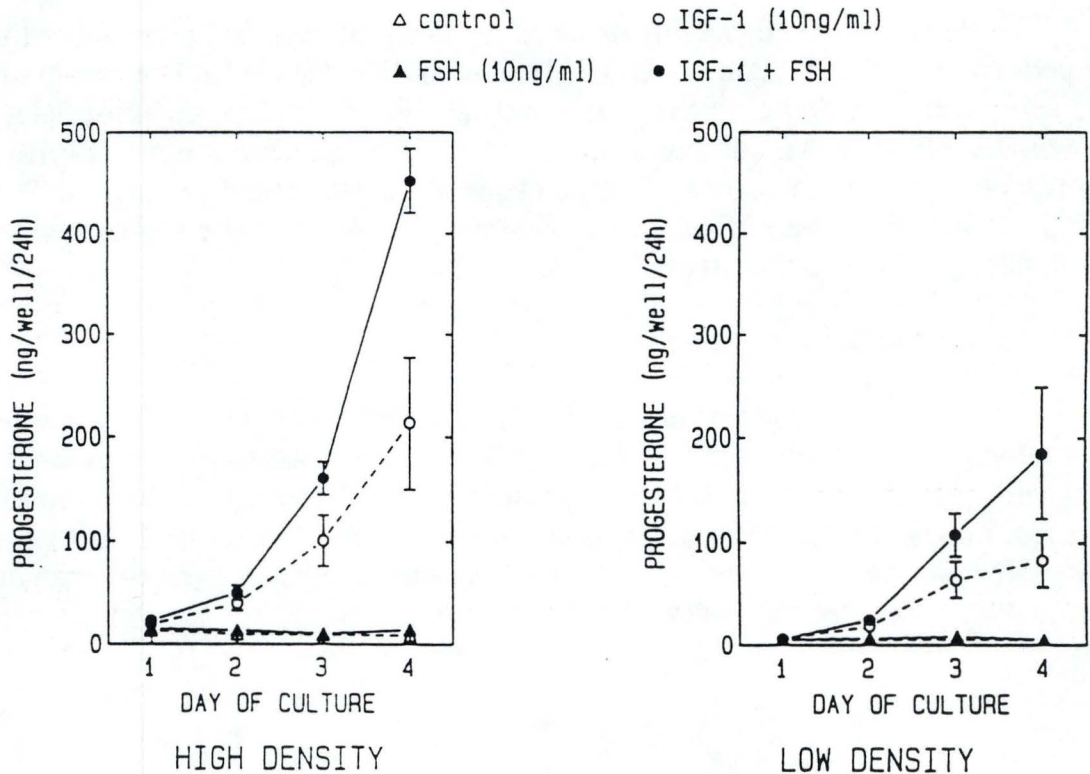


Figure 23: Effets de l'IGF-I et de la FSH sur la production de progestérone par les cellules granulosales de brebis (Monniaux et Pisselet, 1992).

Le petit complexe, quant à lui, n'est pas limité seulement à la circulation. Il peut être impliqué dans le transfert des IGFs, du plasma au tissu dans lequel ils vont agir (Hodgkinson *et al.*, 1989).

Les protéines de liaison possèdent comme autre propriété la protection des IGFs de la dégradation et donc l'augmentation de leur temps de demi-vie. Celui-ci est de vingt minutes lorsque l'IGF est libre; par contre, quand celui-ci est lié au grand complexe de fixation, le temps de demi-vie s'étend de treize à vingt heures (Guler *et al.*, 1987; cités par Holly et Wass, 1989). La liaison de l'IGF au petit complexe lui procure un temps de demi-vie intermédiaire.

Les IGFBPs jouent également un rôle modulateur (souvent inhibiteur) des actions des IGFs (Rutanen et Pekonen, 1990). Par exemple, certaines recherches donnent à penser que, dans les cellules de la granulosa de l'ovaire, ces protéines de liaison réduisent l'activité des facteurs qu'elles transportent et que, dès lors, l'atrésie et la croissance folliculaire chez la brebis sont moins déterminées par des changements de taux des IGFs que par une variation des taux de leurs protéines de liaison (Monget *et al.*, 1993).

Ces modulations induites par les IGFBPs pourraient être dues à une compétition exercée par celles-ci pour empêcher la fixation de l'IGF au niveau de son récepteur (Adashi *et al.*, 1990).

1.3.4.1.5. Rôles dans l'ovaire.

L'insuline et l'IGF-I sont impliqués comme modulateurs possibles du développement folliculaire ovarien. Ils agissent à la fois sur les cellules de la granulosa et sur les cellules intersticielles de la thèque (Holly et Wass, 1989). Des résultats analogues ont été observés pour les actions des IGFs-II mais à des concentrations plus élevées (Kamada *et al.*, 1992), ceux-ci agissant probablement par l'intermédiaire des récepteurs de type I (Adashi *et al.*, 1989).

1.3.4.1.5.1. Prolifération des cellules de la granulosa.

Chez la brebis, l'IGF-I favorise la prolifération des cellules de la granulosa des follicules dont le diamètre est inférieur à 3,5 mm (Campbell *et al.*, 1994). Cet effet est amplifié par les gonadotropines dont dépendent les récepteurs de type I (Adashi *et al.*, 1988).

1.3.4.1.5.2. Différenciation des cellules de la granulosa.

Les IGFs stimulent la différenciation des cellules de la granulosa des follicules de large diamètre (supérieur à 5 mm), potentialisent l'effet de la FSH sur la sécrétion de progestérone et d'oestradiol (fig. 22 et 23) et provoquent une

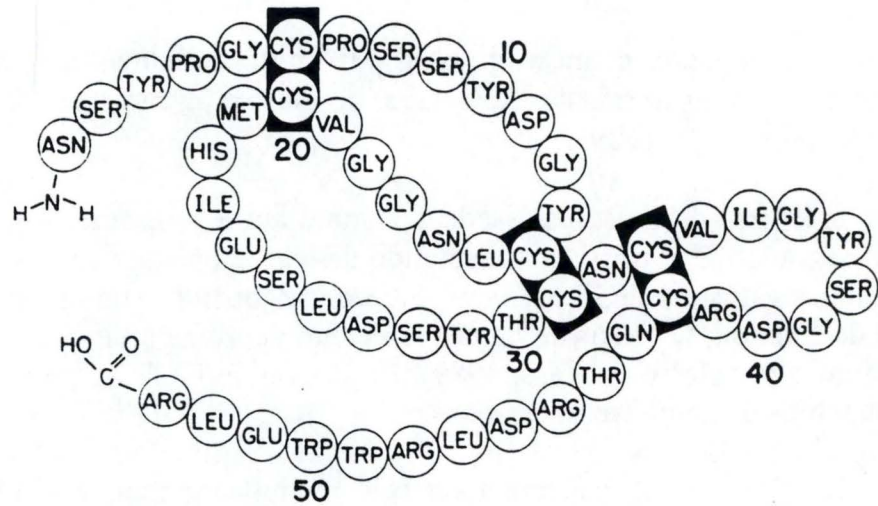


Figure 24: Séquence des acides aminés de l'EGF et emplacement des ponts disulfures (Chapman *et al.* , 1981).

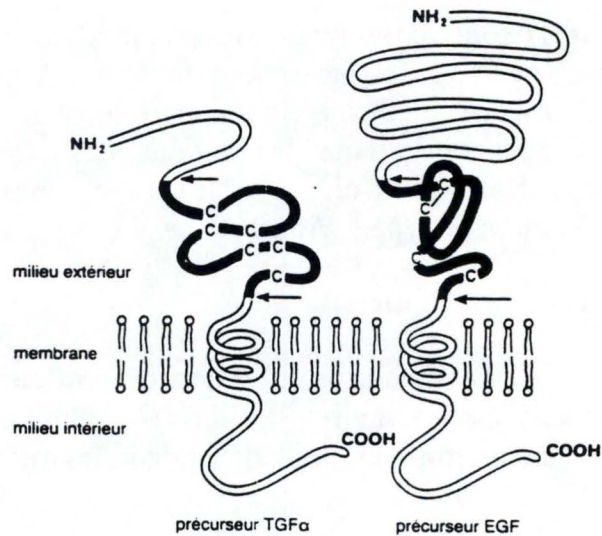


Figure 25: Schéma indiquant les sites de clivage protéolytique des précurseurs du TGF α (Transforming Growth Factor α) et de l'EGF. Ce clivage permet la libération du peptide natif (Thibault et Levasseur, 1991).

accumulation d'AMPc pouvant servir de messenger secondaire dans la transduction du signal (Veldhuis *et al.*, 1985; Adashi *et al.*, 1986). L'IGF-I serait donc un modulateur de l'action des gonadotropines (Adashi *et al.*, 1988). Par ailleurs, l'IGF seul ou en synergie avec la FSH, potentialise l'action de la FSH sur l'augmentation des récepteurs à la LH à la surface membranaire des cellules de la granulosa (Adashi *et al.*, 1988).

I.3.4.1.5.3. Différenciation des cellules thécales.

L'IGF-I potentialise l'action de la LH sur la sécrétion de progestérone et d'androstènedione (Hernandez *et al.*, 1988). En effet, il stimule l'expression du transcript de l'enzyme 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β -HSD) qui est essentielle dans la biosynthèse de l'androgène (Magoffin et Weitsman, 1993).

I.3.4.2. Le système EGF (Epidermal Growth Factor).

I.3.4.2.1. Structure et synthèse.

L'EGF est un polypeptide à simple chaîne, constitué de 53 acides aminés et dont le poids moléculaire est de 6 KDa (Hill, 1989).

La présence de trois ponts disulfures est requise pour son activité biologique (fig. 24).

Ce facteur de croissance provient d'un précurseur de 1127 acides aminés. Celui-ci comporte un domaine transmembranaire hydrophobe et un domaine cytoplasmique. Le clivage par des protéases spécifiques de la partie N-terminale extramembranaire libère le peptide mature, tandis que la partie C-terminale intracellulaire, riche en cystéines, reste attachée à la membrane (fig. 25).

L'EGF, d'abord isolé dans la glande sous-maxillaire de la souris, est synthétisé également dans le rein. Il apparaît comme un facteur exocrine libéré dans la salive, le lait, l'urine, le liquide prostatique où sa concentration est très élevée (300 ng/ml) (Thibault et Levasseur, 1991) et dans le liquide folliculaire où ses concentrations varient inversement avec la taille du follicule (Endo *et al.*, 1992).

I.3.4.2.2. Rôles dans l'ovaire.

L'EGF, comme son nom le précise, est avant tout un facteur de croissance. En effet, il stimule la prolifération des cellules granulosales des follicules primaires et secondaires (Morbeck, 1993).

Par ailleurs, l'EGF supprime les effets potentialisateurs de la FSH sur la production de ses propres récepteurs (Tilly *et al.*, 1992) ainsi que sur celle des

récepteurs à la LH des cellules de la granulosa (Endo *et al.* , 1992). L'EGF influence également les récepteurs à la FSH de façon différentielle (May *et al.* , 1987).

De même, l'EGF inhibe l'activité aromatasase des cellules granulosales (Hsueh *et al.* , 1989).

Chez la brebis , il prend part à l'induction de l'atrésie folliculaire ainsi qu'à la différenciation des follicules en phase lutéale (Radford *et al.* , 1987).

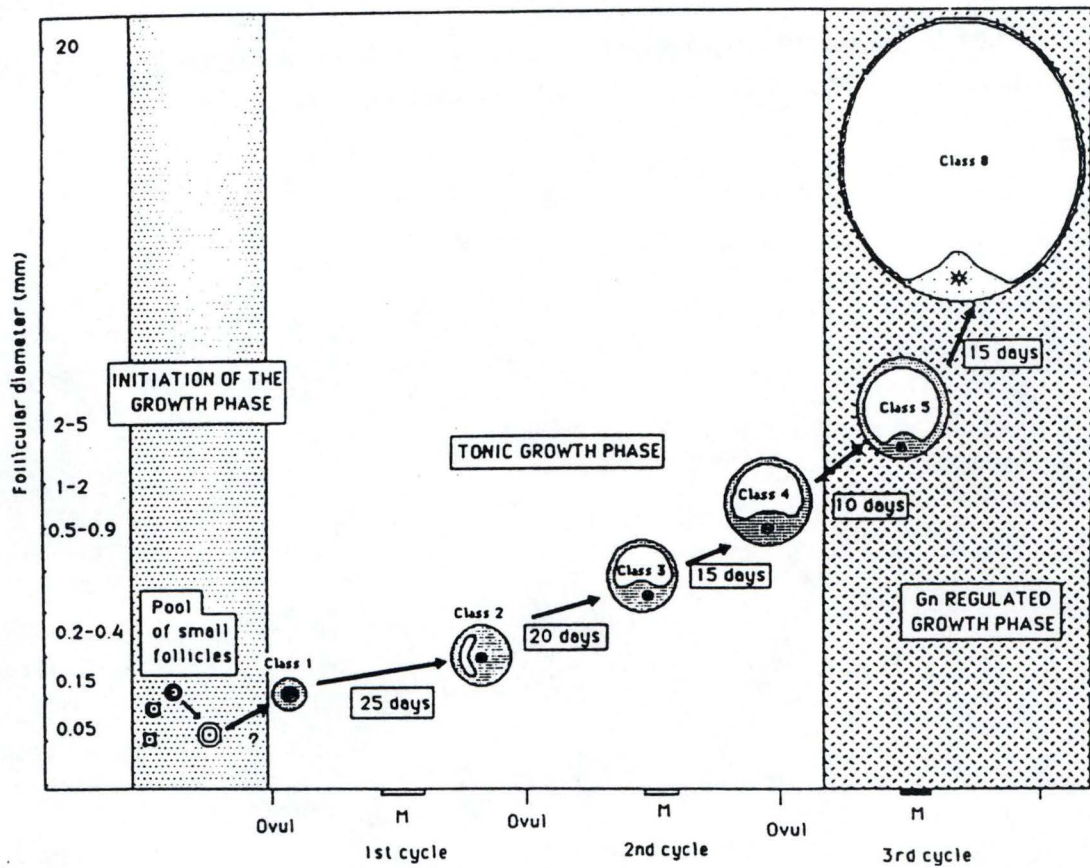


Figure 26: La croissance folliculaire et la conversion des follicules en différentes classes d'avancement (Yen et Jaffe, 1991).

II. Croissance, maturation et évolution folliculaires.

II.1. La gamétogenèse.

La gamétogenèse se résume en deux étapes clefs: l'ovogenèse, ou mise en place d'un stock de follicules primordiaux et la folliculogenèse, ou succession de différentes étapes du développement du follicule depuis le moment où il sort de la réserve constituée lors de l'ovogenèse jusqu'à sa rupture au moment de l'ovulation ou à son involution.

II.1.1. L'ovogenèse.

Au début du développement foetal, les cellules germinales primordiales appelées ovogonies migrent dans le cortex ovarien où elles se multiplient par mitose.

Les ovogonies vont augmenter de volume et acquérir la capacité de se transformer en gamètes matures. Appelés ovocytes I à ce stade, ils commencent la première division de la méiose (Dérivaux et Ectors, 1986).

Par après, les ovocytes de premier ordre vont s'entourer d'une couche de cellules granulosales d'origine épithéliale pour former les follicules primordiaux (Brännström, 1988). A ce moment, la méiose arrête sa première division au stade diplotène et le développement du follicule ne se poursuivra que pendant la maturation préovulatoire (Wheater *et al.*, 1988).

Ces follicules primordiaux constituent la réserve d'où s'échapperont les follicules destinés à la maturation. L'ovaire d'une brebis contient 1200 à 86000 follicules primordiaux dont 100 à 400 sont en phase de croissance et seulement 10 à 40 sont visibles à la surface de l'ovaire (Driancourt *et al.*, 1984).

II.1.2. La folliculogenèse (fig. 26).

La folliculogenèse est composée d'une folliculogenèse basale, responsable de la maturation et de la différenciation des follicules, et d'une folliculogenèse terminale, aboutissant à l'ovulation (Yen et Jaffe, 1991).

II.1.2.1. la folliculogenèse basale.

La folliculogenèse basale révèle des phénomènes qui président le développement et la maturation des follicules, comportant une phase de croissance et une phase de maturation. Les follicules primordiaux traverseront différentes

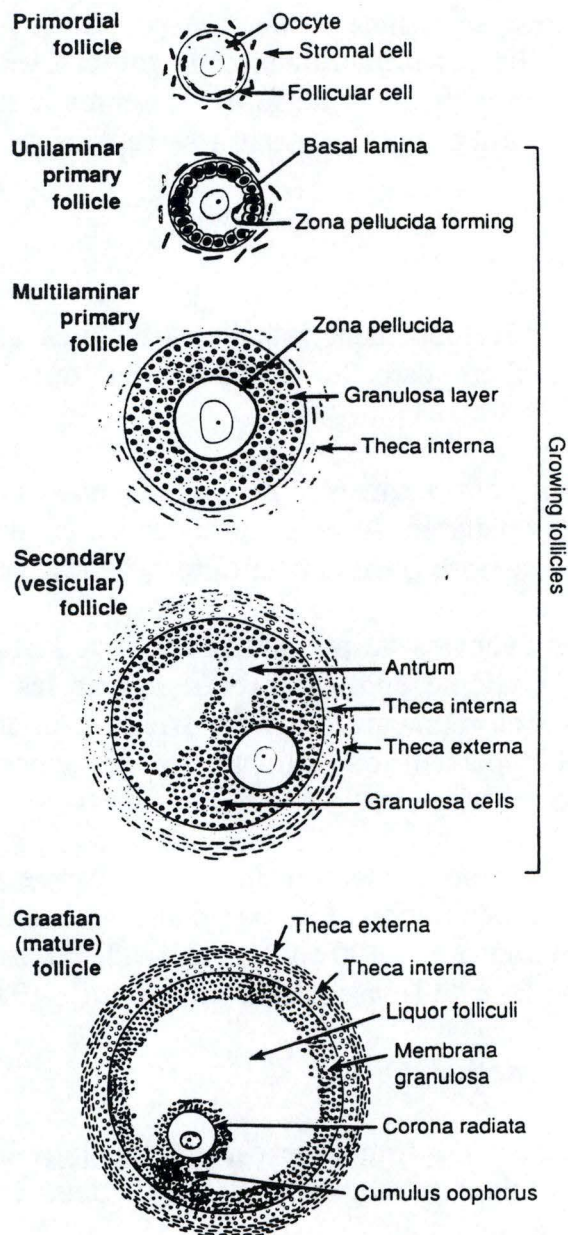


Figure 27: La folliculogénèse basale: évolution morphologique du follicule (Junqueira *et al.*, 1989).

étapes en vue de leur différenciation: primaire, secondaire, tertiaire et antrale (fig. 27; Yen et Jaffe, 1991).

Les follicules primordiaux sont disposés à la périphérie de l'ovaire et noyés dans du tissu conjonctif dense. Ils sont constitués d'un ovocyte primaire, entouré d'une seule couche de cellules aplaties. Ils représentent la majeure partie de la population des follicules ovariens (Dérivaux et Ectors, 1986).

Les follicules primaires se caractérisent par une augmentation du volume de l'ovocyte, entouré d'une zone pellucide composée d'au moins trois glycoprotéines différentes. Celle-ci sépare l'ovocyte d'une couche de cellules cubiques (Junqueira *et al.*, 1989).

Les follicules secondaires présentent plusieurs étages de cellules folliculaires autour de l'ovocyte. Celles-ci restent couplées par des gap-junctions. Elles développent des récepteurs à la FSH, aux oestrogènes et androgènes (Thibault et Lévasseur, 1991). Cette enveloppe nouvellement formée est appelée la granulosa. Ces follicules migrent vers la couche médullaire de l'ovaire (Dérivaux et Ectors, 1986).

Dans les follicules tertiaires, la couche externe de tissu conjonctif commence à se différencier en thèque interne, riche en capillaires et en fibres musculaires lisses, et en thèque externe, plus fibreuse. Les cellules folliculaires, ou granulosa, sont creusées d'une petite cavité remplie de liquide (Junqueira *et al.*, 1989).

Les follicules antraux ou de De Graaf, sont caractérisés par une cavité centrale, ou antrum, remplie d'un liquide sécrété par les cellules de la granulosa et dont la composition est proche du plasma sanguin. Cette cavité s'élargit de plus en plus et refoule les cellules folliculeuses vers la périphérie. A l'intérieur de l'antrum, un massif cellulaire en provenance de la granulosa, le cumulus oophorus, va enfermer l'ovocyte. Celui-ci sera entouré d'une couche de cellules d'origine granulosa, appelée corona radiata (Wheater *et al.*, 1988). Les cellules de la thèque vont alors acquérir des récepteurs spécifiques de la LH et la capacité d'assurer la biosynthèse stéroïdogenique (Yen et Jaffe, 1991).

La folliculogénèse basale ne concerne que des follicules dont le diamètre est inférieur à 2 mm chez la brebis. En effet, des expériences telles que l'ablation de l'hypophyse, ou l'observation de certains rôles échus aux hormones gonadotropiques sur la croissance folliculaire prouvent que seuls les follicules de 2 mm ou plus de diamètre répondent à une régulation hormonale (Driancourt *et al.*, 1984; Mc Neilly *et al.*, 1986). Le développement et l'atrésie des plus petits follicules en croissance sont donc peu dépendants des variations gonadotropes cycliques, leurs besoins en LH et FSH étant extrêmement réduits. Les hormones gonadotropes agissent

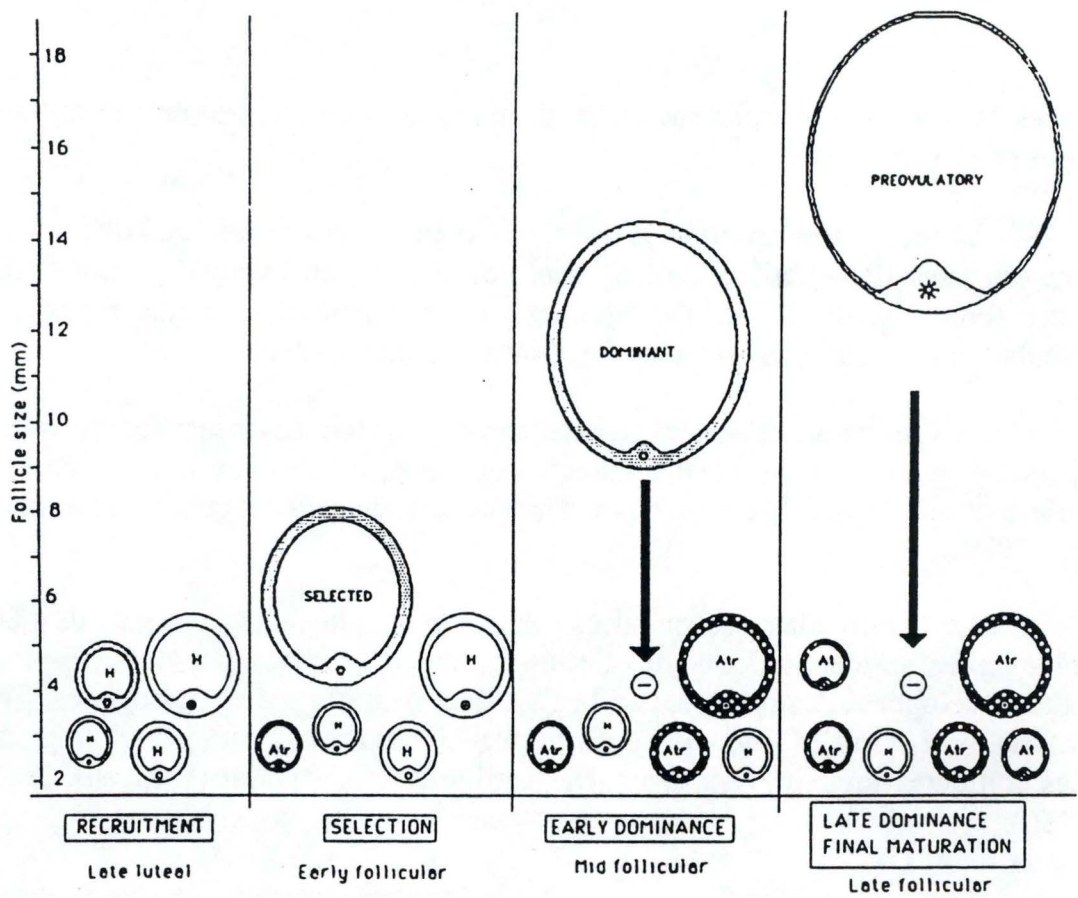


Figure 28: La croissance folliculaire terminale: recrutement, sélection et dominance des follicules (Yen et Jaffe, 1991).

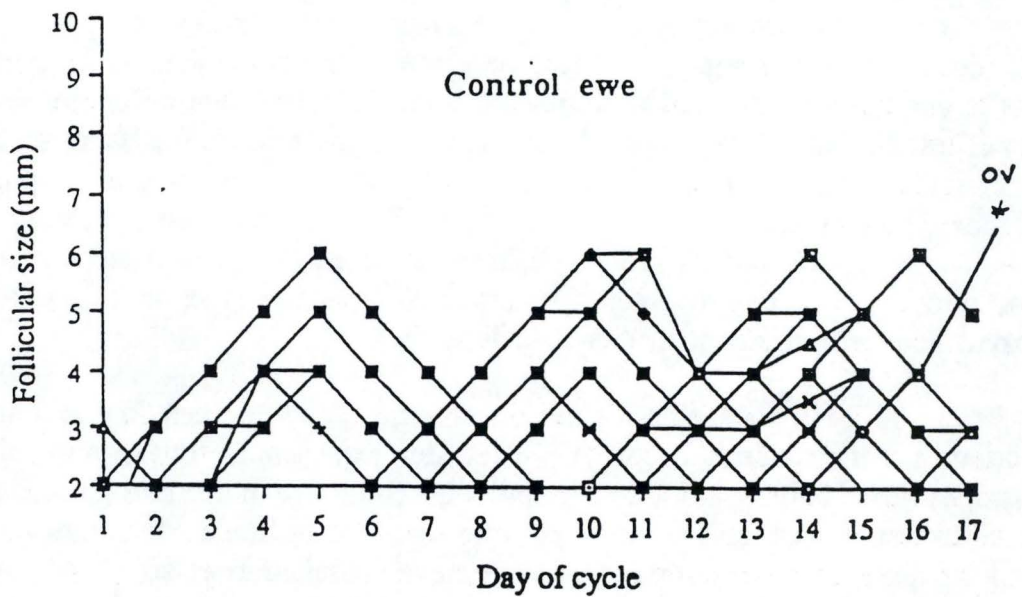


Figure 29: Représentation schématique des trois vagues de croissance folliculaire (Noël *et al.*, 1993).

probablement davantage pour moduler les capacités de synthèse et la maturation des cellules de la granulosa que sur la croissance folliculaire basale (Thibault et Levasseur, 1991).

II.1.2.2. La folliculogénèse terminale (fig. 28).

Chez la brebis, la croissance folliculaire terminale présente une distribution trimodale. La population des follicules ovulatoires se renouvelle au cours du cycle par une succession de croissances et de régressions folliculaires. Seuls certains follicules de la troisième vague subiront la croissance terminale, et pourront ovuler (fig. 29). Le nombre d'ovulations est variable d'une brebis à l'autre, il est généralement de un ou deux.

La différenciation du follicule préovulatoire se manifeste par un processus en deux étapes durant lesquelles les follicules antraux sont exposés à des stimulations gonadotropiques (Driancourt *et al.*, 1984; Mc Neilly et Fraser, 1986).

La première étape, le recrutement, est responsable du développement des follicules candidats à l'ovulation.

Ensuite, la sélection permet l'émergence parmi ces follicules recrutés du follicule ovulatoire. Le follicule sélectionné devient par conséquent dominant, parallèlement à l'amorce de la régression des autres follicules recrutés et au blocage du recrutement de nouveaux follicules (Yen et Jaffe, 1991).

II.1.2.2.1. Le recrutement.

Le recrutement concerne les follicules dont le diamètre est supérieur à 2 mm, taille à laquelle ils ont, pour leur développement, un besoin absolu en hormones gonadotropes. En effet, la destruction de plusieurs follicules de tailles différentes dans l'ovaire de la brebis par cautérisation n'affecte en rien l'ovulation, si certains follicules intacts possèdent une taille dépassant 2 mm (Driancourt *et al.*, 1984).

Le fait que la croissance préovulatoire du follicule et l'ovulation peuvent être induites lors de la saison d'anoestrus par une injection de LH (Luteinizing Hormone), plaide en faveur de la LH comme étant l'hormone majeure gouvernant le recrutement (Mc Natty *et al.*, 1984). Son rôle porterait sur la maturation de la stéroïdogénèse du follicule. Cependant, plusieurs auteurs supposent que les follicules doivent être sensibilisés par la FSH (Follicle Stimulating Hormone) avant d'être à même de répondre à l'action de la LH (Mc Natty *et al.*, 1984; Wang et Greenwald, 1993). En effet, l'administration de prostaglandines dans le fluide folliculaire, susceptibles d'amoindrir le niveau de sécrétion de la FSH, empêche le recrutement des follicules de large diamètre (supérieur à 3 mm) (Driancourt et

Cahill, 1984). La FSH agit principalement sur les follicules en amplifiant leur aptitude à aromatiser les androgènes en oestrogènes (Thibault et Levasseur, 1991).

L'action de ces hormones est modulée au niveau ovarien d'une part par la réceptivité folliculaire (nombre et activité des récepteurs) et d'autre part par les produits de sécrétion (stéroïdes, peptides). Ces produits interviennent de façon autocrine ou paracrine (Yen et Jaffe, 1991).

II.1.2.2.2. La sélection du follicule dominant.

Les pulses de LH agissent sur les follicules recrutés, ceux-ci vont sécréter des quantités de plus en plus importantes d'oestrogènes (Webb et England, 1982; Kaneko *et al.*, 1991) et d'inhibine (Ruckebuch *et al.*, 1991). Ces deux facteurs de rétro-contrôle vont provoquer une diminution de la sécrétion de FSH en exerçant un feed-back négatif au niveau de l'hypophyse. Or, la FSH est indispensable pour un bon déroulement de la croissance folliculaire. Ce processus peut expliquer la sélection du follicule dominant et l'atrésie des autres. Mais les facteurs protégeant un follicule de l'atrésie restent incertains (Yen et Jaffe, 1991).

Deux hypothèses sont actuellement retenues pour éclaircir cette sélection du follicule dominant (Driancourt *et al.*, 1984):

-l'hypothèse de la stabilité de développement, propose comme explication que quand un follicule est gros assez et a atteint un niveau donné de maturation, il se gère un certain équilibre lui permettant, grâce à ses particularités morphologiques et fonctionnelles, de ne pas répondre à la réduction des taux de FSH, qui presse les autres follicules à la dégénérescence. En effet, l'acquisition de récepteurs à la LH associée à la sécrétion active de LH pendant cette période pourrait contribuer à maintenir une production élevée d'AMP cyclique au sein des cellules de la granulosa du follicule dominant, compensant également l'effet de la baisse enregistrée de FSH et permettant de ce fait une reprise de l'activité aromatasé, processus requis pour la biosynthèse des oestrogènes.

-la deuxième hypothèse envisage une "élimination active". D'après cette interprétation, la sélection pourrait devenir un processus actif par lequel un follicule dont le niveau de maturation est suffisant inhibe le développement des autres follicules. Certains composés possibles pouvant participer à cette action ont été mis en évidence dans la veine ovarienne, dans le fluide folliculaire ou dans le plasma séminal. Ces facteurs, tels que le FSH-RBI (FSH Receptor Binding Inhibitor), contrecarrent la prolifération de la granulosa et l'aromatation des androgènes en oestrogènes, favorisant ainsi l'atrésie folliculaire (Sluss et Schneyer, 1992) ou sont capables de réduire la libération de la FSH, comme l'inhibine (Mann *et al.*, 1992).

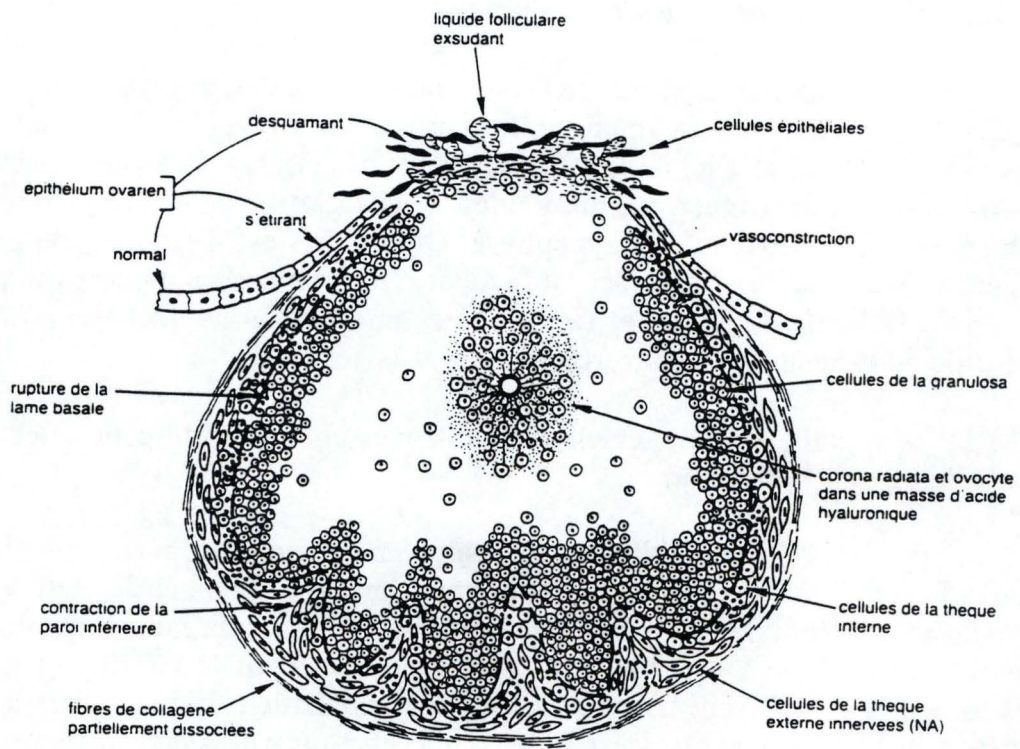


Figure 30: Morphologie d'un follicule un peu avant l'ovulation (Thibault et Levasseur, 1991).

II.2. L'ovulation (Brännström, 1988; Thibault et Levasseur, 1991; Yen et Jaffe, 1991).

L'ovulation consiste en un rapide élargissement du follicule précédant une protrusion de celui-ci à partir de la surface du cortex ovarien (fig. 30).

Il se produit une augmentation du flux sanguin. La lame basale séparant la granulosa de la thèque disparaît par endroits et des vaisseaux sanguins ainsi que des cellules de la thèque interne pénètrent dans le follicule.

Le volume de l'antrum augmente à la suite d'un appel d'eau dû à la présence abondante d'acides hyaluroniques sécrétés par les cellules du cumulus sous l'action de la LH et de la FSH. Cette augmentation est facilitée par la dissociation des faisceaux de fibres de collagène de la thèque externe et de l'albuginée par l'action de la collagénase. Il se produit une ishémie avec stase sanguine qui entraîne la mort des cellules de l'épithélium ovarien. Les hydrolases qu'elles libèrent contribuent à la destruction complète des assises folliculaires sous-jacentes. Le follicule se rompt, expulsant l'ovocyte.

Ces changements morphologiques succèdent à une brusque élévation de l'émission des hormones gonadotropes. La décharge gonadotrope entraîne une augmentation de la sécrétion des stéroïdes intra-folliculaires et principalement de la P₄. En effet, celle-ci est indispensable à l'ovulation, et par après à la maturation de l'ovocyte.

La décharge ovulatoire des gonadotropines provoque également une élévation progressive du niveau des prostaglandines PGF_{2α}. Elles sont produites en grande partie par les cellules de la granulosa et gouvernent la rupture folliculaire.

II.3. L'atrésie folliculaire.

L'atrésie ou involution folliculaire constitue le devenir d'une très grande majorité des follicules présents dans l'ovaire des mammifères. Durant ce processus, les cellules folliculaires et les ovocytes vont mourir, abandonnés aux cellules phagocytaires. Ce processus est caractérisé par une interruption de l'activité mitotique des cellules de la granulosa, un détachement de celles-ci de la membrane basale, une pycnose des noyaux des cellules de la thèque et de la granulosa, et un remplacement progressif des follicules atrétiques par du tissu fibreux (Junqueira *et al.*, 1989).

La production d'oestrogènes est affectée par l'atrésie. Celle-ci favorise l'inhibition de l'activité de l'enzyme aromatisation (Monniaux, 1987). Par contre, le taux de sécrétion de progestérone reste identique (Terqui *et al.*, 1988).

Une autre conséquence de la dégénérescence folliculaire, se révèle par une réduction du nombre de récepteurs aux gonadotropines dans les cellules de la granulosa (Webb et Gauld, 1984).

II.4. Formation du corps jaune ou phase lutéale.

Après l'ovulation, le follicule rompu s'affaisse, se comble d'un caillot sanguin, et les couches de la paroi folliculaire se réorganisent pour former une glande endocrine temporaire, le corps jaune (Junqueira *et al.*, 1989).

Sous l'influence de la LH, les cellules de la granulosa vont enfler et sécréter une hormone stéroïde, la progestérone (Harrison *et al.*, 1987).

Les taux croissants de progestérone vont inhiber la sécrétion de LH et provoquer la régression du corps jaune en un tissu fibreux ou corpus albicans, non fonctionnel. Par conséquent, les sécrétions d'oestrogènes et de progestérone cessent (Bister, 1991).

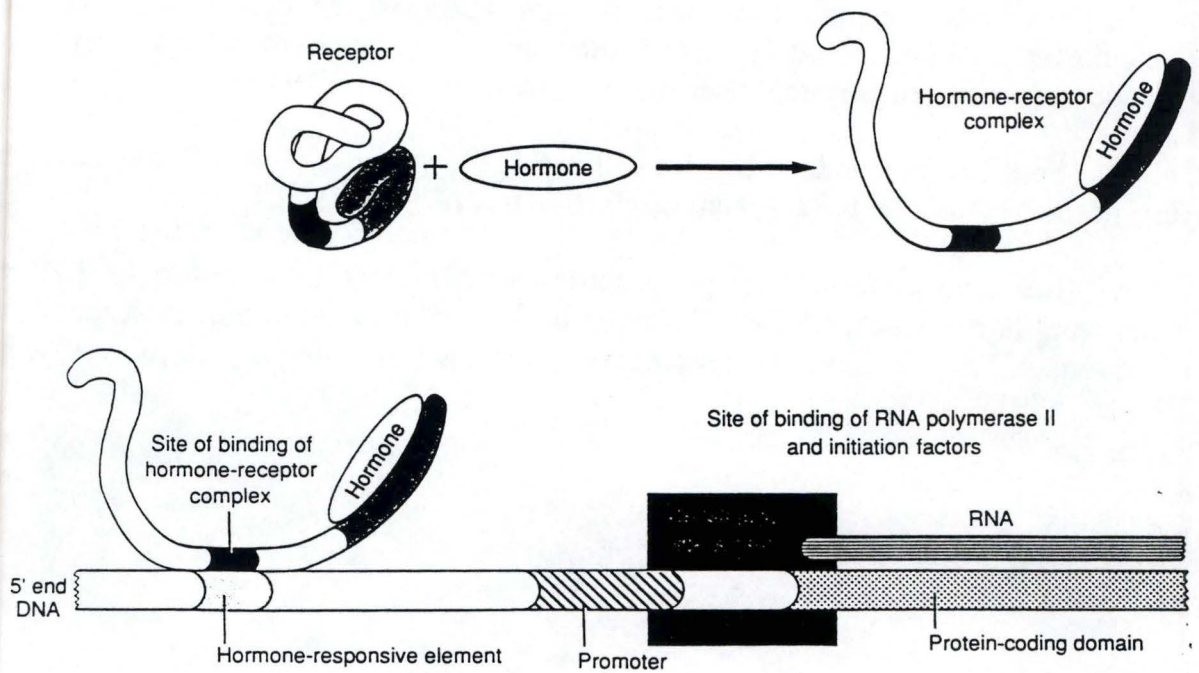


Figure 31: Activation génique par les hormones stéroïdes (Widnell et Pfinninger, 1990).

III. Les récepteurs.

III.1. Historique-Introduction (Alberts *et al.* , 1989; Widnell et Pfinninger, 1990; Darnell *et al.* , 1993).

Le terme récepteur remonte à 1905 où Langley observait le comportement de certaines drogues dans différents tissus. Il constata que au fur et à mesure qu'il augmentait la dose de drogue, la réponse du tissu s'intensifiait jusqu'à atteindre un plateau. Cette saturation témoignée par le tissu ne pouvait être expliquée que par la présence de récepteurs, dans une quantité bien évidemment limitée.

La détection d'un signal par un récepteur protéique particulier et une modification cellulaire enclenchée par le complexe ligand-récepteur représentent des étapes importantes dans la communication intercellulaire. Le récepteur protéique possède un site d'affinité élevée pour son ligand.

La réponse d'une cellule ou d'un tissu à un signal donné dépend du type de récepteur impliqué dans la médiation et des réactions intracellulaires amorcées par le complexe ligand-récepteur. On doit donc considérer la fonction d'un récepteur sous deux aspects: la spécificité de liaison à son ligand et la spécificité d'action, qui détermine la modification du comportement cellulaire.

Différents ligands se fixant aux récepteurs protéiques sont classés actuellement en trois catégories:

-les petites molécules lipophiles, dont font partie les stéroïdes sexuels, se fixent sur des récepteurs cytosoliques ou nucléaires après avoir franchi la membrane cellulaire.

-les molécules hydrophiles ou hormones hydrosolubles, telles que la LH et la FSH, gagnent des récepteurs situés sur les surfaces membranaires.

-les molécules lipophiles, comme les prostaglandines, se lient également à des récepteurs de la membrane plasmique.

III.1.1. Action hormonale sur le noyau.

Les stéroïdes diffusent à travers la membrane cellulaire et s'associent à leur récepteur protéique nucléaire pour former des complexes qui s'accumulent dans le noyau (Widnell et Pfinninger, 1990). Ces complexes vont se fixer sur des séquences de contrôle au niveau de l'ADN et vont moduler la transcription des gènes adjacents (fig. 31).

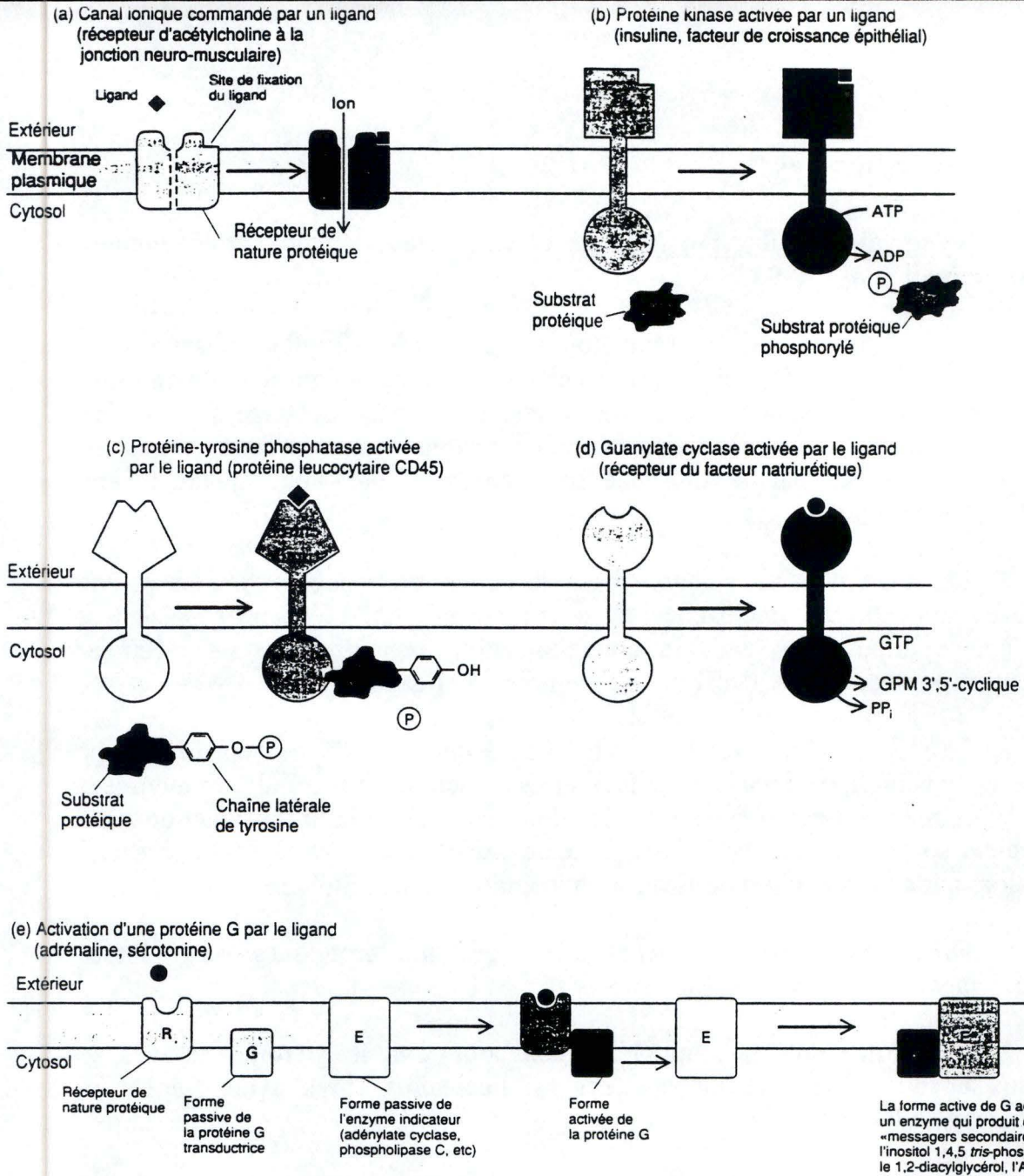


Figure 32: Schéma représentant les différentes classes de récepteurs membranaires et leur mécanisme de transduction (Darnell *et al.* , 1993).

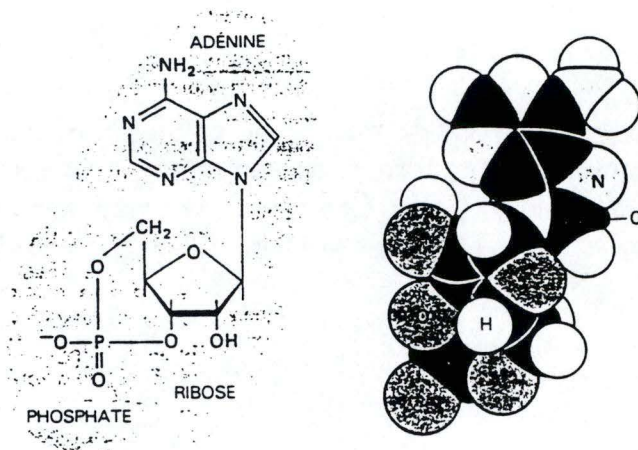


Figure 33: Structure de l'AMP cyclique (Alberts *et al.* , 1989).

III.1.2. Action hormonale sur des récepteurs membranaires.

Les protéines hydrosolubles, n'étant pas lipophiles, ne peuvent traverser la membrane par simple diffusion. Les récepteurs ancrés à la surface membranaire sur lesquels elles vont se fixer sont des glycoprotéines constituées de trois domaines: un domaine extracellulaire présentant l'extrémité NH₂ terminale, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire, se prolongeant de l'extrémité COOH terminale.

Les effets des molécules capturées à la surface de la cellule sont immédiats: la cellule réagit en quelques millisecondes, ou tout au plus, en quelques secondes.

Différents types de récepteurs membranaires superficiels enclenchent diverses réponses cellulaires. Après la fixation de leur ligand, les récepteurs membranaires activent une enzyme qui accroît transitoirement la concentration d'une substance intracellulaire appelée messenger secondaire.

Les récepteurs de surface cellulaire sont divisés en trois classes selon le mécanisme de transduction qu'ils utilisent (fig. 32: Darnell *et al.* , 1993).

III.1.2.1. Les récepteurs liés aux canaux.

Ces récepteurs sont principalement impliqués dans la transmission d'un signal synaptique rapide entre des cellules électriquement excitables.

Ce type de transmission a lieu grâce à un petit nombre de neurotransmetteurs qui ouvrent et ferment de façon transitoire le canal ionique auquel ils se lient, modifiant ainsi la perméabilité ionique de la membrane plasmique et par conséquent le flux d'ions qui en résulte et le potentiel électrique transmembranaire.

On a montré par séquençage de l'ADN que les récepteurs liés aux canaux appartiennent à une famille de protéines membranaires homologues à traversées multiples.

III.1.2.2. Les récepteurs liés aux protéines G.

Ces récepteurs activent ou inactivent indirectement une enzyme particulière liée à la membrane plasmique. Le récepteur et l'enzyme s'associent par l'intermédiaire d'une protéine de régulation liée au GTP, la protéine G, constituée de trois sous-unités. La fixation du GTP sur la sous-unité α de la protéine G provoque une dissociation de celle-ci du reste du complexe et active une série d'événements qui modifient la concentration d'une ou plusieurs petites molécules intracellulaires. Ce sont des médiateurs qui agissent ensuite à leur tour pour modifier le comportement d'autres protéines cibles dans la cellule.

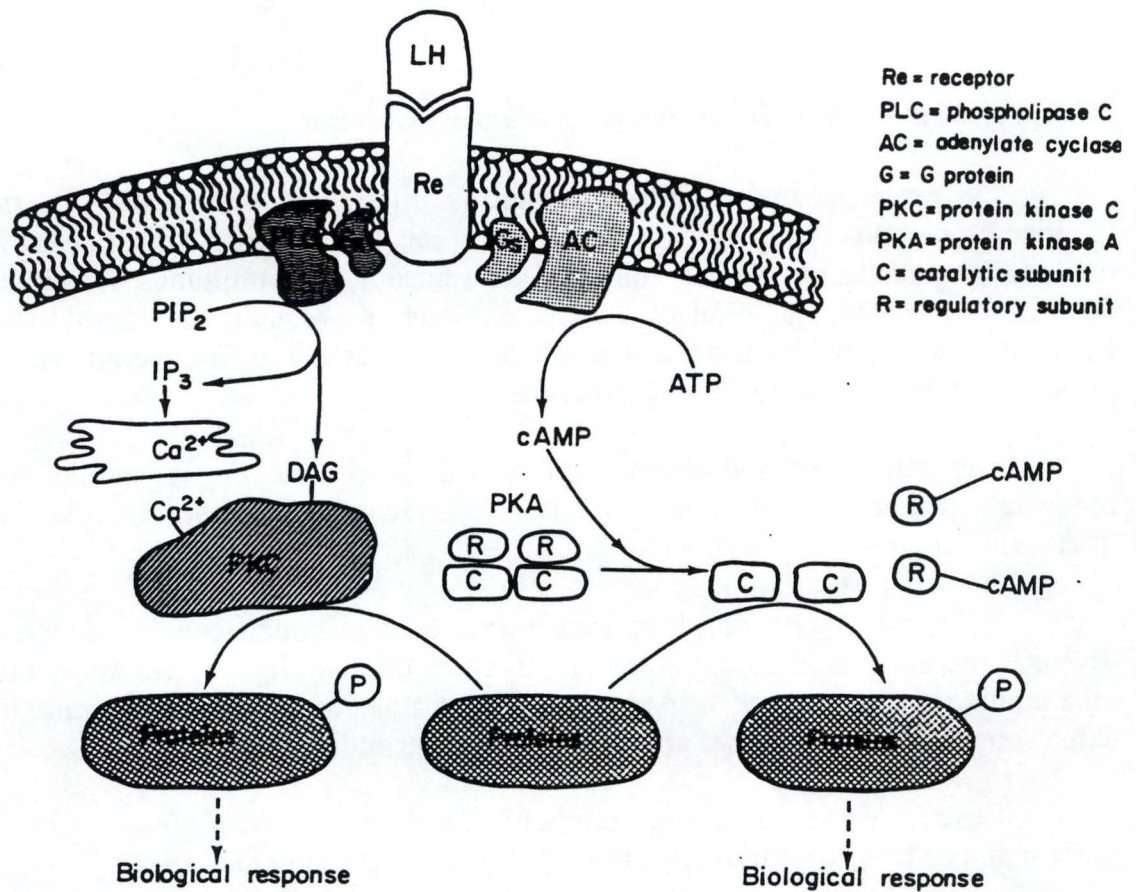


Figure 34: Mécanismes d'action des récepteurs membranaires couplés aux protéines G (Brännström, 1988).

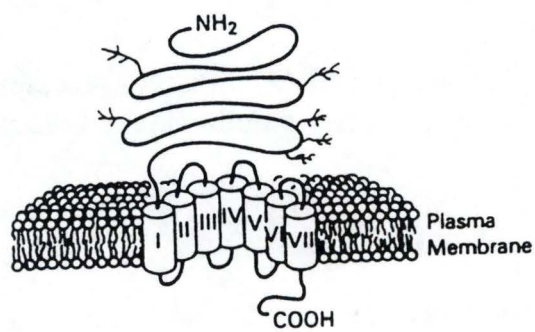


Figure 35: Structure d'un récepteur à sept passages membranaires (Yen et Jaffe, 1991).

Deux voies différentes qui font intervenir les protéines G utilisent comme médiateur intracellulaire l'AMP cyclique (fig.33) ou l'ion calcium (Ca^{2+}). Dans le premier cas, les récepteurs couplés aux protéines G vont activer ou inactiver une adénylate cyclase, responsable de la formation d'AMPc. Ce mécanisme est utilisé par les gonadotropines. Dans le deuxième cas, c'est une phospholipase C qui sera activée. Celle-ci va hydrolyser le phosphatidyl-inositol biphosphate en inositol triphosphate (IP_3), qui va entraîner une élévation du taux intracytosolique de Ca^{2+} , et en diacylglycérol (DAG), qui active la protéine kinase C membranaire (fig. 34).

Ces récepteurs présentent sept passages transmembranaires (fig. 35).

III.1.2.3. Les récepteurs catalytiques.

Ces récepteurs sont des glycoprotéines transmembranaires à traversée unique avec une activité protéinique kinase spécifique de la tyrosine.

Le domaine catalytique de la tyrosine kinase est exposé sur la face cytoplasmique de la membrane cellulaire (fig. 36).

Lorsque les récepteurs sont activés par la fixation de leur ligand, ils sont autophosphorylés sur leurs résidus tyrosine et peuvent également opérer le transfert du groupement phosphate de l'ATP sur les résidus tyrosine de protéines sélectionnées dans la cellule cible.

Les récepteurs de la plupart des facteurs de croissance sont pourvus d'une activité tyrosine kinase ou sérine/thréonine kinase.

III.1.3. Action des grosses molécules lipophiles sur des récepteurs membranaires.

Les molécules liposolubles concernées (prostaglandines, ...) agissent au niveau de la cellule cible en s'associant à un récepteur membranaire car elles sont trop volumineuses pour se frayer un passage à travers la membrane.

III.2. Les récepteurs des gonadotropines.

III.2.1. Structure.

En 1991, Yarney et Sairam déterminèrent le poids moléculaire des récepteurs à la LH et à la FSH à partir des membranes testiculaires ovines. Le poids moléculaire des récepteurs à ces deux hormones est estimé actuellement à 70 KDa pour la FSH et à 150 KDa pour la LH. Ils stipulèrent également que les propriétés structurales et de fixation des récepteurs à la FSH du mouton étaient identiques à celles des autres mammifères; par contre il en allait autrement en ce qui concerne les récepteurs spécifiques à la LH: malgré la similitude de leurs

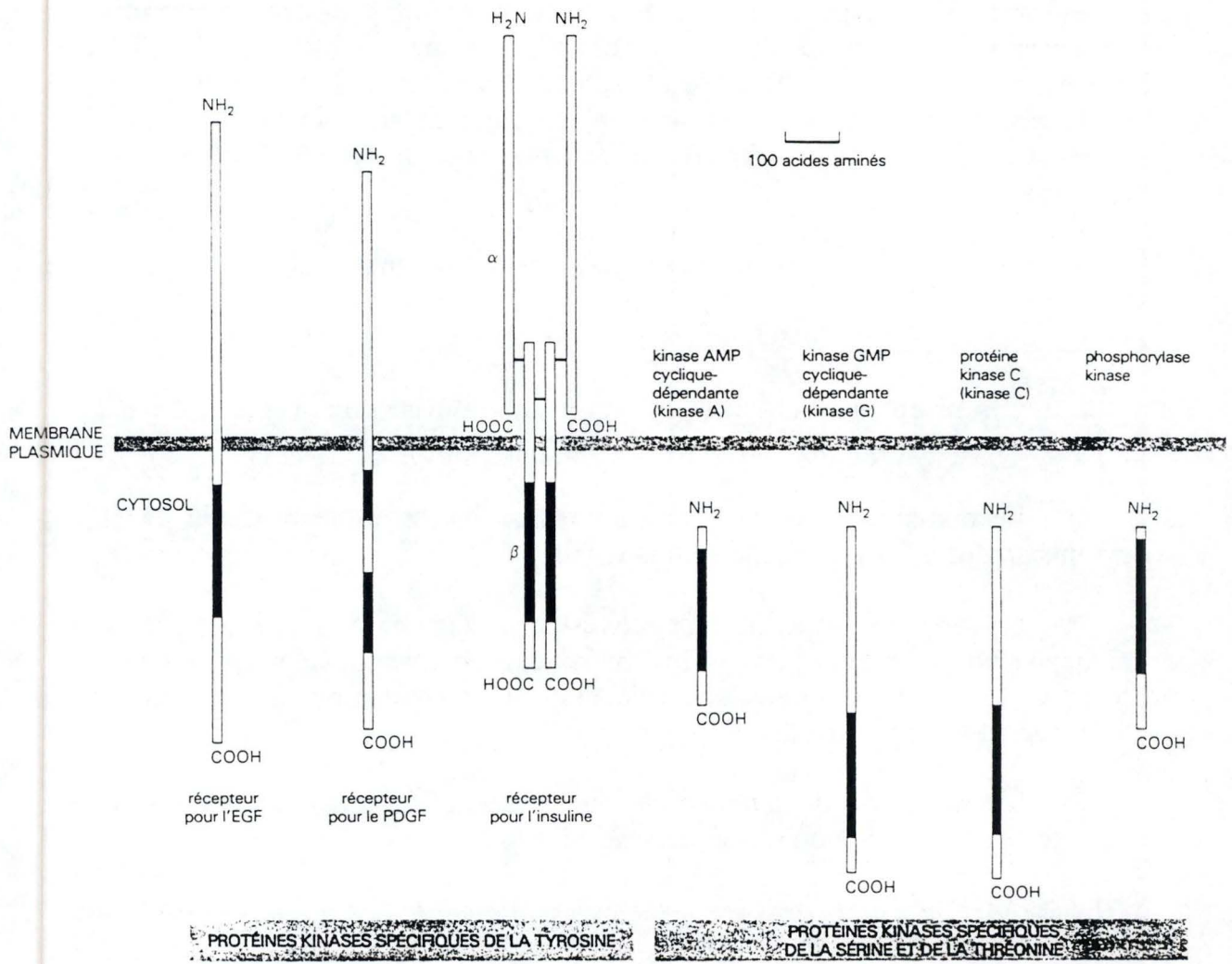


Figure 36: Exemples de récepteurs catalytiques (Alberts *et al.*, 1989).

structures, la spécificité pour leur ligand devait être très différente (Yarney et Sairam, 1991).

En 1992, Dattatreyamurky et ses collaborateurs proposent un modèle du récepteur à la FSH et à la LH à partir des membranes testiculaires bovines: la forme mature du récepteur à la FSH pourrait être un oligomère dont le poids moléculaire se situe aux environs de 240 KDa et qui est hautement stabilisé par des ponts disulfures intrachâînes. Au contraire, le récepteur spécifique de la LH serait de nature monomérique et posséderait un poids moléculaire de 90 KDa .

Cette différence structurale entre les deux récepteurs pourrait manifester beaucoup d'importance au moment de la reconnaissance et de la transduction du signal. Cependant, la comparaison au niveau génique des deux récepteurs gonadotropiques pourrait témoigner d'une origine ancestrale commune de ces deux éléments (Hackert *et al.* , 1992).

Les récepteurs gonadotropiques sont pourvus également de résidus carbohydrates qui ne semblent avoir aucun effet sur la fixation de leur ligand mais qui disposeraient d'autres fonctions telles que l'internalisation et le transport intracellulaires ou la transduction du signal (Petäjä-Repo *et al.* , 1991).

III.2.2. Interaction hormone-récepteur.

La spécificité de fixation de l'hormone à son récepteur est détenue par la sous-unité β de l'hormone. Or les sous-unités β de la LH et de l'hormone placentaire humaine, la hCG (human Chorionic Gonadotropin) sont homologues à 85%. Les deux hormones interagissent donc avec le même récepteur et produisent le même effet biologique. Cependant, d'après les courbes dose-réponse réalisées *in vitro* vis-à-vis de la production d'AMPc ou de stéroïdes, le récepteur présente une affinité moindre pour la LH que pour l'hCG (Ronin, 1989). Il en est de même pour la FSH et son homologue la PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin).

Des études sur les récepteurs ovariens de rat, à l'aide d'anticorps polyclonaux, ont suggéré que la reconnaissance du ligand par le récepteur se faisait dans un premier temps au niveau de la sous-unité β , et que dans un deuxième temps elle impliquerait la sous-unité α grâce à un changement de conformation de l'hormone au contact du récepteur (Moyle *et al.* , 1987; cités par Ronin, 1989).

Dans notre cas, les propriétés d'affinité et de spécificité sont structurellement disjointes (Thibault et Levasseur, 1991). C'est en effet la sous-unité α qui est responsable de la haute affinité de l'association des différentes hormones aux récepteurs, mais elle n'exerce aucune discrimination de liaison. Ce sont les sous-unités β qui conditionnent la spécificité de liaison en inhibant la

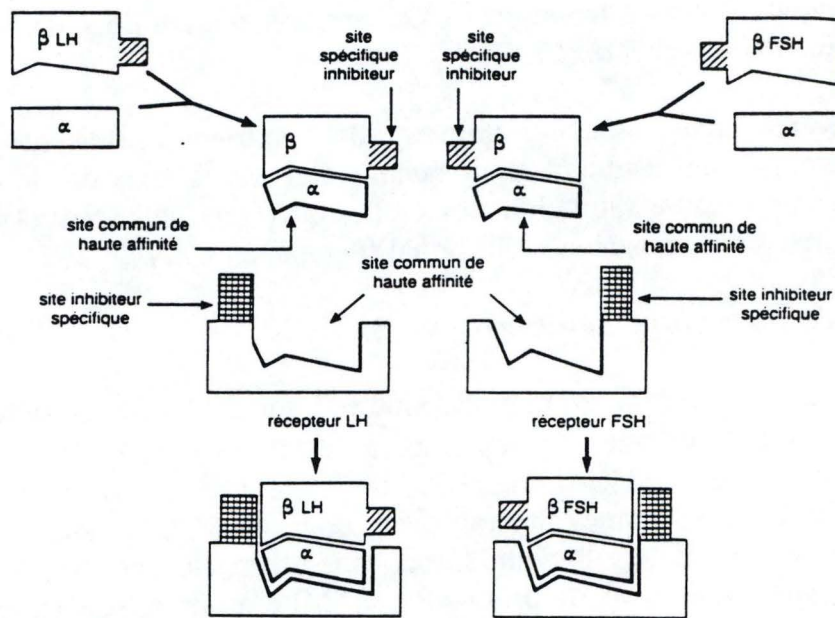


Figure 37: "Spécificité négative" de l'interaction des hormones gonadotropiques avec leur récepteur (Thibault et Levasseur, 1991).

fixation de chaque hormone aux récepteurs des autres hormones possédant le site de haute affinité pour α (fig. 37).

III.2.3. Mode d'action des récepteurs.

Le récepteur des gonadotropines est couplé à l'enzyme membranaire adénylate cyclase, responsable de la formation du messenger secondaire AMPc à partir de l'ATP lors de la médiation cellulaire (Tilly *et al.*, 1992). Ce médiateur va lui-même déclencher une série d'activations cellulaires.

Comme il a déjà été mentionné auparavant, la glycosylation des deux sous-unités de l'hormone paraît déterminante lors du couplage.

III.2.4. Régulation des récepteurs.

L'administration chronique de GnRH chez le rat entraîne, selon les cas, un retard de l'ovulation, de l'implantation de l'oeuf, de la maturation sexuelle, ou encore une interruption de grossesse. Ces effets ont été initialement attribués aux conséquences d'un taux plasmatique dramatiquement élevé de LH et donc d'un résultat de "down regulation" des récepteurs gonadotropiques (Schwall et Erikson, 1984). Mais des observations plus récentes montrent que la GnRH atténue les actions positives de la FSH sur la régulation du taux des mRNAs des récepteurs gonadotropiques. Cet effet est contrecarré par un cotraitement des cellules de la granulosa avec un antagoniste de la GnRH, ce qui indique que la GnRH exerce son pouvoir par l'intermédiaire de ses récepteurs (Tilly *et al.*, 1992).

Les gonadotropines sont capables quant à elles de stimuler la différenciation des cellules granulosales ovariennes en induisant la production de leurs propres récepteurs (Jia et Hsueh, 1984; Monniaux et Reviers, 1989). Cette autorégulation positive pourrait expliquer le rôle important de la LH lors des étapes avancées de la maturation folliculaire.

Outre sa propre régulation, la FSH (ainsi que la PMSG) potentialise l'apparition et la production des récepteurs à la LH à la surface des cellules interstitielles de la thèque et granulosales (Jia *et al.*, 1985; Peng *et al.*, 1991).

Un traitement de plusieurs jours à des doses élevées de prolactine ovine (oPRL), subi par des ratte, inhibe l'ovulation de même que la formation du corps jaune et favorise l'atrésie folliculaire. Or, la PRL est une hormone hypophysaire qui participerait chez certaines espèces au complexe lutéotrope nécessaire au maintien du corps jaune (Dérivaux et Ectors, 1986). Dans notre cas, elle bénéficie d'un effet réducteur sur le nombre des récepteurs de la LH, bloquant de ce fait la maturation folliculaire et rendant caduque une induction de l'ovulation par l'injection de gonadotropines. Mais à des concentrations plus modestes, la PRL connaît un impact contraire et est impliquée avec la FSH, lors de la lutéinisation, pour induire les récepteurs de la LH.

La capacité de fixation de la LH et la prolifération des petites cellules lutéales durant les premières étapes du cycle oestral sont stimulées pendant un court temps par la prostaglandine $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Pohland *et al.*, 1994).

Chez le rat et le porc, l'influence de certains facteurs de croissance sur la fixation de la FSH à son récepteur a été mise en évidence:

- le $\text{TGF}\beta$ (Transforming Growth Factor β) accroît les taux du transcript de la FSH, tandis que le $\text{TGF}\alpha$ supprime cet effet. Ces facteurs participeraient donc à la différenciation des cellules de la granulosa en modulant l'expression du gène du site de liaison de la FSH (Dunkel *et al.*, 1994).
- l'EGF (Epidermal Growth Factor) favorise, dans les cellules granulosales porcines, une augmentation du taux des transcripts des récepteurs de la FSH (May *et al.*, 1987; Morbeck *et al.*, 1993). En revanche, l'EGF influence négativement l'impact stimulateur exercé par la FSH sur ses propres récepteurs et ceux de la LH situés dans les cellules granulosales de la ratte (Tilly *et al.*, 1992).
- l'IGF (Insulin-like Growth Factor), quant à lui, potentialise la stimulation de la FSH sur l'apparition des récepteurs de la LH dans les cellules ovariennes du rat (Adashi *et al.*, 1988; Tilly *et al.*, 1992).

La présence de certains peptides régule également la capacité de liaison des gonadotropines:

- la FSH-RBI (Receptor Binding Inhibitor), retrouvée dans le sérum du rat et de l'homme, empêche la fixation de la FSH sur son récepteur par un mécanisme encore inconnu (Dérivaux et Ectors, 1986; Sluss et Schneyer, 1992).
- la LH-RBI, purifiée à partir du corps jaune bovin, porcine, ovin et de la ratte (Yang *et al.*, 1984), est capable d'inhiber la fixation de la LH sur ses récepteurs des cellules granulosales et ainsi de ralentir la sécrétion des stéroïdes sexuels. Les follicules ne sont alors plus à même de répondre à de fortes concentrations de LH (Chari *et al.*, 1992).

D'autres facteurs, tels que l'interleukine-I (IL-I), sécrétée par les macrophages du système immunitaire, sont inhibiteurs de la différenciation des récepteurs à la LH sur les cellules de la granulosa. La production de ces interleukines est soutenue par les stéroïdes (Driancourt *et al.*, 1990).

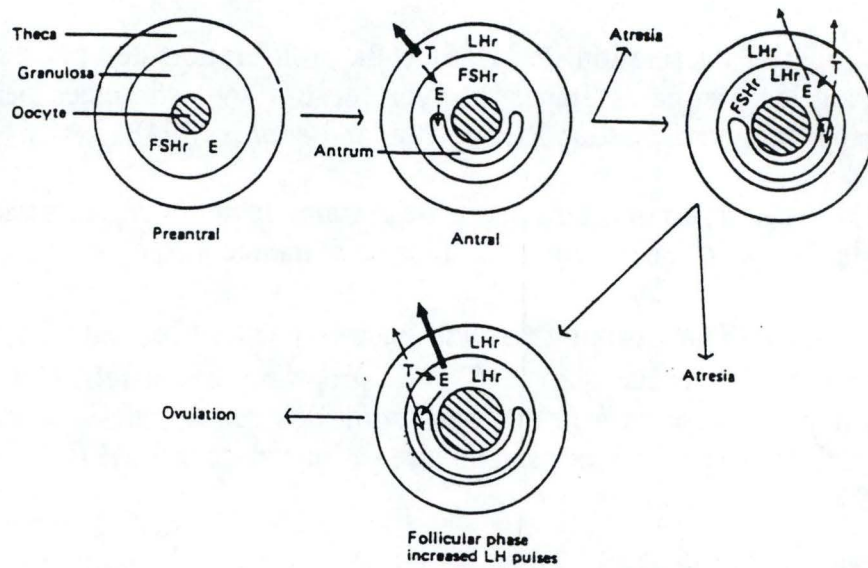


Figure 38: Localisation des récepteurs à la LH et à la FSH au cours du cycle sexuel de la brebis (Webb et Gauld, 1984).

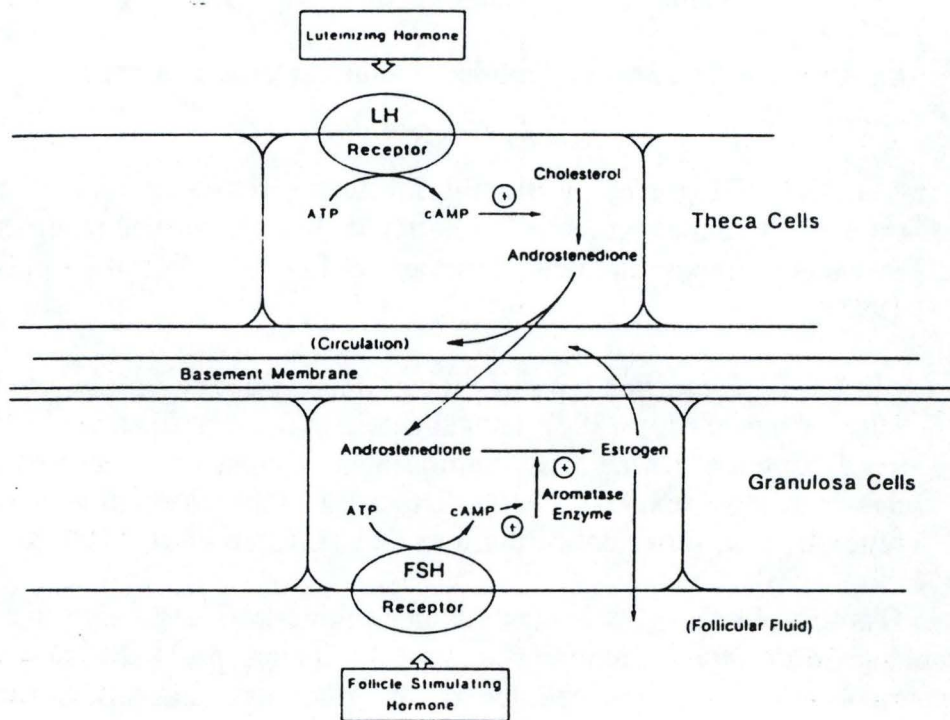


Figure 39: Complicité existant entre les récepteurs à la LH et à la FSH en vue de la production de l'oestradiol (Yen et Jaffe, 1991).

III.2.5. Localisation, évolution et rôles des récepteurs au cours du cycle (fig.38).

Les follicules préantraux sont pourvus de récepteurs à la FSH, principalement dans la granulosa, et de récepteurs à la LH, uniquement au niveau des cellules interstitielles et lutéales de la thèque (Webb et Gauld, 1984). Ainsi, les cellules de la granulosa contiennent initialement des récepteurs à la FSH. Elles vont proliférer et les récepteurs de la FSH vont se multiplier de façon prononcée avec l'augmentation progressive de la taille du follicule (Oxberry et Greenwald, 1982).

Ces cellules vont alors participer à la formation de l'antrum et acquérir des récepteurs à la LH sous l'influence de la FSH (Carson *et al.*, 1979). La dépendance du follicule à la LH pour sa maturation est d'abord un besoin de production d'androgènes par les cellules thécales et par après une réponse des cellules granulosales à produire plus d'oestradiol et un gain de récepteurs à la LH (fig. 39).

L'apparition tardive de récepteurs à la LH dans les cellules granulosales des follicules s'effectue dans des follicules d'environ 3 mm chez la brebis et la liaison de la LH augmente régulièrement avec le diamètre du follicule. Chez la brebis, il n'y a plus d'évolution du nombre de récepteurs à la FSH en fonction de la taille du follicule. En revanche, la réponse à la FSH mesurée par la production d'AMPc s'intensifie fortement avec la dimension des follicules, ce qui suggère que dans les plus volumineux de ceux-ci des mécanismes post-récepteurs amplifient l'action de la FSH (Thibault et Levasseur, 1991).

A partir de ce moment, les follicules sont nommés actifs, ils sont prêts à ovuler.

Après le pic ovulatoire de LH et juste avant l'ovulation, Peng et ses collaborateurs (1991) ont mis en évidence chez la ratte une brusque diminution du taux des transcripts des récepteurs à la LH, plus particulièrement dans les cellules granulosales mais également dans la thèque. Le mécanisme qui régule ce phénomène est encore inconnu. De mêmes observations ont été réalisées chez la caille (Kikuchi et Ishii, 1992). Diverses conséquences peuvent succéder à ce phénomène, telles que l'affaiblissement de la sensibilité des follicules à la LH, la diminution de la production de $E_2-17\beta$ et sans doute la perturbation de l'ovulation.

Les récepteurs à la LH vont apparaître en grandes quantités à la surface du corps jaune lors de sa formation et atteindre un niveau maximum durant cette phase lutéale. La lutéinisation du follicule est également associée à une perte des récepteurs à la FSH (Mc Neilly *et al.*, 1980; Bramley *et al.*, 1986; Peng *et al.*, 1991).

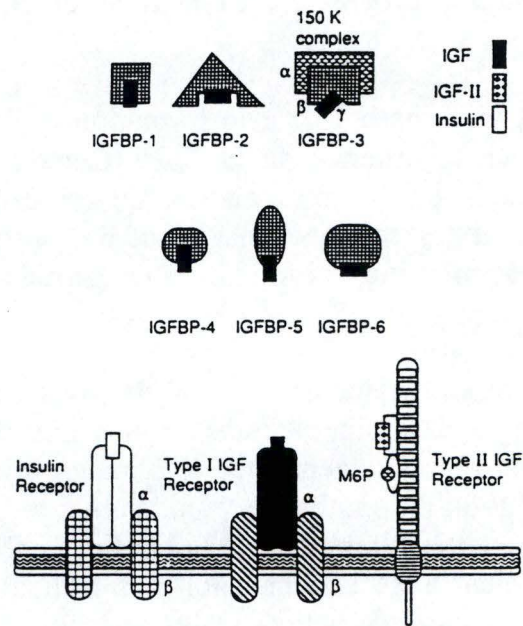


Figure 40: Comparaison des systèmes IGFs et de celui de l'insuline (Giudice, 1992).

Enfin, le degré d'atrésie d'un follicule peut être déterminé par la quantité de récepteurs dont il jouit. En effet, cette dernière s'amenuise avec la dégénérescence du follicule (Carson *et al.* , 1979; Mc Natty *et al.* , 1985).

III.3. Les récepteurs des IGFs.

Deux types de récepteurs des IGFs ont été mis en évidence: le récepteur de l'IGF-I ou récepteur de type I, et le récepteur de l'IGF-II ou récepteur de type II (fig. 40 et tableau 1).

III.3.1. Le récepteur de type I.

Le récepteur de type I est un hétérotétramère dont le poids moléculaire se situe entre 300 et 350 KDa et possédant une structure similaire à celle du récepteur de l'insuline. Il consiste en deux sous-unités α extracellulaires de 130 KDa environ, et deux sous-unités β transmembranaires de 95 KDa environ possédant une activité tyrosine kinase. Ces sous-unités sont associées entre elles par des ponts disulfures (Sara et Hall, 1990).

La séquence des acides aminés du domaine kinase des récepteurs de l'IGF-I et de l'insuline sont identiques à 85% (Rutanen et Pekonen, 1990).

Les mécanismes de transduction du signal par le récepteur de type I sont encore mal connus. L'autophosphorylation de la sous-unité β du récepteur, l'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (Yamamoto *et al.* , 1992), ou encore l'activation de sérine kinases en sont certainement des étapes clefs (Giudice, 1992).

Dans de nombreux tissus, le récepteur de type I présente une affinité deux à trois fois inférieure pour l'IGF-II par rapport à l'IGF-I ($K_d = 10^{-9}$ M environ). En ce qui concerne l'insuline, son affinité est très faible, de 10^{-7} M environ (Steele-Perkins *et al.* , 1988 ; cités par Czech, 1989).

III.3.2. Le récepteur de type II.

Le récepteur de type II est structurellement différent du récepteur de type I. Contrairement à celui-ci, il ne se lie pas à l'insuline et est caractérisé par une très faible affinité pour l'IGF-I (Rutanen et Pekonen, 1990). Il lie l'IGF-II avec une affinité de l'ordre de 10^{-10} M.

Il s'agit d'un polypeptide transmembranaire monomérique dont le poids moléculaire se situe aux environs de 250 KDa. Nonante-trois pour-cents de la protéine représentent un domaine extracellulaire, contenant 15 séquences répétées de résidus cystéine et de régions hydrophobes (Sara et Hall, 1990). Le récepteur de type II est aussi appelé récepteur IGF-II/M6P en raison de son analogie au récepteur Mannose-6-Phosphate (Monget *et al.* , 1989).

	Insulin	Type I	Type II
Affinity	Insulin > IGF-II > IGF-I	IGF-I > IGF-II > insulin	IGF-II \gg IGF-I
Affinity for insulin	High	Low	None
Subunits	2 α and 2 β	2 α and 2 β	Monomer
Molecular weight	α 130,000 β 90,000	α 130, 000 β 90,000	250,000
Tyrosine kinase activity	Yes	Yes	No
Manose-6-phosphate receptor	No	No	Yes

Tableau 1: Les récepteurs de type I et de type II et leurs caractéristiques (Giudice, 1992).

Le récepteur de l'IGF-II ne bénéficie d'aucune activité kinase intrinsèque. Par contre, ce récepteur est lié à une protéine Gi-2 α membranaire. Celle-ci agit certainement comme messenger secondaire lors de la transduction du signal.

III.3.3. Rôles des récepteurs dans la médiation cellulaire.

Les effets produits par l'intermédiaire du récepteur de type I expliquent la totalité des propriétés biologiques de l'IGF-I et une grande majorité de celles de l'IGF-II (Adashi *et al.* , 1989; Teissier *et al.* , 1994).

Le récepteur de type I ainsi que le récepteur de l'insuline interviennent lors de la médiation transmembranaire rapide du transport nutritionnel, lors de l'activation enzymatique et dans la synthèse protéique (Adashi *et al.* , 1985).

La majorité des actions de " type insulinique" de l'IGF-II se font via le récepteur de l'IGF-I ou par le récepteur de l'insuline, le récepteur de type II paraissant incompetent dans ce domaine (Adashi *et al.* , 1985).

Le rôle du récepteur IGF-II/M6P dans la médiation de l'action de l'IGF-II reste un sujet de controverses. Certains travaux semblent montrer que l'IGF-II, par l'intermédiaire du récepteur IGF-II/M6P, stimule la production d'inositol triphosphate par les membranes des cellules rénales canines (Rogers et Hammerman, 1989), provoque l'ouverture d'un canal calcium par l'activation de la protéine Gi-2 α dans des cellules BALB/C 3T3, et peut-être encore dans d'autres cellules (Nishimoto *et al.* , 1987).

Dans l'ovaire, le rôle des récepteurs de type II reste à déterminer. Par contre, l'action des IGF-I et IGF-II, partiellement responsable de la croissance, de la différenciation et de la sélection folliculaires, s'exerce presque totalement par l'intermédiaire des récepteurs de type I des cellules de la granulosa (Davoren *et al.* , 1986; Adashi *et al.* , 1989 et 1991). Par ailleurs, ces récepteurs stimulés par leur ligand, interviendraient également dans la médiation de différentes fonctions du corps jaune et favoriseraient son maintien (Talavera et Menon, 1991).

III.3.4. Régulation et répartition des récepteurs des IGFs dans l'ovaire.

Les récepteurs des IGFs et de l'insuline ont été identifiés dans les cellules de la granulosa de la truie et de la ratte (Davoren *et al.* , 1986), plus récemment dans le corps jaune (Obasiolu *et al.* , 1992) et les ovocytes des ovaires de la femme (Zhou et Bondy, 1993) et dans tous les compartiments de l'ovaire de la brebis (Monget *et al.* , 1989).

Dans l'ovaire, les IGFs-I se fixent préférentiellement au niveau des récepteurs situés dans les cellules de la granulosa (Davoren *et al.* , 1986), contrairement aux IGFs-II, dont la spécificité de fixation est surtout importante au niveau des cellules interstitielles thécales (Hernandez *et al.* , 1990). Ceci n'est pas dû à une augmentation de l'affinité du site de fixation mais à une supériorité

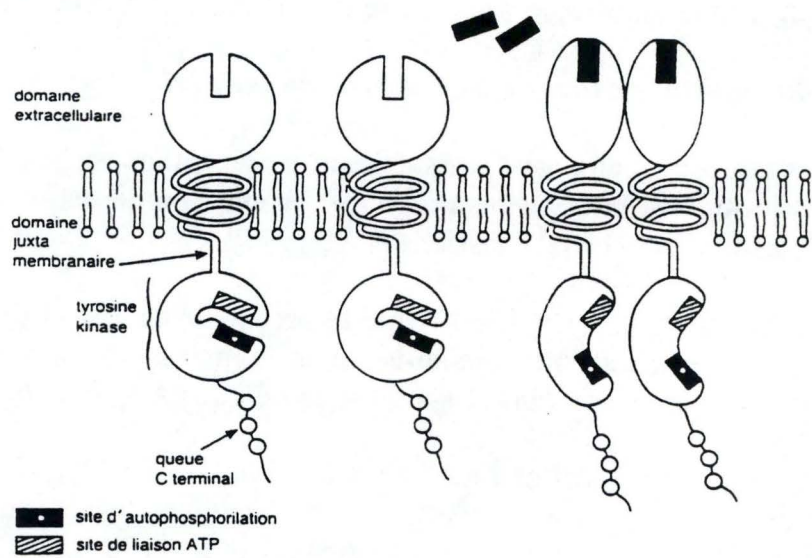


Figure 41: Représentation du récepteur de l'EGF (Thibault et Levasseur, 1991).

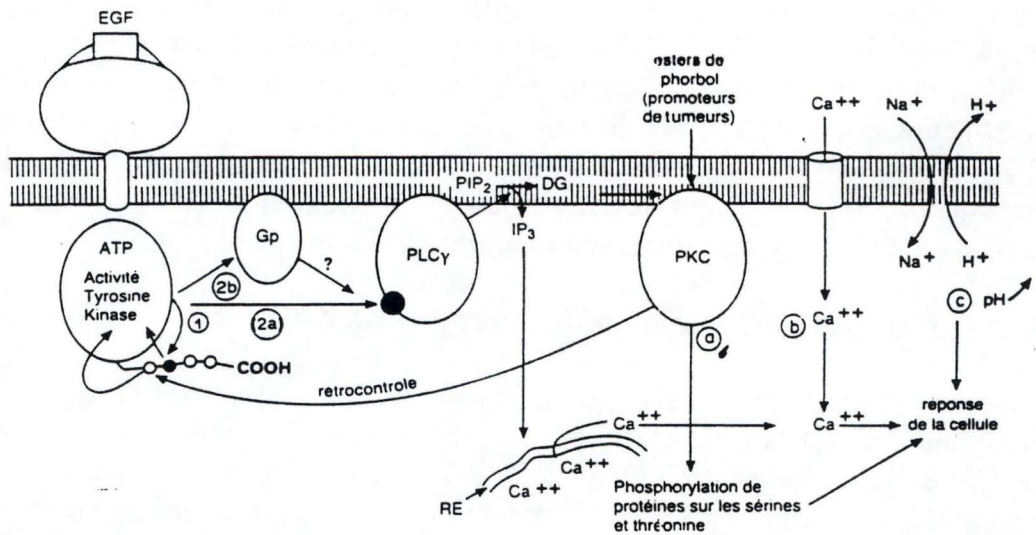


Figure 42: Mode d'action de l'EGF (Thibault et Levasseur, 1991).

de la capacité de fixation des récepteurs de ces cellules (Monget *et al.* , 1989). Celle-ci est gonadotropines dépendante et s'intensifie avec une augmentation de la concentration en FSH et/ou en LH (Adashi *et al.* , 1988). Par contre, une activation des récepteurs de la GnRH (Gonadotropin-Release Hormone) par des agonistes de cette hormone, résulte en une diminution de la fixation des IGFs-I à leurs récepteurs situés dans les cellules de la granulosa (Adashi *et al.* , 1991) .

La taille et le stade d'atrésie du follicule influencent ou sont influencés par la régulation des récepteurs des IGFs. En effet, les follicules petits ou atrétiques subissent une réduction du nombre de leurs récepteurs à l'IGF-I (Monget *et al.* , 1993) et un accroissement de celui des récepteurs de type II dans les cellules de la granulosa ainsi que dans la thèque (Teissier *et al.* , 1994). De même, une malnutrition peut devenir la cause d'un aminuement de la quantité de récepteurs de type I et de type II (Bahannon *et al.* , 1983; cités par Sara et Hall, 1990).

III.4. Le récepteur de l'EGF.

Le récepteur de l'EGF est une glycoprotéine monomérique de 170-180 KDa, dont le domaine extracellulaire est le site de liaison du facteur de croissance et le domaine intramembranaire est pourvu d'une activité tyrosine kinase. L'autophosphorylation des résidus tyrosines du récepteur est suivie d'une activation de la phospholipase C. Celle-ci induit la formation de diacylglycérol et d'inositol triphosphate, messagers secondaires de la transduction du signal au sein d'une cellule (fig. 41 et 42).

Ce récepteur est localisé dans une variété de cellules et principalement dans les hépatocytes (Johansson *et al.* , 1988 et 1989).

Matériel et méthodes.

I. Conditions expérimentales.

Le premier objectif de l'expérience était de mettre au point la technique d'autoradiographie dans le but de mettre en évidence les récepteurs folliculaires à la LH, la FSH et à l'IGF-I. Pour ce faire, nous avons utilisé des follicules d'ovaires provenant de l'abattoir d'Anderlecht. De même, la détermination de l'emplacement préférentiel de ces récepteurs dans les cellules de la granulosa ou de la thèque a été effectuée sur des follicules d'ovaires récoltés à l'abattoir. Les follicules contenus dans ces ovaires sont donc issus de brebis se trouvant dans des stades physiologiques variables.

Les follicules ayant servis à étudier l'influence de la taille ou celle d'un traitement *in vitro* par des facteurs de croissance ont été prélevés sur des ovaires de brebis de race Suffolk provenant du Centre de Recherches Ovines de Faulx-les-Tombes (CRO), après leur abattage.

La mise au point de la technique de localisation des récepteurs hormonaux, la mise en culture des follicules, ainsi que les dosages hormonaux ont été effectués au Laboratoire de Physiologie Animale des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix à Namur.

Les techniques histologiques ont été effectuées au Laboratoire d'Histologie des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix à Namur.

II. Plans expérimentaux.

II.1. Transport des follicules.

Les ovaires récoltés à l'abattoir ou au Centre de Faulx-les-Tombes sont directement placés puis transportés dans du milieu de culture conservé à une température environnant les 4°C, température qui selon Renard (1991) est la plus adéquate.

II.2. Mise au point de la technique d'autoradiographie et étude comparative de la localisation des récepteurs dans les cellules de la thèque et de la granulosa.

Au laboratoire, les ovaires, toujours placés dans du milieu de culture, sont disséqués. Les follicules obtenus sont préparés en coupes histologiques dans le but, d'une part de réaliser une étude de leur état physiologique et d'autre part d'en observer la composition en récepteurs par autoradiographie. Les follicules présentant des signes d'atrésie ne subissent pas l'autoradiographie.

II.3. Recherche de l'influence de la taille des follicules sur la quantité de récepteurs.

Les follicules utilisés dans cette expérience ont été prélevés au seizième jour du cycle et en période de reproduction sur les ovaires de deux brebis.

Pour ce faire, les brebis subissent une synchronisation de leur cycle sexuel par l'application d'une éponge intravaginale. Ce système permet de réaliser des comparaisons entre les différents follicules prélevés à un même stade physiologique.

La synchronisation des cycles oestriques des brebis se fait via la pose au fond du vagin d'une éponge de polyuréthane par l'intermédiaire d'un tube en PVC. L'éponge est imbibée de 40 mg de fluorogestone acétate (FGA), qui est un dérivé de la progestérone. Ce progestagène, commercialisé par Intervet, AKZO, sous le nom de Chronogest[®], favorise le maintien d'un niveau de progestérone suffisant pour empêcher toute ovulation. Le retrait de l'éponge se pratique en tirant un drain attaché à l'éponge. Il se réalise le matin du 14^{ème} jour après la pose et est suivi, après environ 54 heures, de l'ovulation.

Après abattage des brebis et prélèvement des ovaires, les follicules sont disséqués et placés en culture *in vitro* suivant deux classes: la première regroupe les gros follicules, dont le diamètre est supérieur à 4 mm, la deuxième est formée par les follicules moyens, dont le diamètre se situe entre 2 et 4 mm. Une troisième classe de follicules aurait pu s'ajouter aux deux catégories précédentes, celle des petits follicules de diamètre inférieur à 2 mm, mais nous n'en avons pas récupéré.

La mise en culture des différents follicules rend possible l'étude de leurs sécrétions stéroïdiennes en récupérant toutes les demi-heures le milieu pérfusé. Les dosages ultérieurs des stéroïdes permettront de déterminer et d'écarter les follicules atrophiques. Pour cela, nous nous référons aux travaux de Bellin *et al.* (1984; cités par Renard, 1991), qui proposent que le rapport existant entre les concentrations d'oestradiol et celles de la progestérone ou de l'androstènedione dans le fluide folliculaire reflète l'état physiologique du follicule. Lorsque ce rapport est inférieur à 1 pour un follicule, celui-ci est jugé atrophique. La corrélation significative retrouvée entre la production *in vitro* d'oestradiol par un follicule et la concentration en oestradiol dans le fluide folliculaire ou dans la veine ovarienne nous permet d'utiliser cette méthode (Webb *et al.* , 1989).

Une confirmation supplémentaire de ces résultats est assurée par une coloration H.E.S. des coupes folliculaires. En effet, dès que la culture *in vitro* arrive à terme, les follicules sont préparés histologiquement en vue d'une étude de leur état physiologique; les follicules sains sont ensuite utilisés pour la technique d'autoradiographie.

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) ²	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.

Figure 43: Composition du milieu de culture.

II.4. Influence des facteurs de croissance sur la quantité des récepteurs hormonaux.

Les 12 brebis utilisées pour étudier l'impact de la taille des follicules sur la quantité de récepteurs folliculaires, subissent également une synchronisation de leur cycle par pose des éponges de FGA durant 14 jours, toujours en saison de reproduction. Les ovaires sont prélevés après l'abattage au jour 16 suivant la synchronisation. Seuls les follicules dont le diamètre est supérieur à 4 mm sont mis en culture. Les follicules récupérés sont divisés en trois lots:

- le premier lot comprend les follicules témoins. Ils ne sont stimulés que par les gonadotropines durant la culture *in vitro*.
- les deux autres sont constitués des follicules qui sont en plus stimulés par l'IGF-I ou par l'EGF avant leur traitement aux gonadotropines.

L'état physiologique des follicules est déterminé ultérieurement par les dosages des sécrétions de stéroïdes et par une coloration H.E.S. réalisée sur coupes après préparation histologique des follicules. Les follicules atrétiques sont écartés tandis que ceux en phase de croissance sont utilisés afin de mettre en évidence les récepteurs aux gonadotropines et à l'IGF-I par autoradiographie.

III. Techniques.

III.1. Préparation du milieu de culture.

Le milieu de culture est nécessaire pour le transport des ovaires dès l'ovariectomie des brebis de l'abattoir ou de Faulx-les-Tombes jusqu'au laboratoire. Il est également employé lors de la mise en culture *in vitro* des follicules provenant des brebis du CRO.

Le milieu de culture utilisé est le milieu M 199, commercialisé sous forme de poudre par la firme GIBCO (N°079-00011P). Sa composition est décrite à la figure 43.

La dissolution de ce milieu se réalise à l'aide d'eau déminéralisée et désionisée. Du NaHCO₃ (MERCK 6329, PM 84,01) est ensuite ajouté, à raison de 2,2 g par litre de milieu. Un ml par litre de milieu d'une solution de gentamycine (Gibco, N° 043-05750D) est également additionné à raison de 50 ng/ml.

Le pH obtenu est souvent trop acide et doit être porté à 7,2 par ajout de NaOH 1N.

Le milieu est filtré par une pompe péristaltique simple "Millipore Catalog. N°XX80 202 30", équipée de filtres "millipores type HA" de 0,45 et 0,22 µm préalablement stérilisés par autoclave ainsi que les récipients de récupération du milieu filtré.

Après la filtration, le pH du milieu se situe à environ 7,4, ce qui correspond au pH physiologique.

III.2. Dissection des follicules.

Les follicules ovariens sont disséqués à l'aide de ciseaux de microdissection permettant l'élimination d'une bonne partie du stroma ovarien. Cette opération est délicate de par sa susceptibilité de blesser le follicule et dans ce cas elle provoquerait l'apparition de plages de pycnoses localisées au niveau de la granulosa, ce qui pourrait interférer avec nos interprétations histologiques.

III.3. Techniques histologiques.

Les procédés histologiques décrits ci-dessous sont utilisés en vue d'une part, de réaliser une coloration H.E.S. révélant l'état physiologique des follicules, et d'autre part, d'appliquer la technique d'autoradiographie sur des sections de follicules. Notons également que dans le but de nous situer dans le tissu et de réaliser des comparaisons entre la granulosa et la thèque folliculaires après une autoradiographie des coupes, nous pouvons comparer ces sections à celles appartenant à un même follicule et colorées à l'H.E.S.

III.3.1. Cryofixation.

Les follicules, après leur dissection ou leur mise en culture, sont immédiatement déposés dans une nacelle de papier aluminium remplie d'un cryoprotecteur (Tissue- Tek, O.C.T. compound, Miles Laboratoires, Elkart, USA) et congelés par le dépôt de ces nacelles dans du méthanol dont la température avoisinant les -80°C est maintenue à l'aide de carboglace. Les follicules congelés sont par après conservés à -80°C .

III.3.2. Mise sur lame.

La réalisation de coupes à partir du tissu congelé se fait par l'intermédiaire d'un cryostat (Microm HM 500-OM). Celui-ci est constitué d'une chambre froide dans laquelle le microtome, le rasoir et la pièce à couper sont maintenus à une température de -15 à -25°C . Les follicules cryofixés sont sectionnés au cryostat à des épaisseurs de $7\ \mu\text{m}$. Les coupes sont stockées à -80°C jusqu'à utilisation.

III.3.3. Coloration des coupes à l'H.E.S. (Hémalun Erythrosine Safran).

Les différentes étapes de cette coloration sont les suivantes:

- bain de 10 minutes dans l'hémalun.
- rinçage rapide à l'eau de source.
- différenciation dans de l'alcool-HCl pendant 20 secondes.

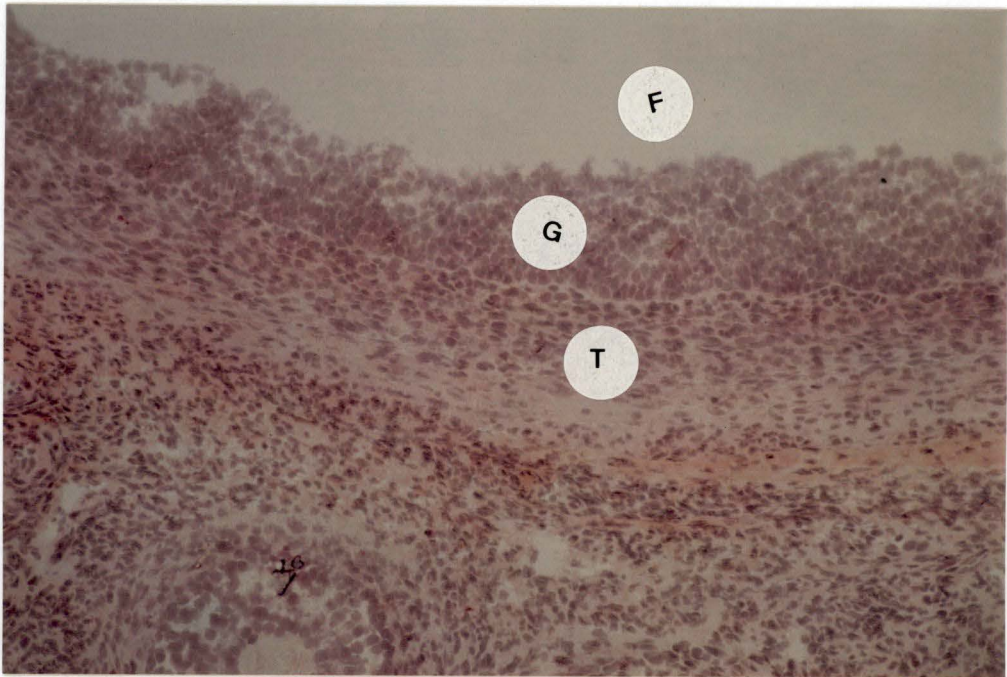


Photo 1 (G = 10×): Follicule en bonne santé; sa granulosa ne présente aucun noyau pycnotique. G: granulosa; T: thèque; F: fluide folliculaire.

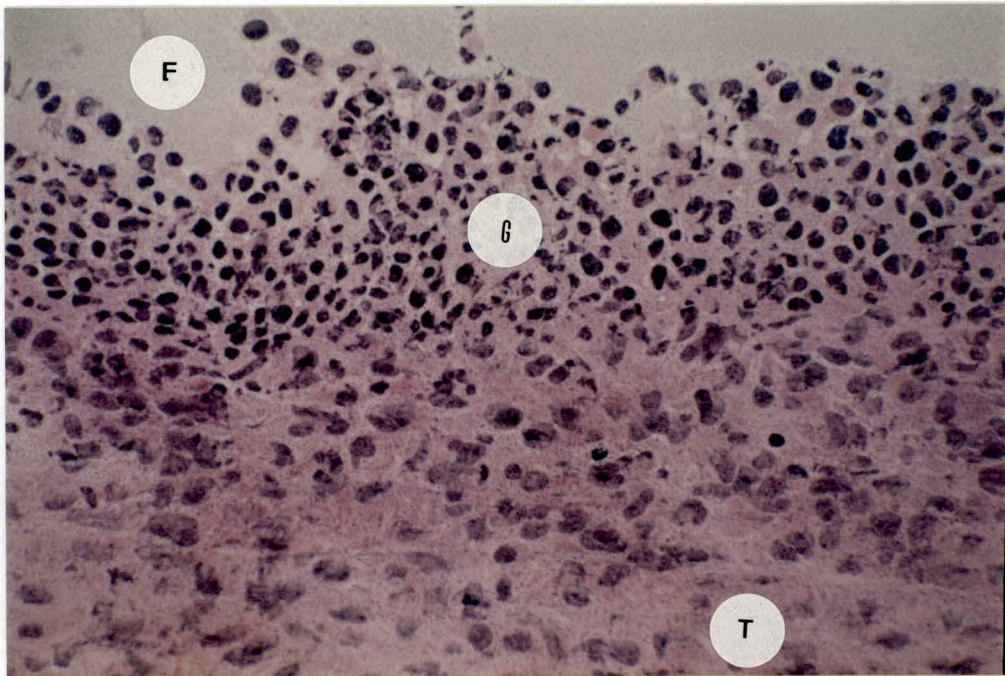


Photo 2 (G = 25×): Granulosa d'un follicule en atresie precoce. G: granulosa; T: thèque; F: fluide folliculaire.

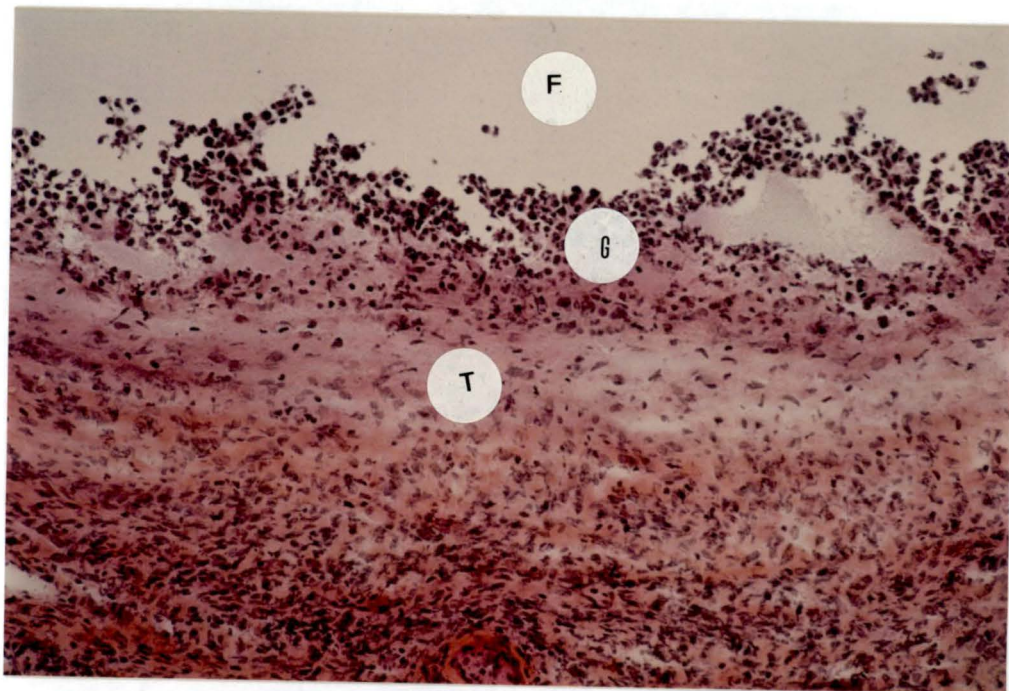


Photo 3 (G = 10×): Follicule présentant des symptômes d'une atresie avancée. G: granulosa; T: thèque; F: fluide folliculaire.

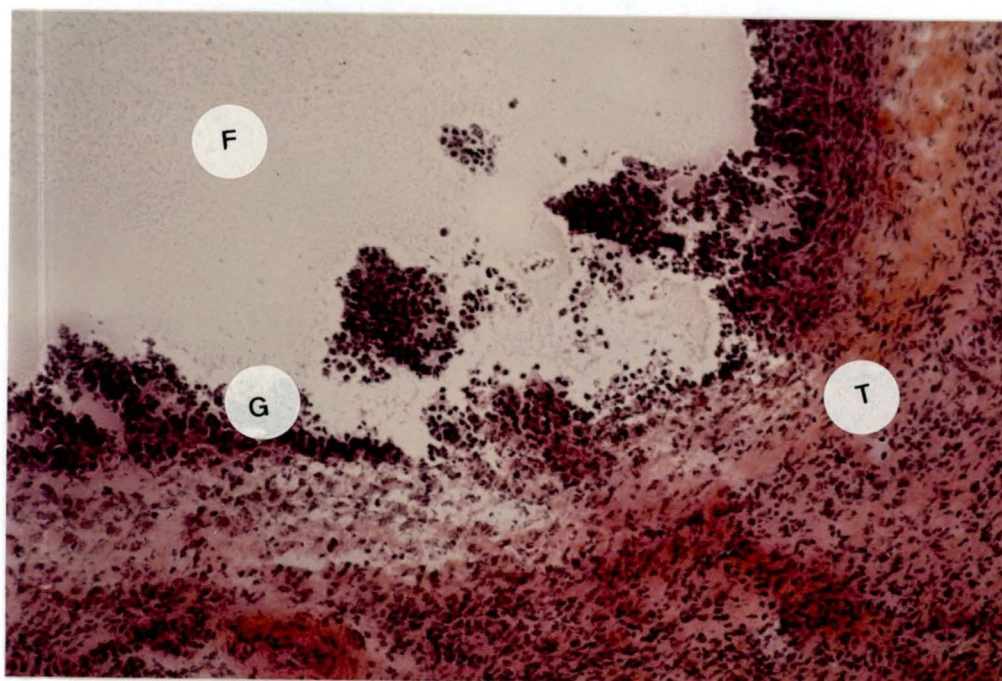


Photo 4 (G = 10×): Follicule en atresie avancée. Destruction de la structure granulosa. G: granulosa; T: thèque; F: fluide folliculaire.

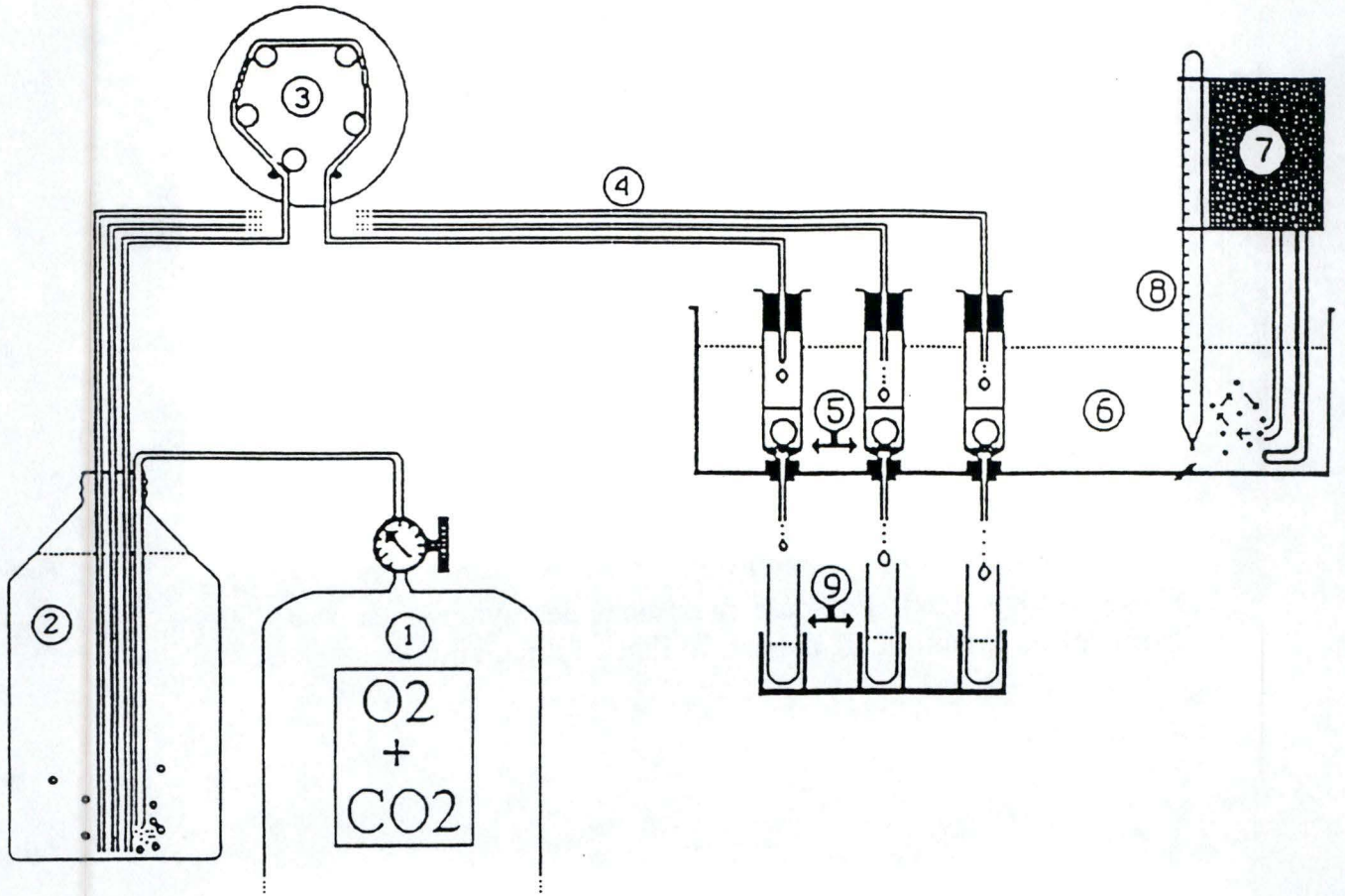


Figure 44: Système de perfusion. 1: mélange gazeux O₂ (95%) et CO₂ (5%); 2: milieu de culture; 3: pompe péristaltique; 4: tuyau en tygon; 5: chambres de culture; 6: bain thermostaté; 7: pompe thermostatique; 8: thermomètre; 9: tubes pour la récolte des fractions.

- arrêt de la différenciation en plongeant les coupes 10 minutes dans l'eau courante.
- bain de 6 minutes dans l'érythrosine.
- rinçage rapide à l'eau de source.
- différenciation dans de l'alcool éthylique 70% pendant 20 secondes.
- bain de 8 minutes dans du safran.
- déshydratation rapide dans trois bains consécutifs d'alcool.
- trois bains de toluol.
- montage de la lamelle couvre-objet au D.P.X.

Cette coloration permet d'évaluer le niveau d'atrésie du follicule analysé. L'état des follicules a été précédemment classifié par Webb *et al.* en 1989 d'après le nombre de noyaux pycnotiques retrouvés dans la granulosa de la section observée du follicule. Cette classification se base sur plusieurs stades (photos 1,2,3 et 4):

- stade 1: le follicule concerné est en bonne santé, sa granulosa présente moins de 5 noyaux pycnotiques dans la section observée.
- stade 2: atrésie précoce I; on retrouve 5 à 10 noyaux pycnotiques.
- stade 3: atrésie précoce II; le nombre de noyaux pycnotiques retrouvés est de 10 à 20.
- stades 4 et 5: atrésies avancées I et II; ces stades sont caractérisés par un déchirement et une perte progressive de la structure granulosale.
- stade 6: atrésie tardive; il y a disparition des cellules de la granulosa.

III.4. Technique de culture *in vitro* de follicules.

III.4.1. Description (fig. 44).

La technique de culture *in vitro* utilisée a été mise au point récemment au laboratoire (Demuynck, 1990) sur base de plusieurs articles (Bahr *et al.* , 1980; Peluso et Hirschel, 1987; Terqui *et al.* , 1988). L'élément majeur sur lequel repose cette technique est la périfusion. Cette mise en culture des follicules présente divers avantages tels que le maintien de la survie et des sécrétions du follicule et la possibilité d'exercer des stimulations hormonales sur les follicules observés.

Les follicules sont placés à l'intérieur de seringues de 2 ml à usage unique dont le fond est recouvert d'un papier filtre. Ces "chambres de culture" sont fermées hermétiquement par des bouchons de caoutchouc traversés par une aiguille permettant le passage du milieu de culture déjà décrit précédemment. Celui-ci est en effet constamment renouvelé. Il est périfusé, via des tubes en tygon, sous l'action d'une pompe péristaltique (Watson-Marlow 501) dont le débit

est réglé à 0,1 ml/min par chambre et est oxygéné par barbotage d'un mélange gazeux composé d'O₂ (95%) et de CO₂ (5%) dont le rôle principal est le maintien du pH à 7,4.

Les chambres trempent également dans un bain thermostaté dont la température est de 37°C et dont le support est percé de trous traversés par les aiguilles des seringues. C'est par cette galerie que s'écoule le milieu périfusé. Ce dernier est recueilli à intervalles de temps fixes et les fractions prélevées sont ensuite stockées à -20°C afin d'effectuer ultérieurement les dosages des stéroïdes émis dans le milieu tout au long de la culture.

III.4.2. Culture des follicules classés d'après leur taille.

La culture suit le schéma classique utilisé au laboratoire (Renard, 1991), à savoir: la durée de la culture est de 6h00 et le milieu périfusé est recueilli toutes les demi-heures jusqu'à la fin de la culture. A 1h30 de la culture, les follicules sont soumis pendant 20 minutes à un milieu périfusé contenant 10 ng/ml de oLH et à 2h00 de la culture, ils sont stimulés pendant 1h00 par de la oFSH (15 ng/ml).

La LH (NIA DDK-oLH-I-3) et la FSH (NIA MDD-oFSH-RP1) nous ont été gracieusement fournies par le NIH (National Institute of Hormonology, USA).

Les dosages ultérieurs des stéroïdes permettent de déterminer et d'écartier les follicules en phase de dégénérescence et également d'étudier le potentiel stéroïdogénique des différents follicules.

III.4.3. Cultures avec traitements de follicules.

Les cultures folliculaires demandant des traitements durent également 6h00 et les opérations se déroulent comme suit:

- 0h00: mise en culture des follicules.
- 0h30→6h00: le milieu périfusé est recueilli par fractions toutes les 30 minutes afin d'étudier le potentiel stéroïdogénique des follicules.
- 1h00: stimulation d'une partie des follicules par les facteurs de croissance IGF-I ou EGF.
- 1h30→1h50: stimulation de tous les follicules par la oLH (10 ng/ml).
- 2H00→3h00: stimulation de tous les follicules par la oFSH (à raison de 15 ng/ml).

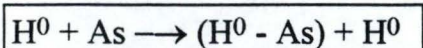
III.5. Dosages hormonaux.

III.5.1. Principe du dosage radioimmunologique.

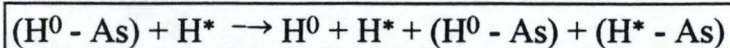
Les concentrations en stéroïdes contenus dans le milieu périfusé récolté lors de la culture *in vitro* des follicules sont déterminées par R.I.A. (Radio-Immuno-Assay) selon les techniques décrites par Bister en 1980.

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

L'hormone froide (H^0) peut se lier avec l'antisérum spécifique et la réaction peut s'écrire de la manière suivante:



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



La quantité de H^* fixée aux anticorps sera d'autant plus faible que celle de l'hormone froide contenue dans l'échantillon sera élevée, et inversement. En séparant l' H^* liée à l'antisérum de l' H^* libre, on peut, en mesurant la radioactivité d'une de ces deux fractions, calculer la quantité d' H^0 . Une courbe standard, dont les quantités d'hormone froide sont connues, est réalisée dans des conditions semblables, afin de tenir lieu de référence.

III.5.2. Calcul des résultats.

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

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

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

A_0 : radioactivité maximale (en cpm) de la fraction liée.

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

C_m : concentration en hormone marquée.

C_f : concentration en hormone froide.

Cette équation, qui permet de transformer en concentrations hormonales (ng/ml) les données obtenues en cpm, est ajustée aux données expérimentales de la courbe standard.

III.5.3. Dosage de la progestérone.

III.5.3.1. Les réactifs.

Les **standards** utilisés ont été préparés par pesée précise et dilution de progestérone cristalline (MERK 24 614). La courbe standard est réalisée à partir de 100 µl des solutions contenant 0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 et 10 ng de P₄/ml.

L'**antisérum** (As) nous est fourni par le Laboratoire d'Endocrinologie de Marloie. Il a été obtenu par immunisation de lapins contre de la P₄-3CMO-BSA. L'As lyophilisé est dissout dans 10 ml d'eau distillée.

La **progestérone tritiée** [1,2,6,7-H³] P₄ (AMERSHAM TRK-413) bénéficie d'une activité spécifique de 80 Ci/mmol (2,96 TBq/mmol) et une concentration initiale de 1 mCi/ml de toluène. L'hormone marquée est portée à une dilution finale de 7000 cpm/100 µl de tampon Wide. Celui-ci est préparé au départ d'une solution stock 0,6 M, elle-même combinée à partir de 7,5 g de KH₂PO₄ (PM = 136,09) et de 77,9 g de NaH₂PO₄ (PM = 141,96) par litre d'eau distillée.

III.5.3.2. Manipulation et protocole.

III.5.3.2.1. Extraction.

- la progestérone contenue dans 200 µl de milieu périfusé est extraite par 2 ml d'hexane P.A. (Merk 4367) avec un coefficient d'extraction compris entre 90 et 100%. Le tout est agité au vortex pendant 2 minutes.
- nous laissons reposer le temps que la séparation des deux phases soit bien marquée.
- prélever 1ml de surnageant.
- évaporer à sec dans une étuve sous vide à 40°C ou pendant une nuit à température ambiante.

III.5.3.2.2. Fixation Ag-Ac.

Addition de :

- 50 µl de tampon Wide.
- 100 µl de P₄ tritiée.
- 50 µl d'AsP₄.

Agitation au vortex et incubation pendant une nuit.

III.5.3.2.3. Séparation.

- addition de 500 ml d'une solution de Dextran-Charcoal (650 mg de Charcoal Norit A Serva et 65 mg de Dextran T70 Pharmacia, dans 300 ml de tampon Wide) afin d'absorber la phase libre et donc de la séparer de la phase liée à l'antisérum.
- agitation et incubation pendant 10 minutes à 3°C.
- centrifugation pendant 10 minutes à 0°C et à 2800 rpm.

III.5.3.2.4. Comptage.

- prélèvement de 250 µl de surnageant (phase liée) et addition de 2,5 ml d'Ecosint A (liquide scintillant produit par la firme National Diagnostics).
- comptage dans un compteur β à scintillation (Beckman LS 1801) durant 4 minutes maximum.

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

III.5.4. Dosage de l'oestradiol.

III.5.4.1. Les réactifs.

Les **standards** utilisés sont préparés par pesée précise et dilution d'oestradiol cristallin (MERK 8964). La courbe standard est réalisée à partir de 100 µl de solutions contenant 0,0; 2,5; 5,0; 10; 20; 50; 100; 200; 500; 1000; 2000; 3000 pg/ml de E₂.

L'**oestradiol tritié** [2,4,6,7-H³] E₂ (AMERSHAM TRK-322) possède une activité spécifique de 101,3 Ci/mmole, soit de 3,75 TBq/mmol, et sa concentration radioactive est de 1 mCi/ml de toluène. L'hormone marquée est portée à une dilution finale de 7000 cpm/100 µl dans du tampon Wide.

L'**antisérum** (As) est également fourni par le Laboratoire d'Hormonologie de Marloie. Il a été obtenu par immunisation de lapins contre l'E_{17β} couplé à l'albumine sérique bovine (E_{17β} 6CMO-BSA). L'As lyophilisé est dissout dans 10 ml d'eau distillée.

III.5.4.2. Manipulation et protocole.

III.5.4.2.1. Extraction.

- l'oestradiol contenu dans 200 µl de milieu périfusé est extrait par ajout de 2 ml de diéthyl ether P.A. (MERCK 921).
- agitation de la solution pendant 2 minutes au vortex.
- congélation à -20°C pendant 2h; la phase aqueuse doit être gelée.

- récupération de la phase liquide.
- évaporation à sec dans une étuve sous vide à 40°C ou à température ambiante pendant une nuit.

III.5.4.2.2. Fixation Ag-Ac.

Addition de:

- 50 µl de tampon Wide.
- 100 µl de E₂ tritiée.
- 50 µl d'As E₂.

Agitation au vortex et incubation pendant une nuit à 4°C.

III.5.4.2.3. Séparation des phases libre et liée.

- addition de 500 µl de Dextran-Charcoal à 3°C.
- agitation et incubation pendant 10 minutes à 3°C.
- centrifugation pendant 10 minutes à 0°C et à 2800 cpm.

III.5.4.2.4. Comptage.

- prélèvement de 250 µl de surnageant (phase liée) et addition de 2,5 ml d'Ecosint A.
- agitation et comptage au compteur β à scintillation.

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

III.5.5. Dosage de l'androstènedione.

III.5.5.1. Les réactifs.

Les **standards** utilisés ont été préparés par pesée précise et dilution d'androstènedione cristalline (MERK 24603). La courbe standard est réalisée à partir de 100 µl des solutions contenant 0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 et 10 ng de Δ₄/ml.

L'**antisérum** (As) a été fourni par le Laboratoire d'Hormonologie de Marloie à partir d'une immunisation contre de la 4 androsten-6β-al-3, 17-dione HMS BSA pratiquée sur des lapins. L'As lyophilisé est dissous dans 10 ml d'eau distillée.

L'**androstènedione tritiée** [1,2,6,7-H³] Δ₄ (AMERSHAM TRK-454) a une activité spécifique de 80 Ci/mmol (2,96 TBq/mmol) et une concentration

initiale de 1 mCi/ml de toluène. L'hormone marquée est portée à une dilution finale de 7000 cpm/100 μ l dans du tampon Wide.

III.5.5.2. Manipulation et protocole.

Le dosage de l'androstènedione est réalisé de la même façon que celui de la progestérone.

Mise au point de la technique
d'autoradiographie.

I. Description de la technique.

Comme il a été signalé précédemment, l'objectif de cette technique est de mettre en évidence des récepteurs aux hormones hypophysaires LH et FSH et au facteur de croissance IGF-I dans la thèque et la granulosa folliculaires.

Dans le but d'appliquer cette technique au laboratoire, nous nous sommes inspirés de divers travaux (Oxberry et Greenwald, 1982; Monget *et al.*, 1989; Wang et Greenwald, 1993). Quelques modifications ont cependant été apportées en vue d'optimiser cette technique en fonction de nos moyens et ainsi de l'adapter à nos conditions. Ces modifications concernent la concentration en hormone choisie pour l'incubation du tissu, le temps d'incubation optimal en fonction du système de comptage des récepteurs et la température d'incubation.

I.1. Marquage des hormones.

Pour l'obtention de la LH et de la FSH marquées, les oFSH et oLH sont diluées à raison de 4 µg/40 µl. L'iode ¹²⁵ est tamponnée avec du tampon Wide. On y ajoute ensuite les 40 µg de l'hormone froide diluée. La réaction d'iodonisation est initiée par l'adjonction de 20 µl d'une solution de chloramine T (40 mg/10 ml d'eau distillée; MERK, N°2426) et arrêtée par ajout de 25 µl d'une solution de disulfide de sodium (24 mg/10 ml d'eau distillée; MERK, N°6528). Le contenu de la fiole est alors prélevé et chromatographié sur une colonne de séphadex G50 médium (tamponné au phosphate 0,06 M, pH 7,55 auquel on ajoute 9 g/l de NaCl), haute de 15 cm et dont le diamètre mesure 1 cm, préalablement saturée par 2 ml d'une solution de tampon Wide contenant 2% d'albumine bovine (BSA; SIGMA, fraction V). Des fractions de 1 ml sont recueillies et leur radioactivité est mesurée. Les tubes qui manifestent un pic de radioactivité correspondant à l'activité de l'hormone marquée sont récupérés et l'hormone est diluée à concentration voulue.

L'IGF-I humain marqué a été obtenu par la firme AMERSCHAM, code IM172.

I.2. Préfixation.

Les tranches de follicules, préparées selon la technique décrite précédemment, sont retirées du frigo à -80°C et sont fixées 10 minutes dans une solution à pH 7,4 de tampon PBS (0,9 g de NaCl, MERK N°106404, 2 ml de tampon phosphate dans 100 ml d'eau distillée) contenant 2% de paraformaldéhyde (SIGMA, code P-6148) et 15 ml d'acide picrique saturé (SIGMA, N° 925-40) pour 100 ml du tampon.

Les coupes sont ensuite lavées dans trois bains consécutifs de PBS à pH 7,8 à raison de 10 minutes chacun, séchées à l'air libre et stockées pendant une nuit à 20°C.

I.3. Incubation.

Le temps et la température choisis pour l'incubation du tissu seront débattus dans le chapitre suivant.

L'incubation des tissus sur coupe se réalise en présence de l'hormone marquée.

Deux tranches de tissu sont distribuées par lame. La première est mise en contact avec 100 μ l de la solution dissoute de oLH ou de oFSH marquée ou avec 50 μ l de la solution d'IGF-I iodonné. La seconde est mise en présence d'une quantité identique d'hormone radioactive accompagnée d'un excès de la même hormone froide. Il se crée dès lors une réaction de compétition entre l'hormone froide et l'hormone radioactive pour le même récepteur. Cette étape permet de différencier les liaisons spécifiques des liaisons non spécifiques. En effet, la première série de tissus permet de dénombrer la quantité totale de liaisons obtenues par l'hormone marquée, elle inclut la fixation spécifique de l'hormone aux sites d'affinité élevée ainsi que l'adhérence non spécifique à d'autres molécules de la surface cellulaire, tandis que les secondes coupes permettent d'évaluer la contribution de la fixation non spécifique à la fixation globale en mesurant la participation de l'hormone radioactive en présence d'un excès d'hormone froide en vue de saturer pratiquement tous les sites d'affinité élevée. La liaison spécifique est donc égale à la soustraction de la liaison non spécifique de la liaison totale.

Pour étudier la liaison non spécifique, l'excès d'hormone froide est de à peu près 500 fois la quantité de l'hormone marquée pour la LH et la FSH. Pour l'IGF-I, nous ajoutons dans la deuxième série de coupes une concentration d'insuline environ 1000 fois supérieure à la quantité du facteur de croissance radioactif. L'insuline, rappelons-le possède une certaine affinité vis-à-vis du récepteur de type I.

L'incubation se fait en atmosphère humide.

I.4. Postfixation.

Les coupes sont rincées à deux reprises avec 3 ml de PBS (pH 7,8) et plongées directement dans deux bains de PBS (pH 7,8) à 4°C pendant respectivement 3 et 2 minutes. Elles sont ensuite fixées, toujours à 4°C, dans une solution glutaraldéhyde 3% (solution aqueuse 50%: SIGMA, code G-6403) -PBS (pH 7,8) et lavées à quatre reprises dans le tampon pendant 5 minutes et à 4°C.

I.5. Emulsion.

L'autoradiographie est obtenue en déposant une couche d'émulsion radiosensible sur la coupe de tissu contenant le matériel radioactif. Après exposition et développement, l'examen au microscope optique décèle les grains d'argent réduits en regard des structures émettrices. En effet, les émulsions sont composées de pseudo-cristaux de sels d'argent (souvent du bromure d'argent) et de la gélatine et leur principe repose sur le fait que les radiations provoquent une libération d'électrons (e^-) qui attirent les ions d'argent. L'émulsion est très sensible aux rayons lumineux, c'est pourquoi les manipulations suivantes se réalisent en chambre noire.

L'émulsion utilisée dans le cadre de ce travail est l'ILFORD K5 (code 4645). Elle est constituée de cristaux dont le diamètre est de 0,20 μm .

L'émulsion est chauffée et fondue dans un bain marie à 40°C et diluée à l'aide d'eau distillée dans des proportions 1:1. Nous y trempions les lames verticalement, de façon à obtenir une couche uniforme. Les lames sont ensuite installées (toujours verticalement) sur un portoir pendant 2h à température ambiante et enfin déposées dans une boîte opaque contenant un petit sac de gel de silice afin d'absorber le surplus d'humidité. Les boîtes sont conservées durant au moins 15 jours à 4°C avant les opérations suivantes.

I.6. Révélation, fixation et coloration.

La révélation, la fixation et la coloration se font selon les procédés classiques histologiques.

I.6.1. Révélation.

Cent millilitres de cette solution sont constitués de 0,45 g d'amidol (ICN Biomedicals, N° 206467), 1,8 g de thiosulfite de sodium (SIGMA, code S-6778) et 0,8 ml d'une solution de KBr 10% (VEL, N° 1585). A la suite de la préparation du révélateur, celui-ci sera filtré et récupéré dans un flacon opaque.

Les coupes trempent durant 4 minutes dans la solution révélatrice.

I.6.2. Fixation.

Les tissus marqués sont lavés dans deux bains d'eau distillée et plongés pendant 12 minutes dans un bain contenant le fixateur (30 g de thiosulfate de sodium: VEL, N° 1788; pour 100 ml de la solution) puis de nouveau lavés durant 30 minutes dans de l'eau distillée.

I.6.3. Coloration.

La coloration choisie est une coloration hématoxyline Ehrlich. Pour sa composition et sa préparation:

- placer dans un flacon à verre foncé:
 - 4 g hématoxyline (VEL, N°3455).
 - 200 ml d'alcool 95°.
 - 200 ml d'eau distillée.
 - 200 ml de glycérine (VEL, N°1384).
 - 6 g d'aluminium potassium sulfate (P.A. VEL, N°1129).
 - 20 ml acide acétique (P.A. VEL, N°1005).
- laisser reposer pendant 15 jours.
- remuer de temps en temps.
- laisser vieillir.

Ce colorant renforce le contraste provoqué par le marquage sur le tissu. Les étapes de la coloration se poursuivent de la façon suivante:

- un bain dans l'hématoxyline pendant 20 secondes.
- un bain dans de l'eau distillée.
- déshydratation par trois bains d'alcool de 20 secondes chacun à 70°, 95° et à 100°.
- trois bains de toluol.
- montage des lames au D.P.X.

II. Système de comptage des récepteurs.

La quantification est dirigée par un logiciel capable de digitaliser une image définie en la balayant en 2 dimensions. L'ordinateur (SUN) qui pilote ce logiciel est relié à une caméra CCD à haute résolution, elle-même directement posée sur un microscope optique. Ce système est un appareillage au gel 1 et 2 D, firme Millipore, station Bioimage Visage 110.

Le grossissement utilisé au microscope est de 100 fois et celui de la caméra est de 1,25 fois. Nous ne pouvons parler de nombre de récepteurs par cellule car la calibration de la caméra sur le microscope n'est pas encore bien déterminée et fait actuellement l'objet d'un travail. Nous parlerons dès lors de nombre de récepteurs par unité de surface ($G = 100 \times$ multiplié par $1,25 \times$ environ).

A

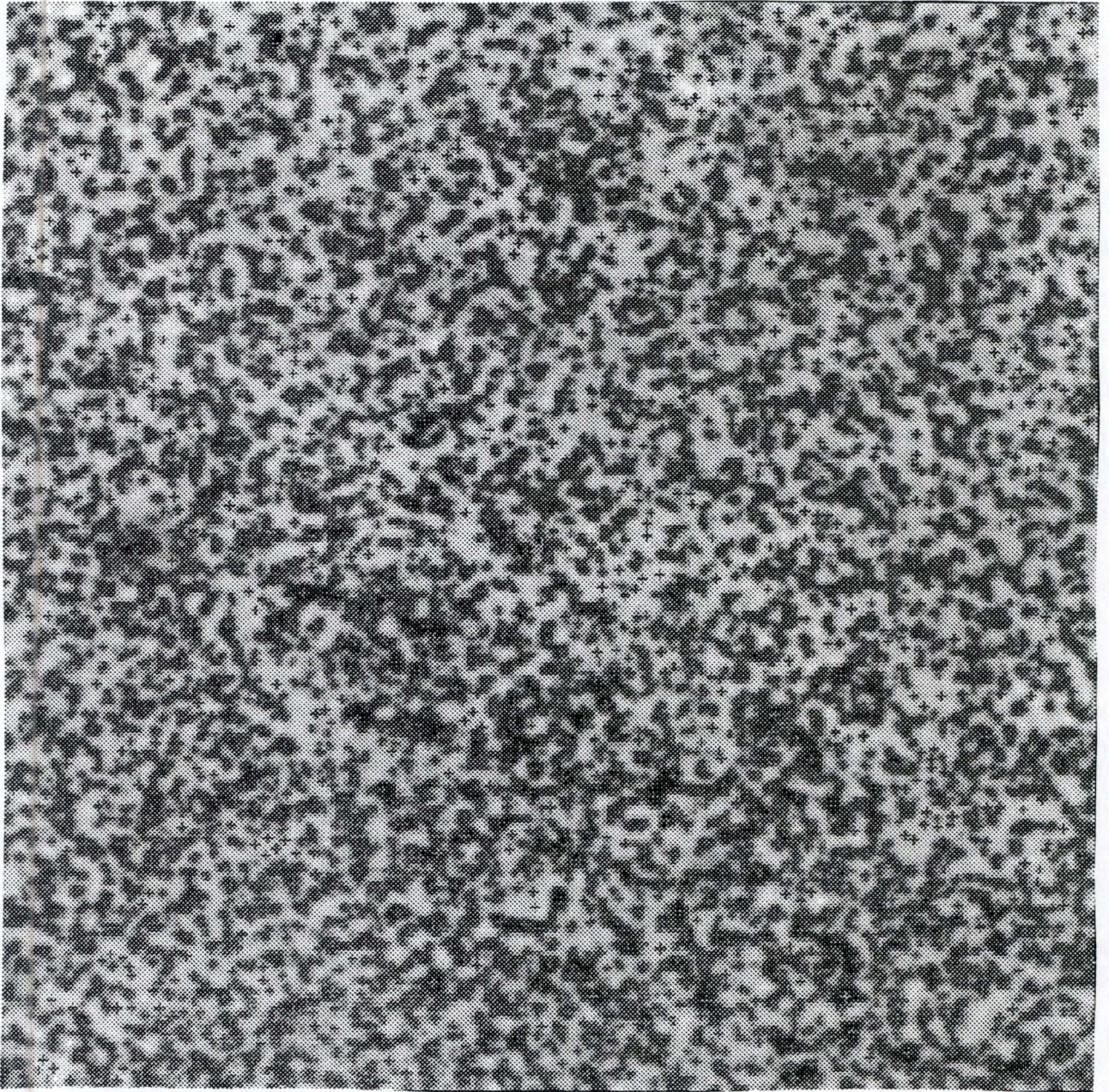
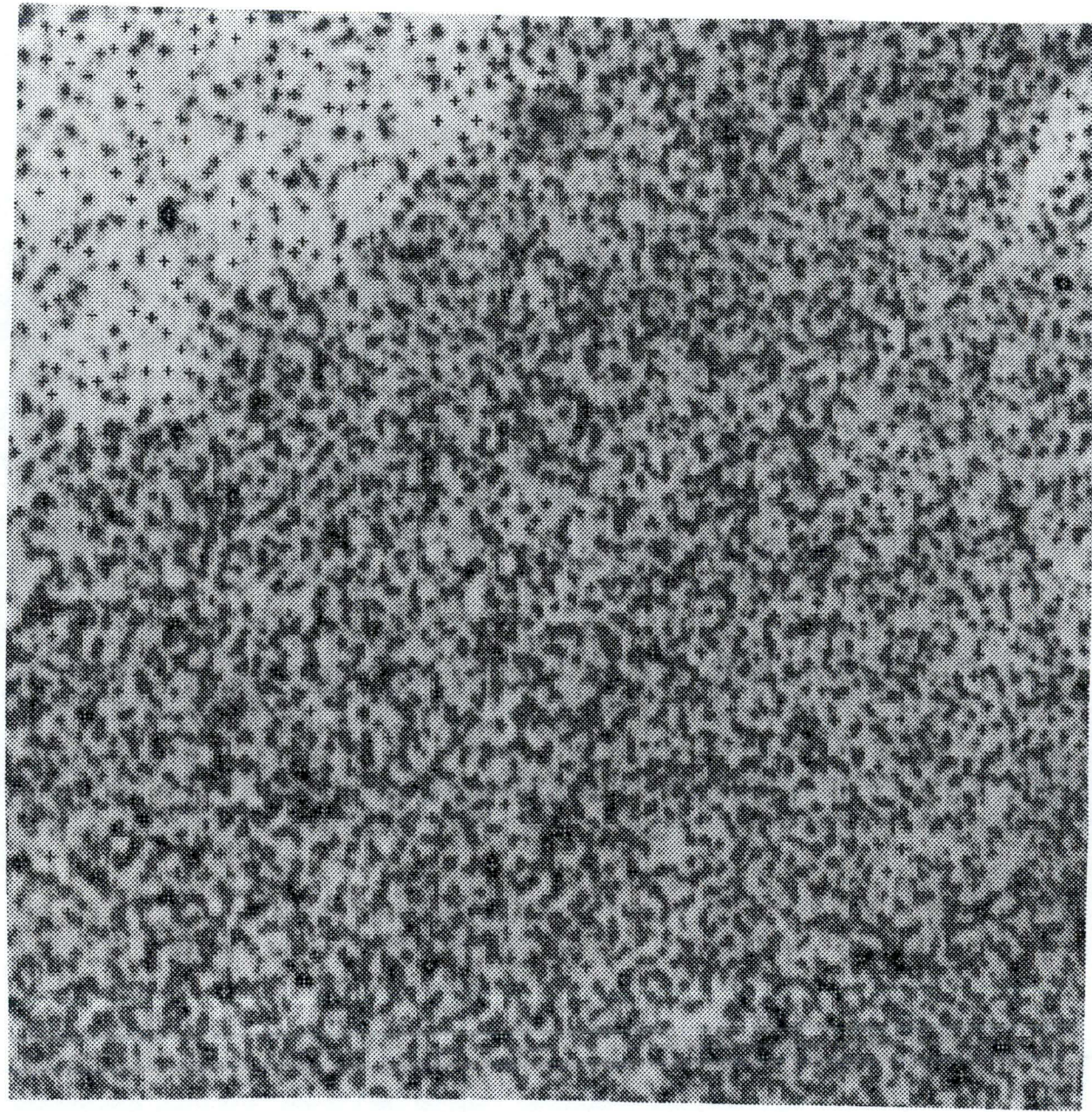


Figure 45 ($G = 100\times$ multiplié par $1,25\times$): Quantification des récepteurs à la LH (liaison totale) situés dans la thèque (A) et dans la granulosa (B) d'un follicule.



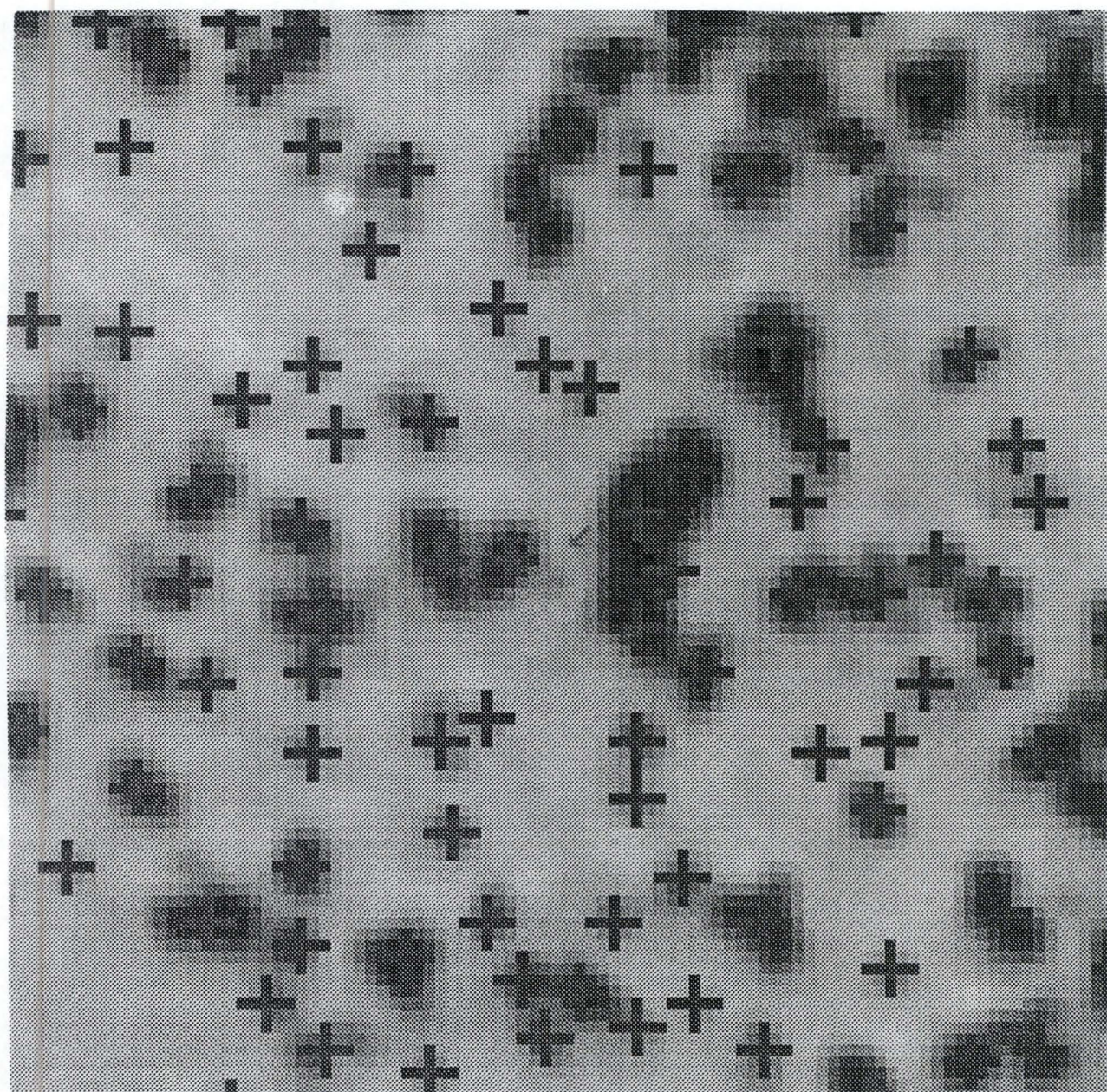
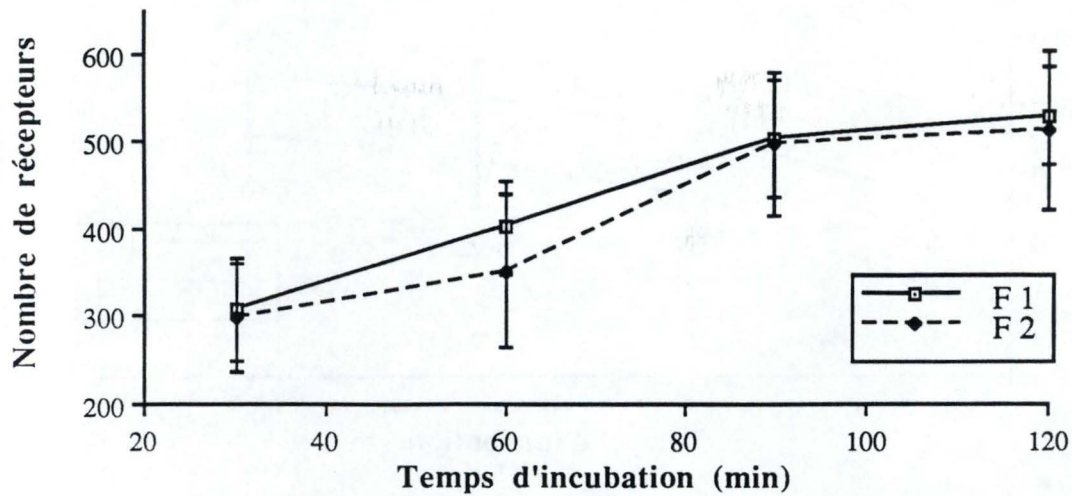
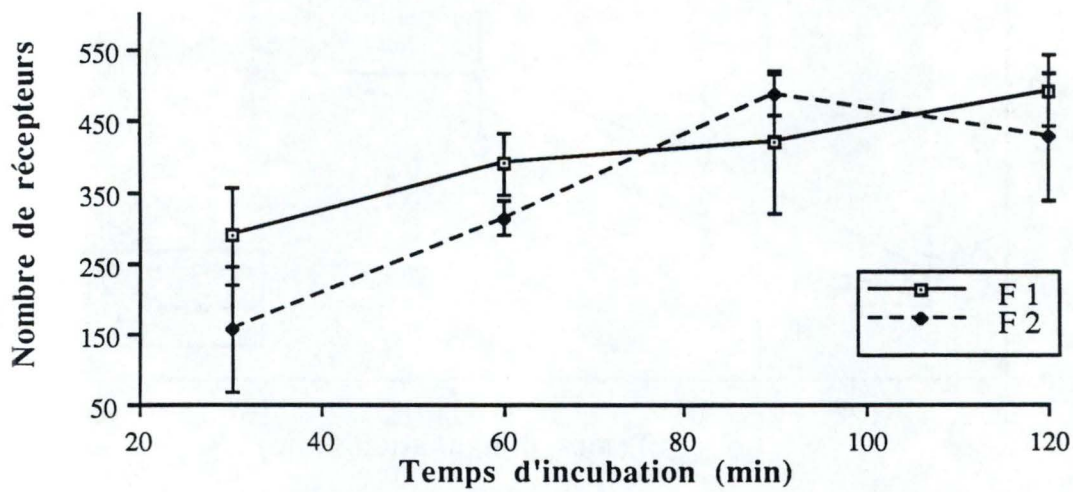


Figure 46: Sélection , agrandissement et vérification du comptage des récepteurs sur une plage de la section observée.

A



B



C

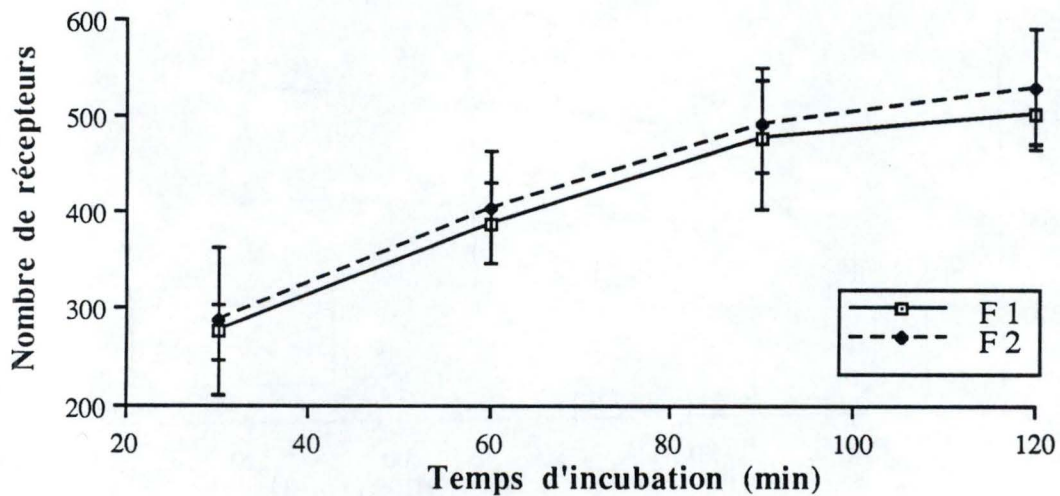
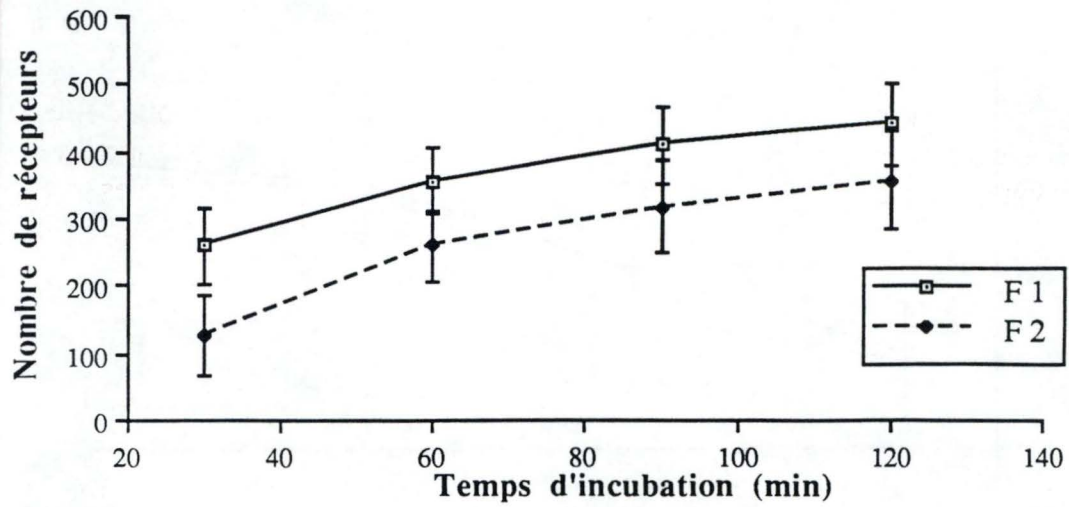
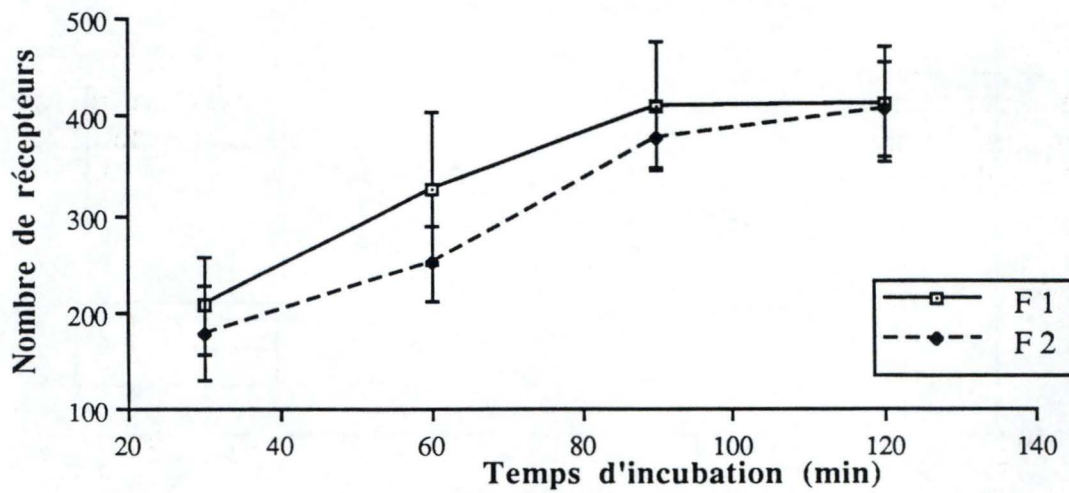


Figure 47: Evolution des récepteurs spécifiques à la LH (A), à la FSH (B) et à l'IGF-I (C) comptés par unité de surface dans la granulosa de 6 follicules en fonction du temps d'incubation. Les premiers follicules (F1) ont incubé avec l'hormone marquée à 4°C tandis que les deuxièmes (F2) ont incubé à température ambiante.

A



B



C

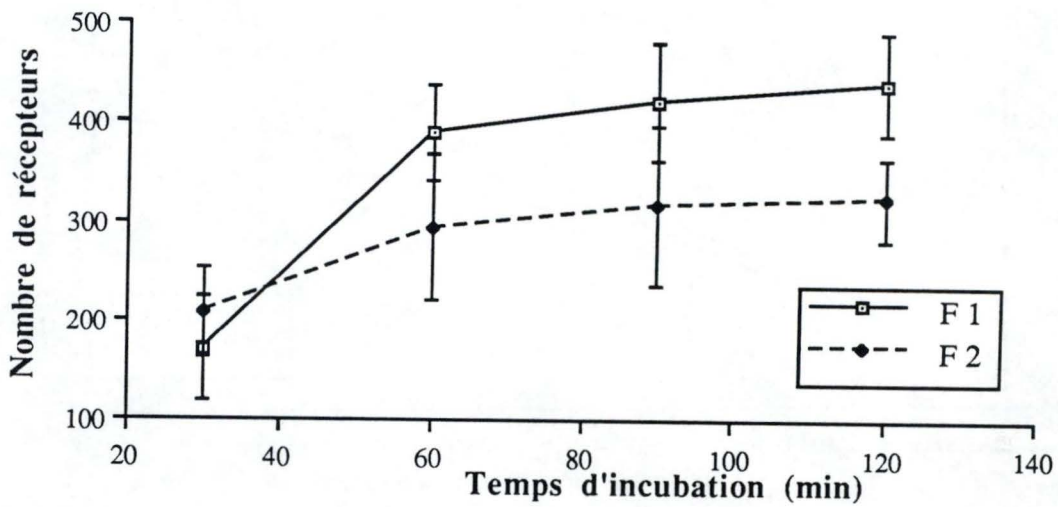


Figure 48: Evolution des récepteurs spécifiques à la LH (A), à la FSH (B) et à l'IGF-I (C), comptés par unité de surface, dans la thèque de 6 follicules en fonction du temps d'incubation. Les premiers follicules (F1) ont incubé avec l'hormone marquée à 4°C tandis que les deuxièmes (F2) ont incubé à température ambiante.

Différents paramètres du système de comptage ont été modifiés et testés afin d'obtenir une quantification exemplaire et éliminer le bruit de fond. Quelques ébauches de ces essais figurent en annexe (fig. 45). Cette quantification peut être effectivement vérifiée sur écran et mieux ajustée s'il le faut grâce à des systèmes d'agrandissement de certaines plages (fig. 46). Sur chaque récepteur compté, l'ordinateur indique une croix.

III. Adaptation de la technique d'autoradiographie au laboratoire.

III.1. Choix du temps d'incubation.

III.1.1. Description.

L'incubation fut testée toutes les demi-heures pendant 6 h et aux trois températures traitées dans le sous-chapitre suivant sur cinq follicules distincts à raison de plusieurs coupes par follicule et par temps d'incubation. Une coloration H.E.S. de chaque follicule nous a permis d'éliminer ceux qui présentaient des signes de dégénérescence. L'hormone marquée est diluée à une concentration de 100000 cpm/100 μ l, ce qui représente une concentration en hormone de l'ordre de 0,1 μ g/ml; cette concentration est fortement supérieure à la concentration hormonale physiologique. La concentration optimale choisie sera débattue ultérieurement pour chaque hormone.

Les résultats obtenus ont été traités pour chaque follicule étudié et à chaque température selon le modèle de l'analyse de la variance à 2 critères de classification. Ceux-ci sont le temps d'incubation (critère fixe) et le nombre de récepteurs spécifiques comptés par unité de surface (critère aléatoire). L'existence de différences significatives entre moyennes a été vérifiée par le test de Scheffé. Le test est significatif à 95%.

La raison pour laquelle nous analysons chaque follicule individuellement est que ces follicules proviennent de l'abattoir et ont été prélevés indépendamment de leur taille, du moment du cycle et par conséquent de leur stade de développement. Le nombre de récepteurs aux hormones compté est dès lors très variable d'un follicule à l'autre. De même, l'analyse se réalise indépendamment dans la granulosa et dans la thèque, ces deux tissus étant totalement différents au niveau de leur composition et de leur rôle.

III.1.2. Résultats et discussion.

Les figures 47 et 48 montrent, à partir de 2 follicules pris au hasard pour chaque hormone, après une incubation à 4°C (F1) ou à 25°C (F2), une augmentation

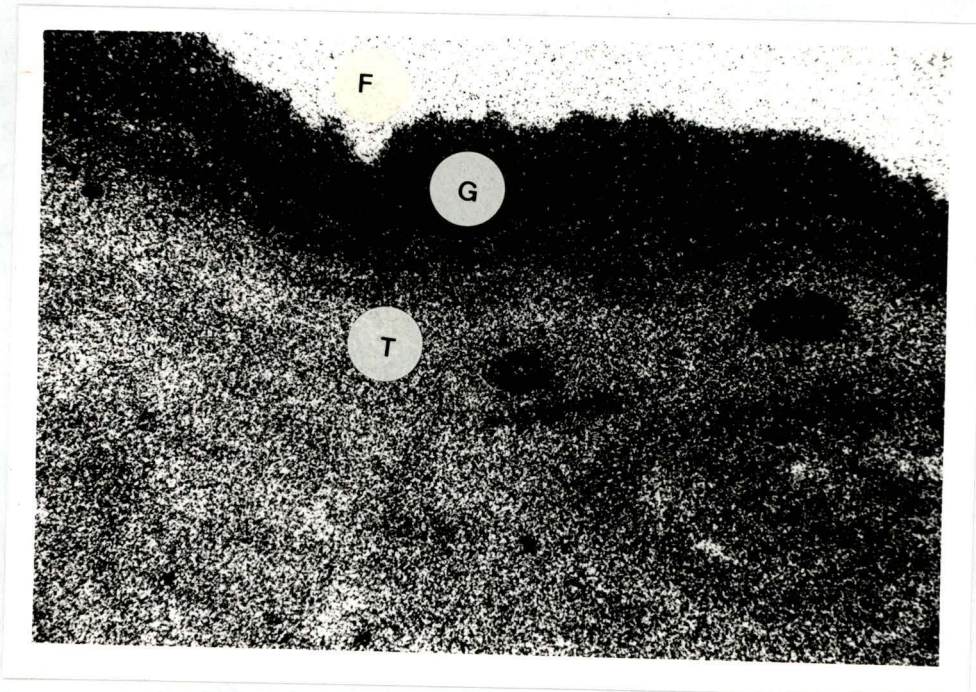


Photo 5 (G = 10×): Mise en évidence de récepteurs (liaison totale) à l'IGF-I par autoradiographie (ARG) après une incubation à 4°C de 5h00 avec le facteur marqué. G: granulosa; T: thèque; F: fluide folliculaire.

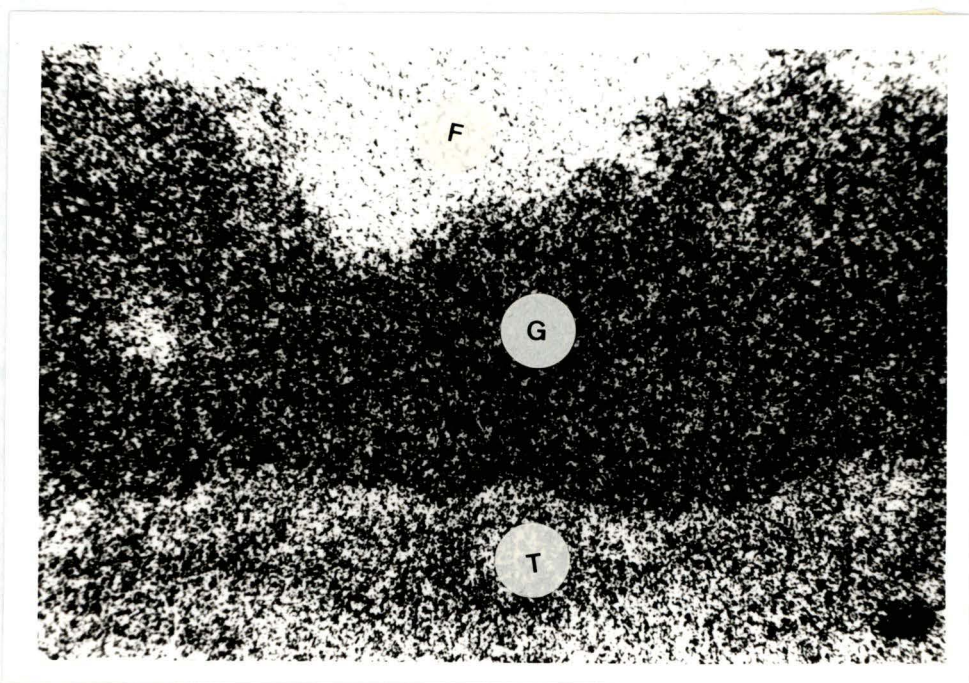


Photo 6 (G = 25×): Mise en évidence de récepteurs (liaison totale) à l'IGF-I par ARG après une incubation à 4°C de 5h00 avec le facteur marqué. G: granulosa; T: thèque; F: fluide folliculaire.

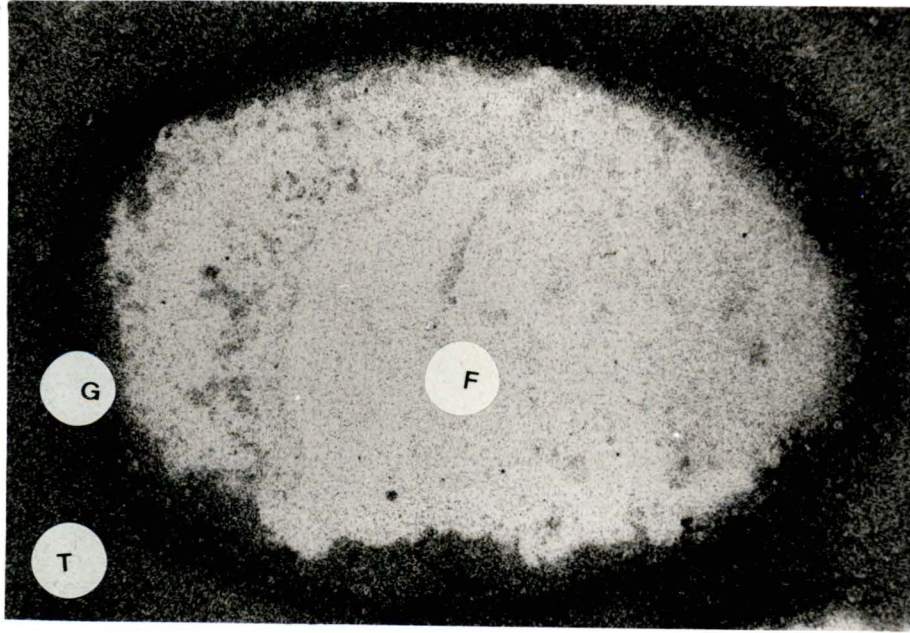


Photo 7 (G = 10×): Mise en évidence de récepteurs (liaison totale) à la FSH par ARG après une incubation à température ambiante de 2h00 avec l'hormone marquée. G: granulosa; T: thèque; F: fluide folliculaire.

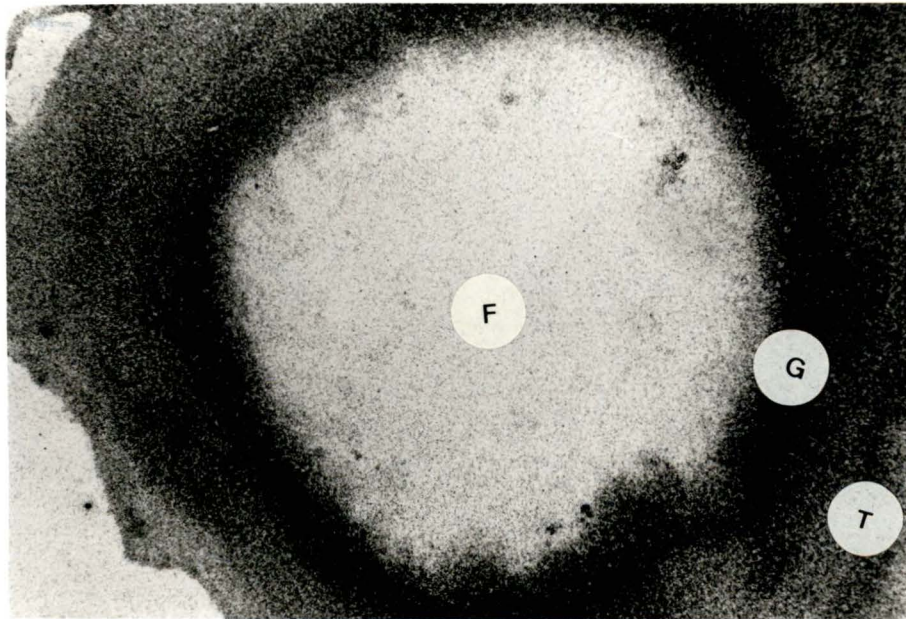


Photo 8 (G = 10×): Mise en évidence de récepteurs (liaison non spécifique) à la FSH par ARG après une incubation à température ambiante de 2h00 avec l'hormone marquée. G: granulosa; T: thèque; F: fluide folliculaire.

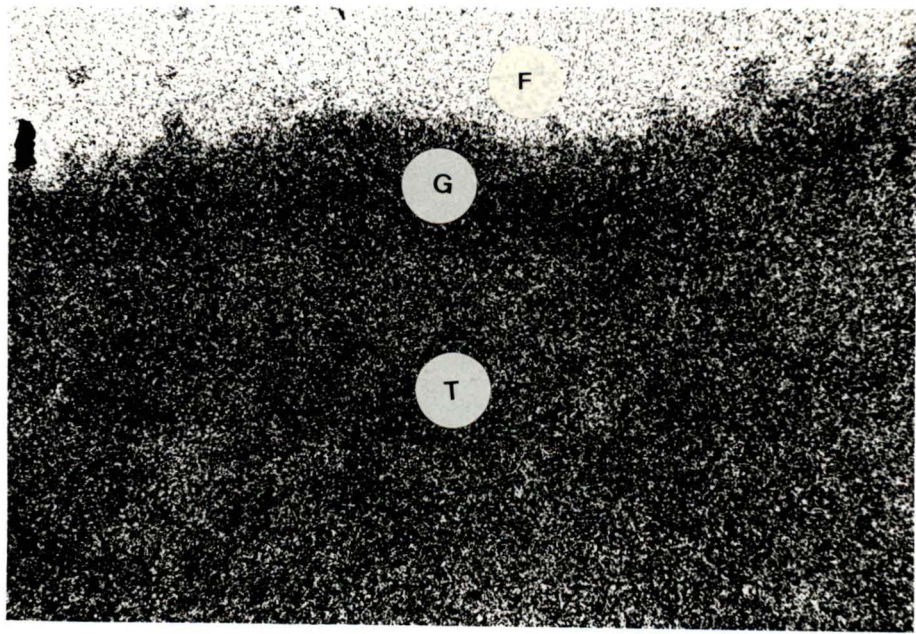


Photo 9 (G = 10×): Mise en évidence de récepteurs (liaison totale) à la LH par ARG après une incubation à 4°C de 4h00 avec l'hormone marquée. G: granulosa; T: thèque; F: fluide folliculaire.

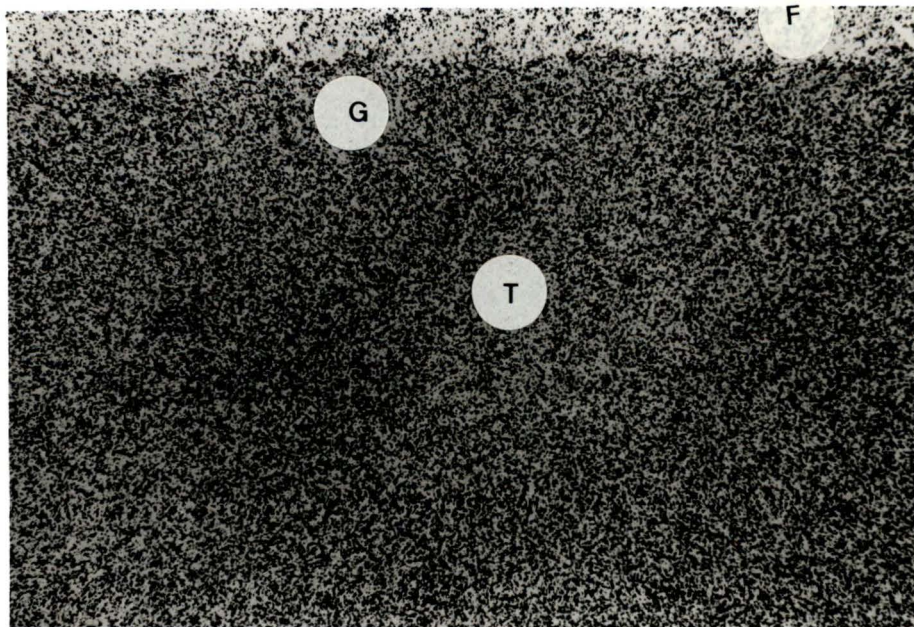


Photo 10 (G = 10×): Mise en évidence de récepteurs (liaison totale) à la LH par ARG après une incubation à 4°C de 30 minutes avec l'hormone marquée. G: granulosa; T: thèque; F: fluide folliculaire.

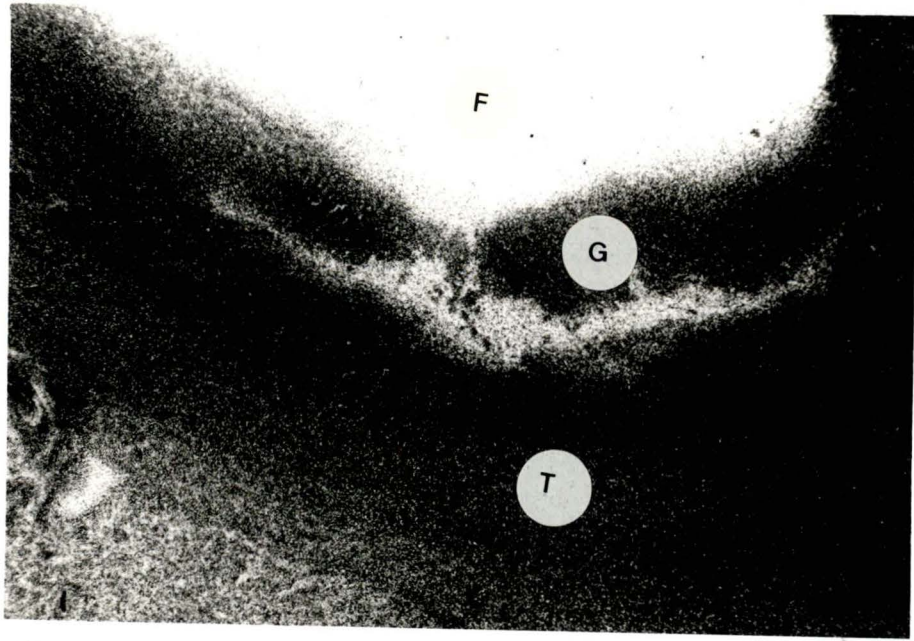


Photo 11 (G = 10×): Mise en évidence de récepteurs à l'IGF-I (liaison totale) par ARG après une incubation à 37°C pendant 5h00. La structure de la granulosa n'est pas conservée. G : granulosa; T: thèque; F: fluide folliculaire.

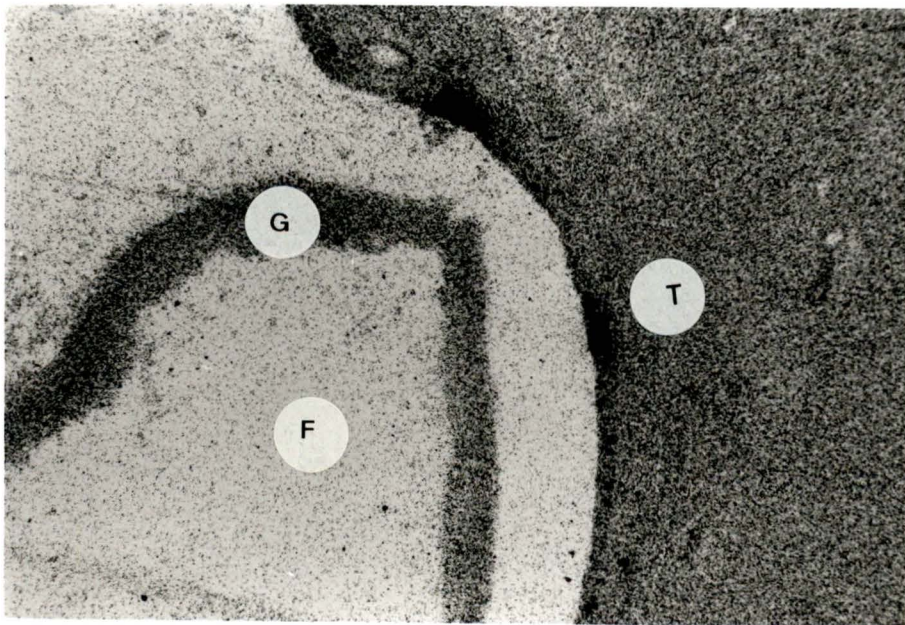


Photo 12 (G = 10×): Mise en évidence de récepteurs à la LH (liaison non spécifique) par ARG après une incubation à 37°C pendant 2h00. La structure de la granulosa n'est pas conservée. G : granulosa; T: thèque; F: fluide folliculaire.

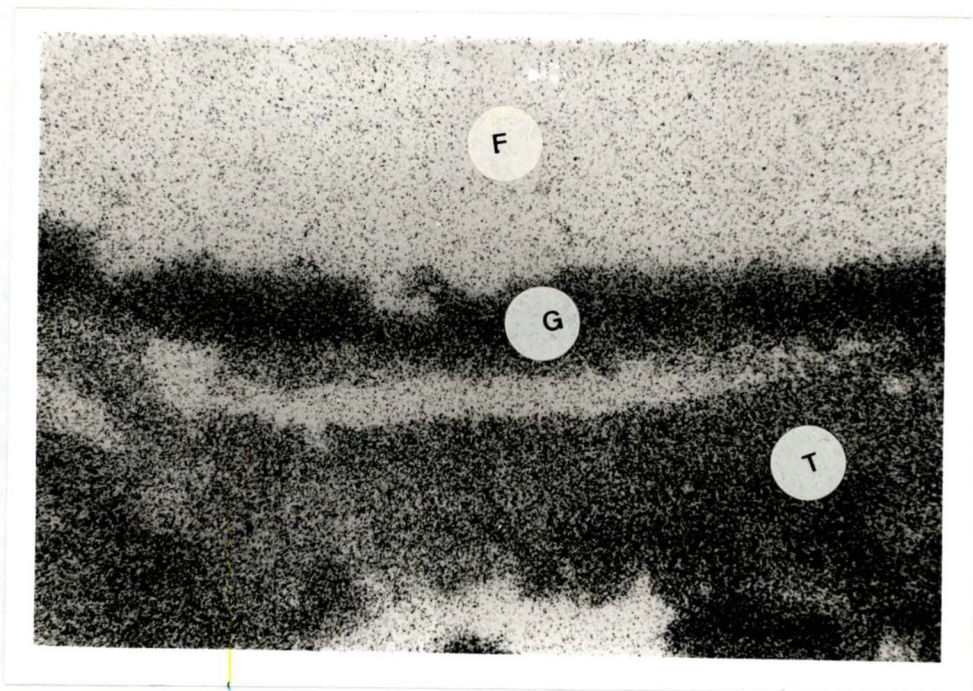


Photo 13 (G = 10×): Mise en évidence de récepteurs à la FSH (liaison totale) par ARG après une incubation à 37°C pendant 90 minutes. La structure de la granulosa n'est pas conservée. G : granulosa; T: thèque; F: fluide folliculaire.

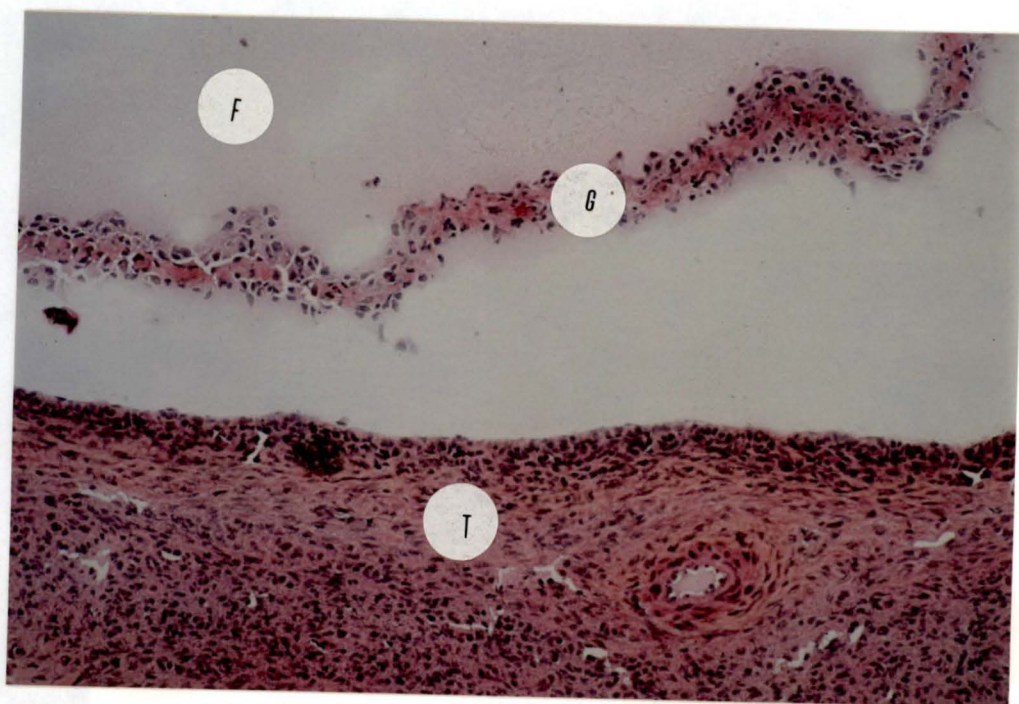


Photo 14 (G = 10×): Mauvaise conservation de la structure granulosale après incubation de la coupe à 37°C pendant 90 minutes avec du tampon. La coupe est ensuite colorée à l'H.E.S. G: granulosa; T: thèque; F: fluide folliculaire

significative du nombre de récepteurs folliculaires spécifiques à chaque hormone et au facteur de croissance IGF-I parallèlement à l'augmentation du temps d'incubation, et cela à chaque température. Le temps d'incubation sera cependant limité à une durée de 90 minutes pour l'étude des trois types de sites de fixation dans le but de respecter l'individualisation du récepteur, nécessaire pour ne pas entraver le comptage. Les photos 5,6,7,8,9 et 10 présentent plusieurs coupes histologiques de follicules ayant subi différents temps d'incubation avec l'hormone marquée. Nous apercevons, pour des temps d'incubation longs, des superpositions des récepteurs pouvant tromper le système de comptage.

Ces résultats correspondent à ceux de Oxberry et Greenwald (1982) et également à ceux de Wang et Greenwald (1993) en ce qui concerne le temps d'incubation utilisé pour localiser les récepteurs à la LH et à la FSH. Par contre, Monget *et al.* (1989) ont préféré incuber leurs coupes de follicules avec l'IGF-I marqué durant 5 heures. En effet, le système de comptage utilisé par Monget ne se réfère plus à un récepteur, mais à l'aire occupée par tous les récepteurs d'une certaine intensité par unité de surface; cette méthode s'avère encore plus précise.

III.2. Choix de la température d'incubation.

III.2.1. Description.

Le but de cet essai est de tester trois températures (température ambiante, 4°C et 37°C), de nouveau pour chaque hormone, afin de déterminer la température que nous supposons la plus appropriée pour la suite du travail.

L'incubation à 37°C se fait en étalant les coupes dans un bain marie, tandis que les lames pourvues du tissu réservé à une incubation à température ambiante sont déposées sur un support placé dans un bassin rempli d'eau, dans le but de garder une certaine humidité au voisinage des échantillons. Quant aux coupes incubant à 4°C, elles reposent simplement dans un frigo.

Les résultats obtenus sont également traités pour chaque follicule selon le modèle de l'analyse de la variance à deux critères de classification, la température (critère fixe) et le nombre de liaisons spécifiques à l'hormone étudiée dans le tissu folliculaire (critère aléatoire). Les comparaisons de moyennes sont réalisées selon le test de Scheffé et le test est significatif à 95%.

III.2.2. Résultats et discussion.

En raison d'une mauvaise conservation de la structure granulosale, nous avons rejeté, après essai de la technique, l'idée d'incuber nos tissus à 37°C (photos 11,12 et 13). Des tissus ayant incubé suivant le même procédé avec seulement du

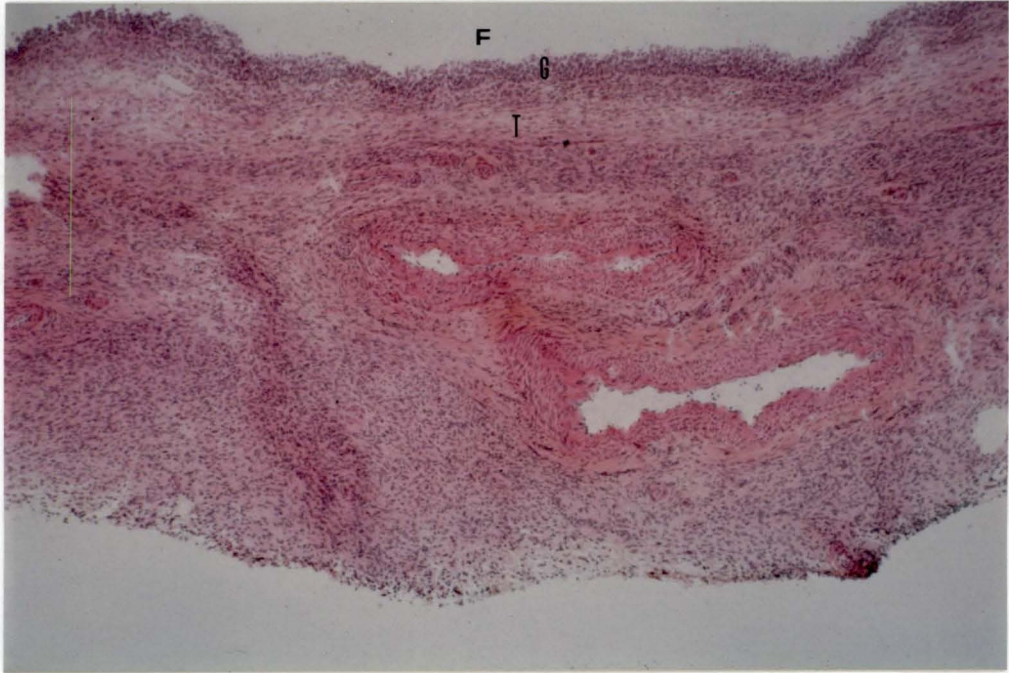


Photo 15 (G = 4×): Conservation de la structure de la granulosa après incubation de la coupe à 4°C pendant 90 minutes avec du tampon. La coupe est ensuite colorée à l'H.E.S. G: granulosa; T: thèque; F: fluide folliculaire.

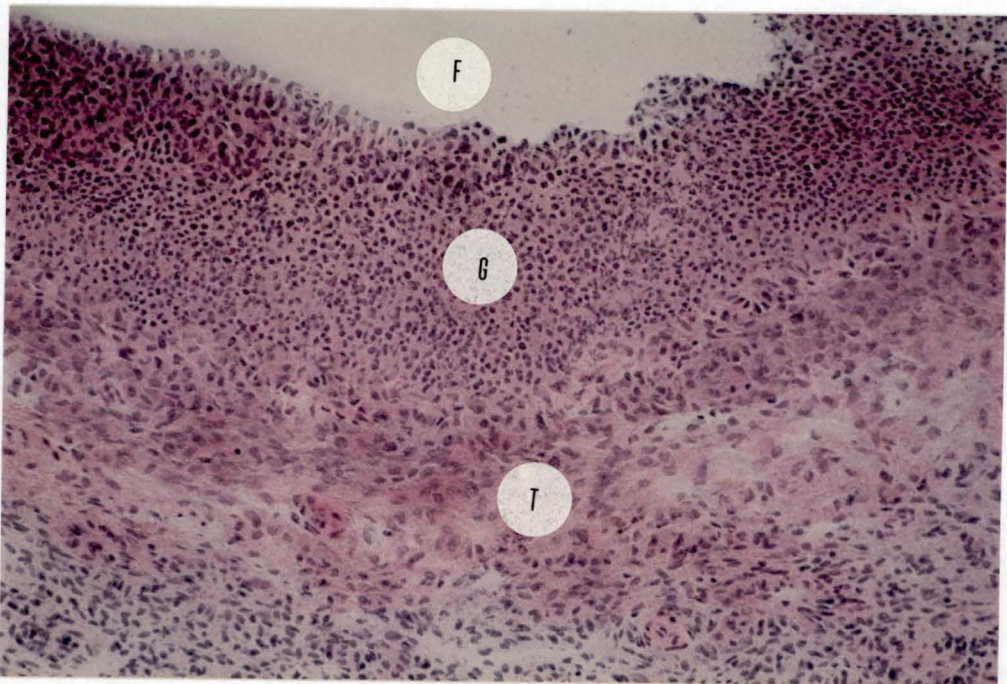


Photo 16 (G = 10×): Conservation de la structure de la granulosa après incubation de la coupe à température ambiante pendant 90 minutes avec du tampon. La coupe est ensuite colorée à l'H.E.S. G: granulosa; T: thèque; F: fluide folliculaire.

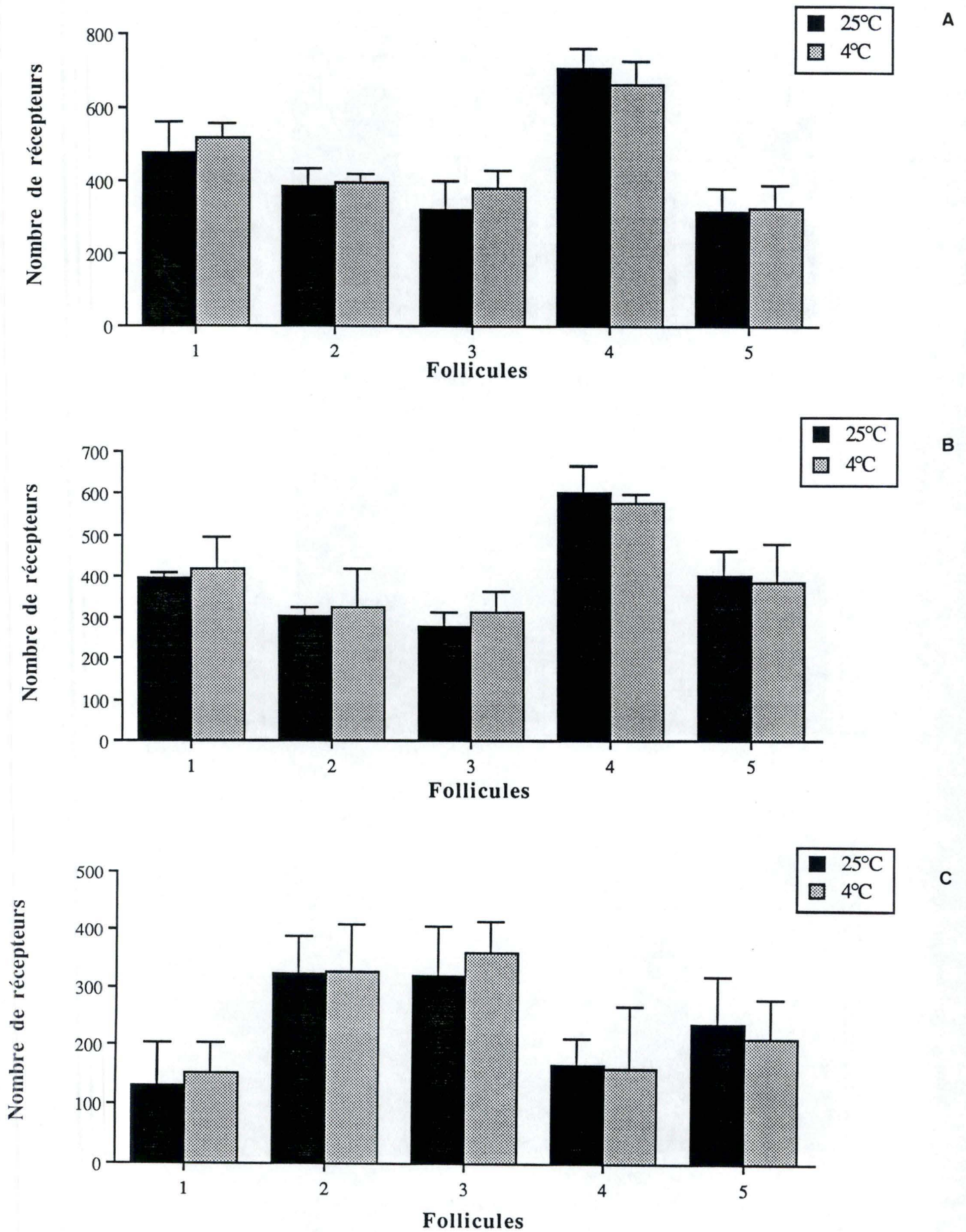


Figure 49: Nombre de récepteurs à la LH (A), à la FSH (B) et à l'IGF-I (C) comptés par unité de surface dans la thèque de 15 follicules différents en fonction de la température d'incubation (4°C ou température ambiante).

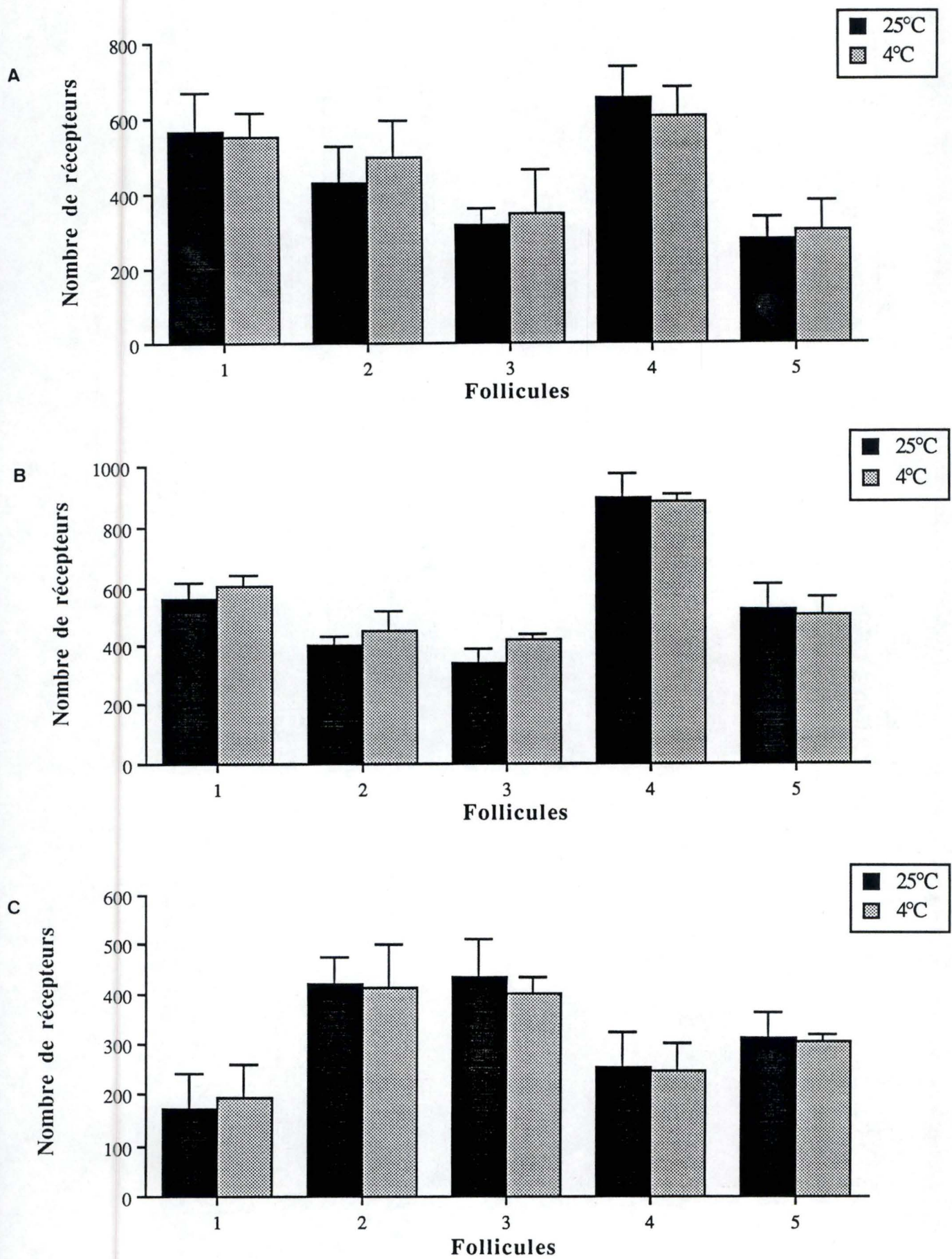


Figure 50: Nombre de récepteurs à la LH (A), à la FSH (B) et à l'IGF-I (C) comptés par unité de surface dans la granulosa de 15 follicules différents en fonction de la température d'incubation (4°C ou température ambiante).

tampon et colorés par après à l'H.E.S. apportent une confirmation à nos observations (photo 14).

Par contre, nous obtenons une bonne structure histologique des follicules à 4°C et à température ambiante (photos 15 et 16).

Nous avons choisi 5 follicules différents par hormone afin d'illustrer aux figures 49 et 50 le nombre de récepteurs obtenus dans la thèque et la granulosa de ces follicules à partir d'incubations réalisées à température ambiante et à 4°C avec l'hormone marquée. En nous basant sur nos résultats, nous n'observons aucune différence significative entre les quantités de liaisons spécifiques par unité de surface obtenues pour chaque hormone à ces deux températures, aussi bien dans la thèque que dans la granulosa.

Pour raison de facilité, nous avons choisi d'incuber nos coupes à 4°C. En outre, cette température offre une sécurité supplémentaire quant à la suppression de l'internalisation des récepteurs, malgré la fixation du tissu.

Nos résultats sont en désaccord avec ceux de Monget *et al.* (1989), ainsi que ceux obtenus par Oxberry et Greenwald (1982). La température utilisée par Monget *et al.* (1989) est de 25°C tandis que celle à laquelle travaille Oxberry et Greenwald (1982) ainsi que Wang et Greenwald (1993) est de 37°C.

III.3. Recherche de la concentration optimale d'hormone marquée à ajouter au cours de l'incubation à 4°C.

III.3.1. Description.

Pour chaque gonadotrophine et pour l'IGF-I, les différentes concentrations en hormone marquée testées sont:

- | | |
|--------------------|---------------------|
| - 2000 cpm/100 µl | - 40000 cpm/100 µl |
| - 4000 cpm/100 µl | - 80000 cpm/100 µl |
| - 10000 cpm/100 µl | - 100000 cpm/100 µl |
| - 20000 cpm/100 µl | - 150000 cpm/100 µl |

Les follicules choisis pour cette expérience possèdent tous un diamètre supérieur à 4 mm, les follicules atériques étant bien entendu mis de côté. Nous supposons donc qu'ils présentent tous à peu près un même stade de développement, malgré la non synchronisation des cycles sexuels des brebis.

L'analyse des résultats est réalisée pour chaque hormone et facteur indépendamment dans la thèque et la granulosa et se base sur le modèle de la

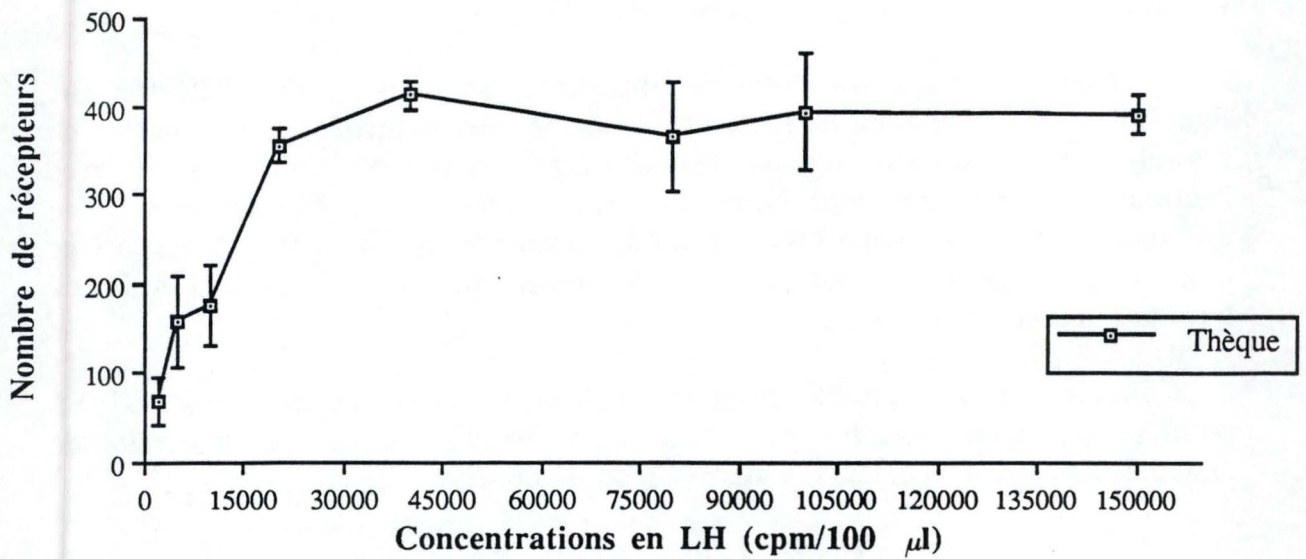


Figure 51: Quantité de récepteurs à la LH comptés par unité de surface dans la thèque de 5 follicules en fonction de la concentration (cpm/100 µl) en hormone marquée ajoutée lors de l'incubation.

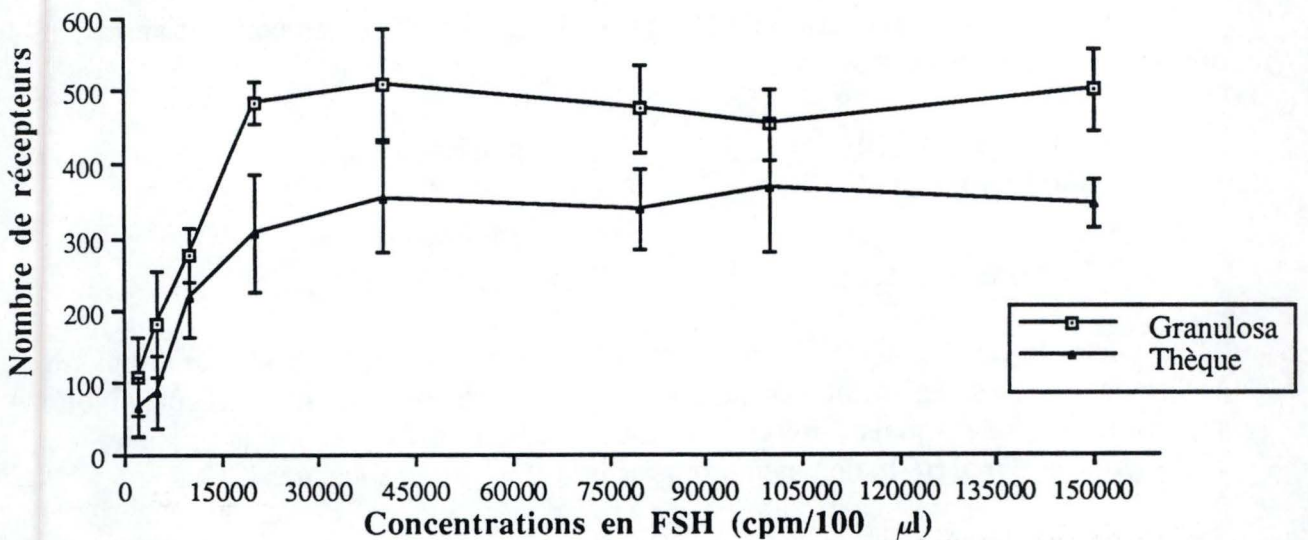


Figure 52: Quantité de récepteurs à la FSH comptés par unité de surface dans la thèque et la granulosa de 5 follicules en fonction de la concentration (cpm/100 µl) en hormone marquée ajoutée lors de l'incubation.

variance à 2 critères de classification représentés par la concentration en hormone radioactive (critère fixe) et le nombre de récepteurs spécifiques à l'hormone par unité de surface (critère aléatoire). Le test est significatif à 95%. La comparaison entre moyennes est assurée par le test de Scheffé. Les valeurs erratiques sont écartées dans le but de ne pas fausser les moyennes obtenues.

III.3.2. Résultats et discussion.

Les résultats obtenus révèlent à partir des figures 51 et 52 une concentration optimale en LH* et en FSH* à ajouter en vue de localiser leurs récepteurs à la surface cellulaire, se situant entre 20000 et 40000 cpm/100 μ l. En effet, l'augmentation du nombre de récepteurs spécifiques aux gonadotropines par unité de surface est significative jusqu'au moment où la concentration en hormone radioactive atteint les 20000 cpm/100 μ l. A une concentration de 10000 cpm/100 μ l, dans la thèque, ce nombre moyen fluctue autour de 174 récepteurs pour la LH et autour de 217 pour la FSH, tandis qu'à une concentration de 20000 cpm/100 μ l, ce nombre accroît à des valeurs de 355 récepteurs à la LH et de 483 récepteurs à la FSH par unité de surface. Pour la FSH, l'évolution de la quantité des récepteurs est semblable à celle observée dans la thèque; en ce qui concerne la quantité moyenne de récepteurs à la LH retrouvés dans la granulosa, elle est tellement variable que nous avons renoncé à réaliser un test statistique à partir de ces données.

Néanmoins, la quantité de liaisons spécifiques atteint un plateau aux environs de 40000 cpm/100 μ l. Nous n'avons pu cependant démontrer qu'il existait une différence statistiquement parlant entre le nombre de récepteurs spécifiques observés par unité de surface pour des concentrations aux gonadotropines à 20000 cpm/100 μ l et à 40000 cpm/100 μ l ou plus. Toutefois, nous utiliserons une concentration d'incubation pour les gonadotropines équivalente à 40000 cpm/100 μ l dans nos travaux ultérieurs. Ces concentrations sont également utilisées par Oxberry et Greenwald (1982) ainsi que Wang et Greenwald (1993) en vue de la réalisation de leurs expériences.

La courbe évoquant le nombre de récepteurs de type I obtenu par unité de surface en fonction de la concentration en IGF-I iodonné fournie à la figure 53 présente quant à elle un plateau à 80000 cpm/100 μ l où la quantité moyenne de récepteurs obtenue par unité de surface atteint des valeurs de 398 récepteurs dans la thèque et de 943 récepteurs dans la granulosa à côté des 302 et 595 récepteurs retrouvés en moyenne respectivement dans la thèque et la granulosa folliculaires pour une concentration d'hormone marquée diluée à 40000 cpm/100 μ l. Ces résultats concordent avec ceux de Monget *et al.* (1989), qui utilisent pour leurs incubations une concentration en IGF-I de 100000 cpm/100 μ l.

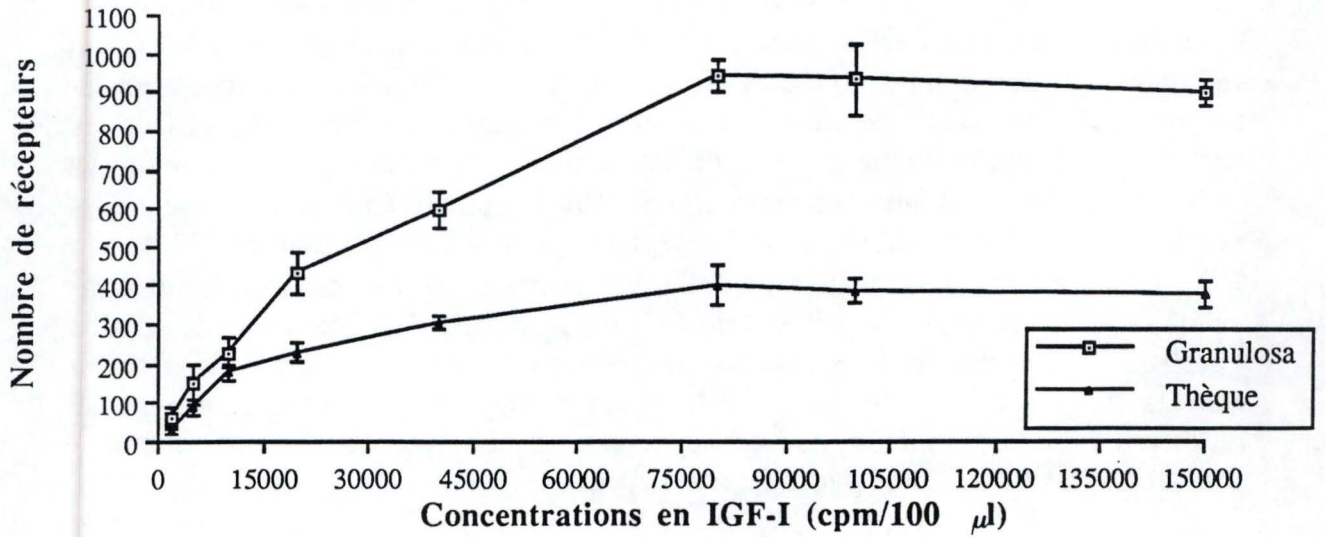


Figure 53: Quantité de récepteurs à l'IGF-I comptés par unité de surface dans la thèque et la granulosa de 5 follicules en fonction de la concentration (cpm/100 μl) en hormone marquée ajoutée lors de l'incubation.

IV. Conclusions.

Suite aux différents essais réalisés et dont les résultats sont, pour la plupart, en accord avec ceux cités dans la littérature, les conditions expérimentales retenues pour les hormones hypophysaires sont:

- un temps d'incubation de 90 minutes.
- une température d'incubation de 4°C.
- une concentration en hormone marquée de 40000 cpm/100 µl.

En ce qui concerne l'IGF-I, nous avons retenu les mêmes temps et température, mais une concentration en IGF-I radioactif de 80000 cpm/100 µl.

Résultats et discussion.

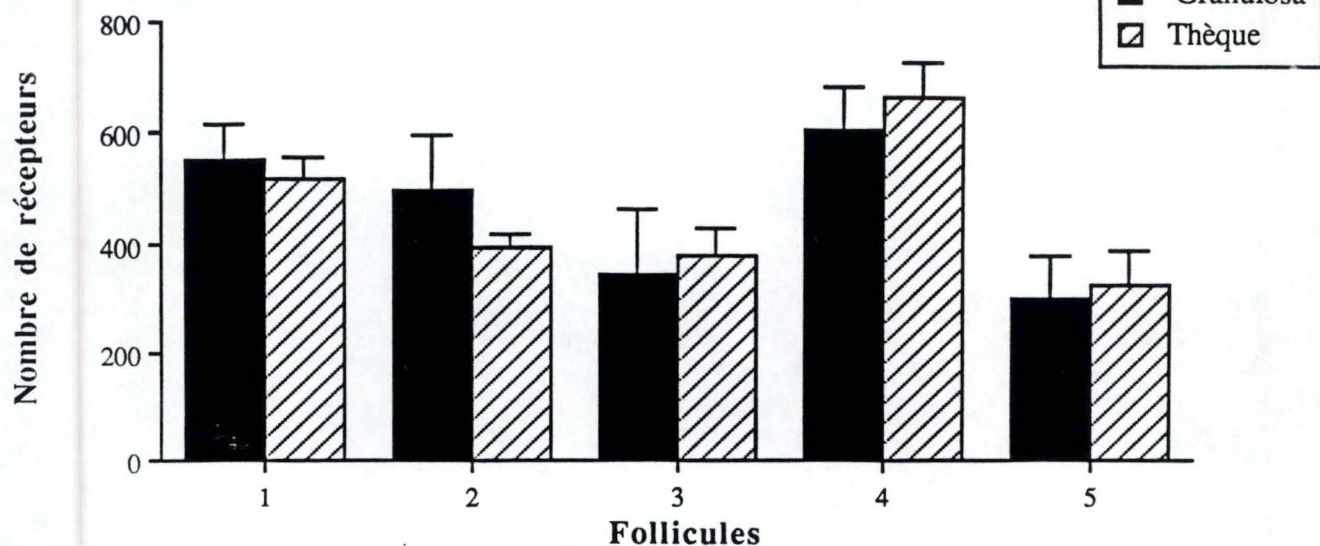


Figure 54: Quantité de récepteurs à la LH comptés par unité de surface dans la granulosa et la thèque de 5 follicules différents.

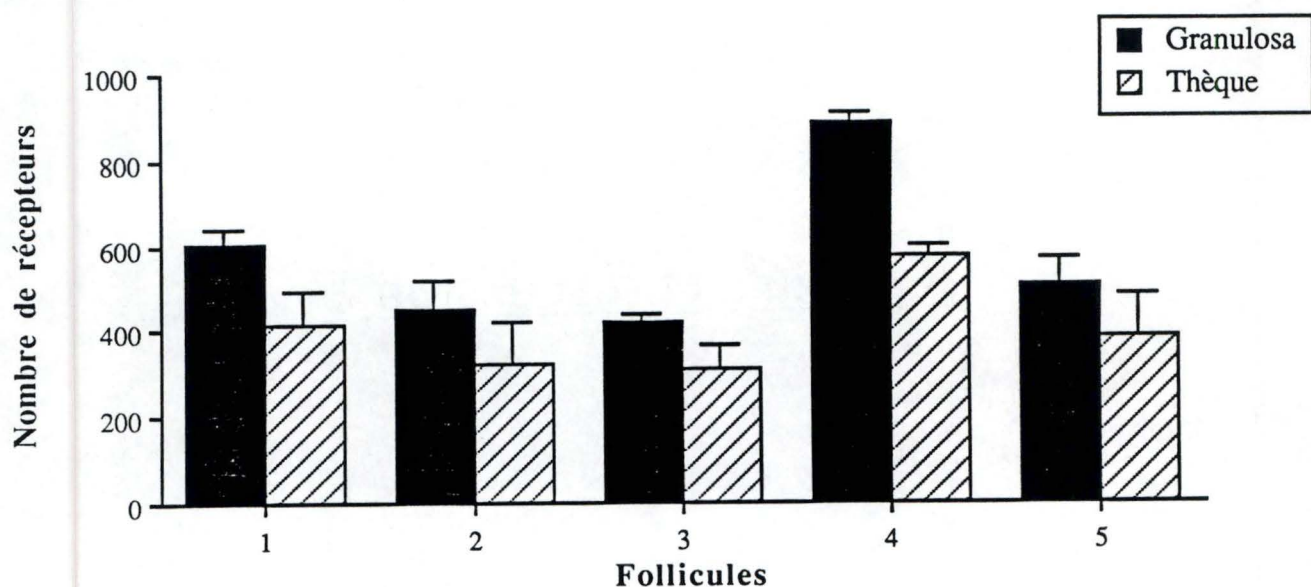


Figure 55: Quantité de récepteurs à la FSH comptés par unité de surface dans la granulosa et la thèque de 5 follicules différents.

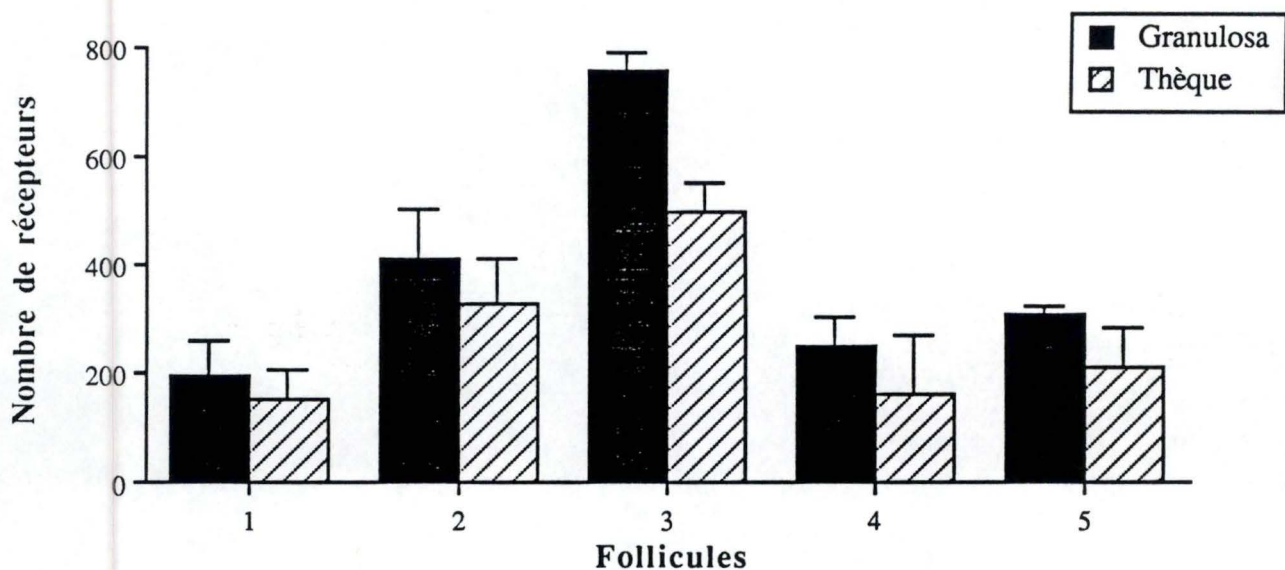


Figure 56: Quantité de récepteurs à l'IGF-I comptés par unité de surface dans la granulosa et la thèque de 5 follicules différents.

I. Localisation des récepteurs dans le follicule.

I.1. Description.

Le comptage par unité de surface des récepteurs aux gonadotropines et à l'IGF-I a été fait à partir de follicules prélevés à l'abattoir et présentant des stades de développement inconnus et variables. L'état physiologique de chaque follicule est vérifié par une coloration H.E.S.

Le test réalisé sur ces follicules repose sur une comparaison effectuée entre les quantités de liaisons spécifiques relevées dans la granulosa et dans la thèque d'un même échantillon. En effet, comme nous l'avons déjà expliqué, après autoradiographie, les échantillons sont comparés avec les coupes histologiques colorées à l'H.E.S., ce qui rend possible la distinction entre la granulosa et la thèque. La comparaison entre ces deux tissus est vérifiée statistiquement selon le modèle de l'Anova 2 caractérisée par un critère fixe (granulosa ou thèque) et un critère aléatoire (nombre de récepteurs spécifiques compté sur la section observée). Le test est significatif à 95%.

I.2. Résultats.

Pour illustrer nos résultats à la figure 54, nous avons choisi 5 follicules au hasard pour chaque hormone. Pour les follicules étudiés, nos résultats présentent une variabilité de leur composition en récepteurs à la LH au niveau de la granulosa par rapport à celle rencontrée dans la thèque. En effet, dans certains follicules la quantité observée de récepteurs à la LH est significativement plus élevée dans la granulosa (follicule 2) que dans la thèque. D'autres follicules possèdent davantage de récepteurs à la LH dans la thèque (follicule 4). Mais nous avons rencontré des follicules ne présentant aucune différence significative entre les teneurs en récepteurs à la LH retrouvées dans la thèque ou la granulosa folliculaire (follicules 1, 3 et 5).

Dans la plupart des follicules, le nombre de récepteurs spécifiques à la FSH (fig.55) et à l'IGF-I (fig. 56) est significativement ($p < 0,05$) plus important dans la granulosa des follicules étudiés que dans leur thèque.

I.3. Discussion.

I.3.1. Localisation des récepteurs à la LH.

D'après la littérature, ce qui caractérise le devenir d'un follicule préantral en un follicule antral (diamètre > 4 mm), c'est l'apparition de récepteurs à la LH dans leurs cellules granulosales (Thibault et Levasseur, 1991; Yen et Jaffe, 1991). Comme

nous l'avons déjà précisé dans la revue bibliographique, les follicules, au début de leur croissance folliculaire terminale, possèdent des récepteurs à la LH uniquement dans la thèque (Webb et Gauld, 1984) et acquièrent au fur et à mesure de leur croissance des récepteurs à la LH dans la granulosa.

Dans les follicules que nous avons examiné, de tailles et de niveaux de croissance différents, certains entament à peine leur croissance terminale alors que d'autres sont en croissance avancée. Il est normal dès lors qu'il existe une variation de la teneur en récepteurs à la LH des cellules granulosales ovariennes par rapport à celle contenue dans les cellules de la thèque.

1.3.2. Localisation des récepteurs à la FSH.

Conformément à la littérature, les follicules, dès leur stade préantral, présentent principalement des sites de fixation à la FSH à la surface de leurs cellules granulosales (Webb et Gauld, 1984). Cette quantité de récepteurs augmente avec la multiplication des cellules de la granulosa et donc avec la taille du follicule (Oxberry *et al.*, 1982). Nos résultats sont en accord avec ceux de nos références, puisque nous obtenons une quantité significativement plus importante de récepteurs spécifiques à la FSH dans la granulosa que dans la thèque, à tous moments de la croissance terminale.

1.3.3. Localisation des récepteurs à l'IGF-I.

Il a été démontré par Davoren et ses collaborateurs (1986) ainsi que par Monget et ses collègues (1989) que dans l'ovaire, l'IGF-I se fixe préférentiellement à la surface des cellules de la granulosa, quel que soit le stade de développement du follicule. Nos résultats apportent une confirmation supplémentaire à ces expériences.

II. Influence de la taille des follicules sur la quantité des récepteurs aux hormones hypophysaires et à l'IGF-I.

II.1. Description.

Nous rappelons que pour établir un impact de la taille des follicules sur la répartition des récepteurs, deux brebis sont synchronisées. Les follicules de tailles hétérogènes sont prélevés au jour 16 du cycle, c'est-à-dire à la fin de la phase folliculaire, et mis en culture. La culture *in vitro* des follicules est effectuée comme l'a décrite Renard (1991); les follicules sont donc stimulés par la LH, suivie de la FSH. Parallèlement à la détermination des sites de liaison aux hormones, nous avons effectué un dosage des sécrétions stéroïdiennes pour chaque genre de follicules. Les follicules atrétiques ne sont pas repris dans nos résultats.

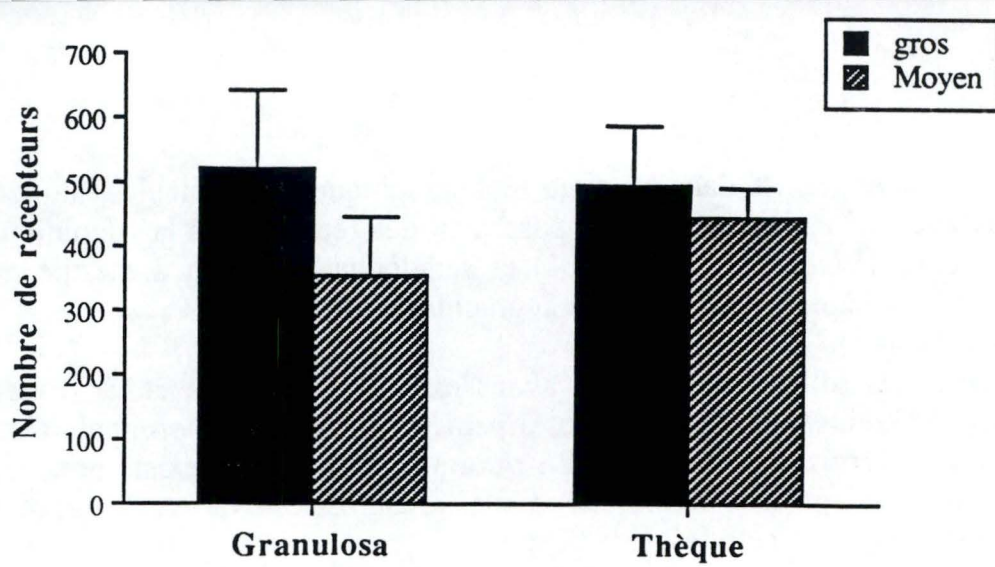


Figure 57: Quantité de récepteurs à la LH comptés par unité de surface dans la granulosa et la thèque des gros follicules et des follicules moyens.

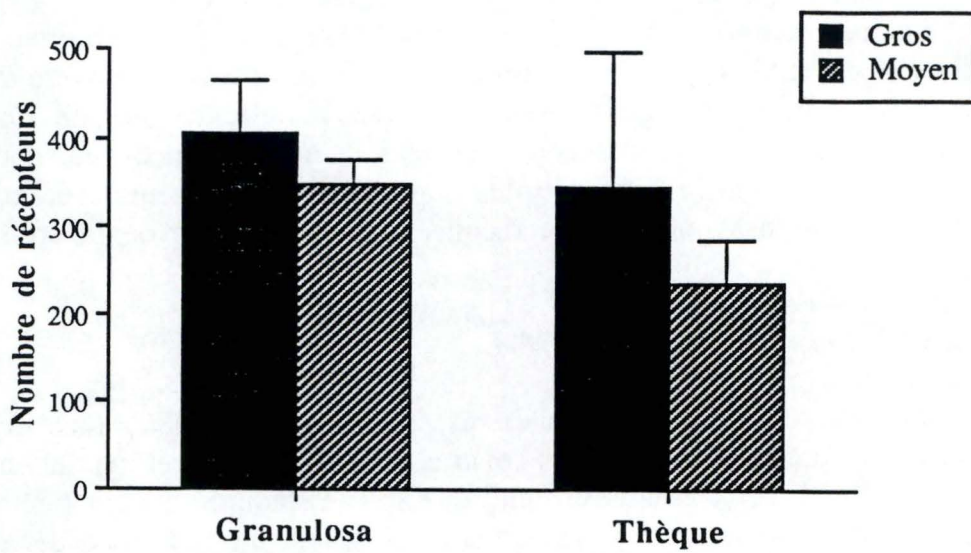


Figure 58: Quantité de récepteurs à la FSH comptés par unité de surface dans la granulosa et la thèque des gros follicules et des follicules moyens.

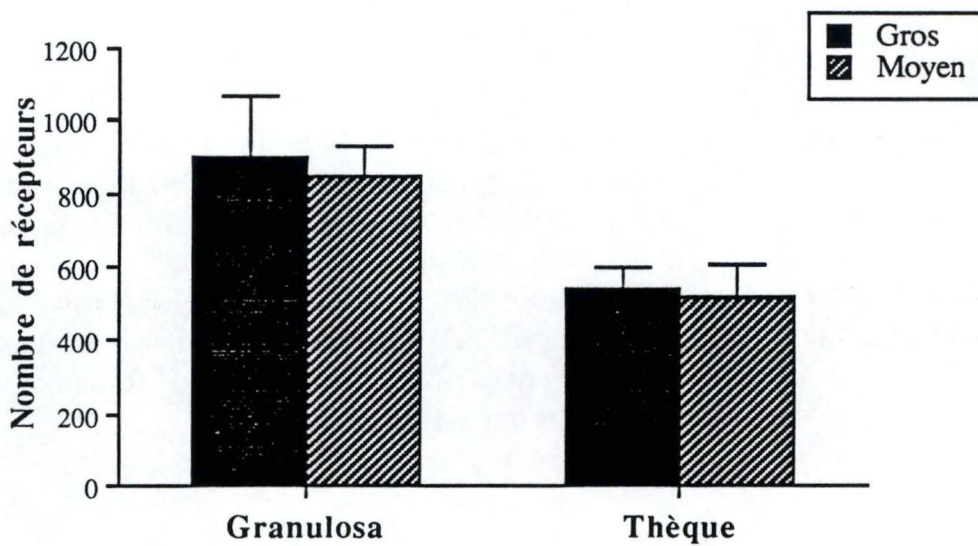


Figure 59: Quantité de récepteurs à la IGF-I comptés par unité de surface dans la granulosa et la thèque des gros follicules et des follicules moyens.

N'ayant pu récupérer de petits follicules (diamètre < 2 mm), nous n'étudierons que deux classes folliculaires: les catégories des gros (diamètre > 4 mm) et des moyens follicules (diamètre entre 2 et 4 mm).

L'obtention des résultats est vérifiée pour chaque type de récepteur par un test d'analyse de la variance à 2 critères de classification désignés par la taille folliculaire (fixe) et le nombre de récepteurs (aléatoire). La comparaison entre moyennes est obtenue par un test de Scheffé. Le test est significatif à 95%.

Pour réaliser une comparaison entre les sécrétions stéroïdiennes émises par les deux classes de follicules, nous nous basons également sur le modèle de l'analyse de la variance à 3 critères de classification: la classe du follicule (critère fixe), la concentration des stéroïdes dans le prélèvement (aléatoire) et le prélèvement (fixe).

II.2. Résultats.

II.2.1. Evolution du nombre des récepteurs suivant la taille du follicule.

Manifestement, les histogrammes exposés aux figures 57 et 58 montrent, par unité de surface, un nombre plus important de récepteurs propres à la LH et à la FSH dans la thèque et la granulosa des gros follicules, que celui relevé dans les follicules moyens. Cette différence n'est cependant significative que pour la quantité de récepteurs à la LH localisés dans la granulosa folliculaire. Le nombre moyen de récepteurs à la LH trouvés par unité de surface de granulosa fluctue autour d'une valeur de 519 dans les gros follicules et diminue à une valeur d'environ 354 récepteurs dans les follicules de taille moyenne.

Un coup d'oeil sur la figure 59 ne révèle aucune nuance marquée entre la quantité de récepteurs à l'IGF-I contenue par unité de surface dans la thèque et la granulosa des gros follicules, et celle obtenue dans les différentes cellules des follicules de taille moyenne. Les tests statistiques renforcent cette affirmation.

De cette expérience nous observons également une localisation préférentielle ($p < 0,05$) des récepteurs à la FSH et à l'IGF-I (fig. 58 et 59) dans les cellules de la granulosa par rapport aux cellules de la thèque quelle que soit la taille du follicule, ce qui confirme nos résultats antérieurs. Par contre, la distribution des récepteurs spécifiques à la LH (fig. 57) varie d'une taille de follicule à l'autre. En effet, les follicules de taille moyenne présentent des récepteurs à la LH principalement dans les cellules de la thèque alors que l'inverse est observé pour la granulosa (ce test n'est cependant pas significatif).

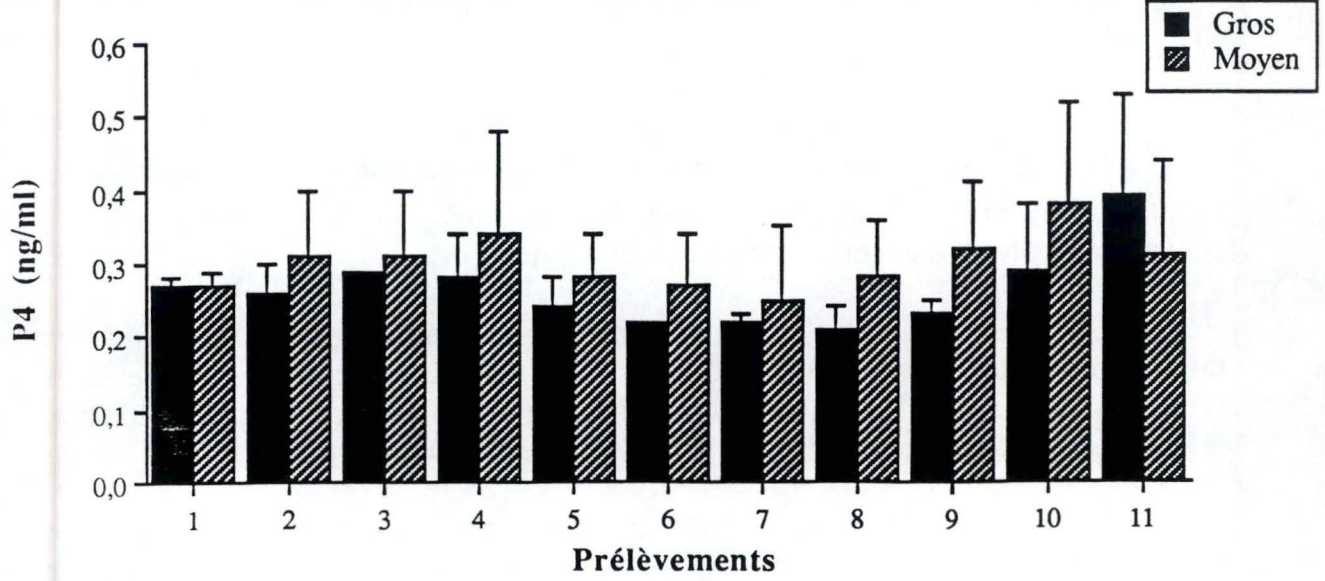


Figure 60: Taux de progestérone (ng/ml) sécrétés, à chaque prélèvement de la culture *in vitro*, par les gros et les moyens follicules.

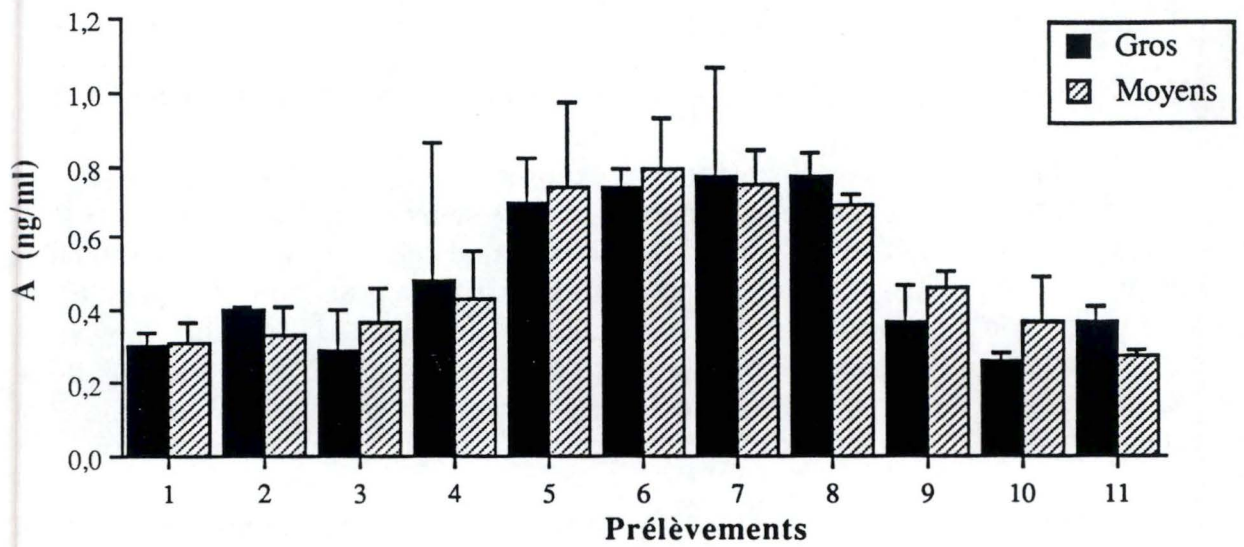


Figure 61: Taux d'androstènedione (ng/ml) sécrétés, à chaque prélèvement de la culture *in vitro*, par les gros et les moyens follicules.

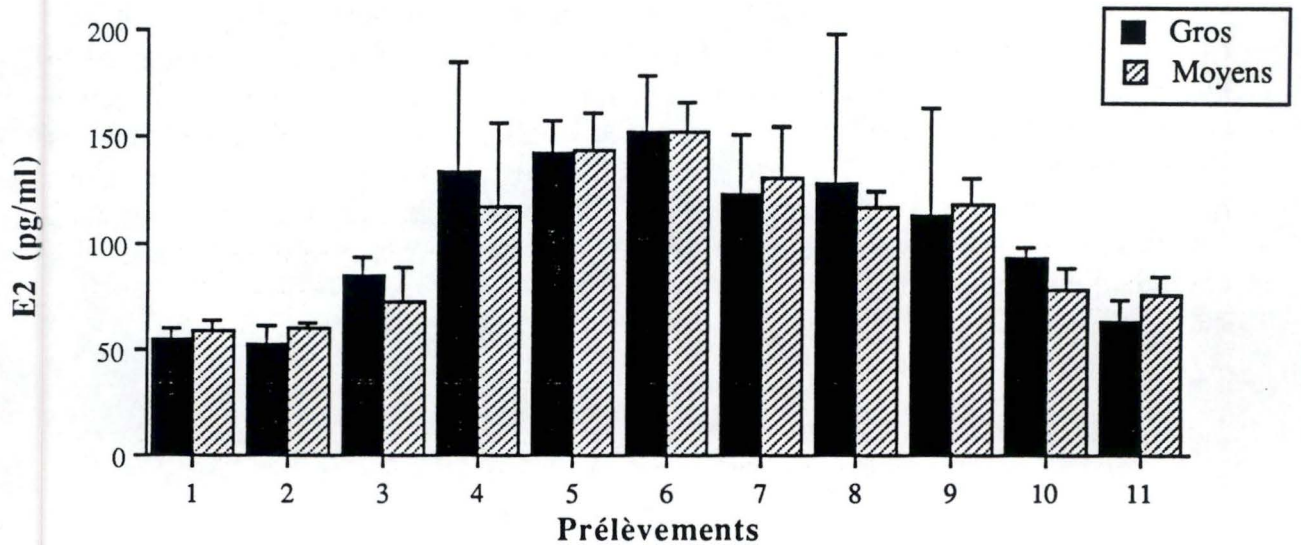


Figure 62: Taux d'oestradiol (ng/ml) sécrétés, à chaque prélèvement de la culture *in vitro*, par les gros et les moyens follicules.

II.2.2. Profils des sécrétions stéroïdiennes attribués aux follicules de tailles différentes.

Les taux moyens de **progestérone** (figure 60) sécrétés par les follicules ne varient pas de façon significative tout au long de la culture et cela pour les deux catégories de follicules. Les taux moyens de P₄ sécrétés par les follicules de taille intermédiaire avoisinent 0,30 ng/ml et ceux sécrétés par les gros follicules fluctuent autour d'une valeur de 0,27 ng/ml. Les stimulations gonadotropiques n'ont donc aucun effet sur les taux de progestérone relevés dans les échantillons.

Dans les quatre premiers prélèvements du milieu périfusé effectués lors de la culture folliculaire, les taux moyens d'**androstènedione** (fig. 61) oscillent autour des concentrations de 0,37 ng/ml et de 0,36 ng/ml pour les gros et les moyens follicules. Au cinquième prélèvement, c'est-à-dire une heure après la stimulation par les gonadotropines, ces taux s'élèvent brusquement à 0,75 ng/ml et 0,74 ng/ml. Enfin, dès le neuvième prélèvement, ces taux s'atténuent à des valeurs de 0,33 et 0,36 ng/ml pour les gros et les moyens follicules.

Les niveaux moyens d'**oestradiol** (fig. 62) sont, avant les stimulations gonadotropiques, de 54 pg/ml pour les gros follicules et de 57 pg/ml pour les follicules de taille moyenne. Les deux sortes de follicules répondent directement après l'apport de LH et de FSH par une augmentation de leurs sécrétions en E₂ passant à des maxima de 152 et 153 pg/ml suivant les deux classes de follicules lors du sixième prélèvement. A partir de ce moment, les taux de E₂ diminuent jusqu'à atteindre des valeurs environnant les 70 pg/ml.

Aucune différence significative n'est observée entre les deux classes de follicules, ni pour les sécrétions initiales des stéroïdes, ni pour la réactivité des follicules aux traitements par les gonadotropines.

II.3. Discussion.

Dans cette expérience, nous souhaitons mettre en relation l'évolution des récepteurs aux hormones à partir de follicules présentant des tailles différentes et les sécrétions de ces follicules en stéroïdes au long de la culture *in vitro*, tout en sachant que ces follicules ont été stimulés par les deux gonadotropines durant cette culture.

Avant de nous lancer plus loin dans la discussion, nous proposons un petit rappel théorique afin de redéfinir les relations existant entre les hormones gonadotropiques et les stéroïdes.

Les follicules sélectionnés pour la mise en culture possèdent tous un diamètre supérieur à 2 mm. Ils s'avèrent donc dépendants des stimulations gonadotropiques (Mc Neilly *et al.*, 1986).

Dès qu'un follicule est dépendant des gonadotropines, il acquiert la capacité de stimuler la stéroïdogenèse. La LH en favorisant l'action de la Δ^5 - 3β -hydroxystéroïde déshydrogénase, enzyme qui provoque la conversion de la prégnénolone en progestérone, est donc stimulatrice de la production de progestérone (Dérivaux et Ectors, 1986).

La FSH stimule, par l'intermédiaire de ses récepteurs situés dans les cellules de la granulosa, l'apparition des sites de fixation à la LH dans la granulosa (Webb et Gauld, 1984), induit la synthèse de la β -déshydrogénase, enzyme nécessaire à la transformation du prégnénolone en progestérone et potentialise dans la granulosa l'action de l'enzyme aromatasase, indispensable à la synthèse des oestrogènes (Mc Neilly, 1984; Dérivaux et Ectors, 1986). Une augmentation des sécrétions d'oestrogènes est donc enregistrée dès la manifestation des récepteurs à la LH dans la granulosa (Kaneko *et al.*, 1991).

Nous n'avons pas à notre connaissance des éléments qui supposeraient une quelconque relation directe entre les sécrétions stéroïdiennes et le facteur de croissance IGF-I.

II.3.1. Influence de la taille du follicule sur la quantité et la localisation des récepteurs aux gonadotropines.

Au commencement de la croissance folliculaire terminale, les follicules dont le diamètre fluctue aux environs de 2 mm sont pourvus de récepteurs à la FSH dans la thèque et surtout dans la granulosa; ainsi que des récepteurs à la LH, mais exclusivement dans la thèque folliculaire (Oxberry et Greenwald, 1982).

Au fur et à mesure de la multiplication cellulaire de la granulosa, le follicule acquiert dans ce tissu des récepteurs à la LH. Cette étape est nécessaire à la progression et à la continuation de la croissance folliculaire (Carson *et al.*, 1979). Cet événement explique la hausse du nombre de récepteurs à la LH observée dans la granulosa des gros follicules (qui se préparent au pic ovulatoire de LH) comparée à la quantité de liaisons spécifiques à la LH situées dans la granulosa des follicules de taille intermédiaire. Cet événement est aussi à la base des inégalités constatées entre la composition en récepteurs à la LH des cellules de la granulosa et celle des cellules de la thèque. En effet, les follicules moyens acquièrent seulement leurs récepteurs à cette gonadotropine au niveau de leur granulosa.

En ce qui concerne la quantité de récepteurs à la FSH, elle augmente avec la prolifération des cellules granulosales (Yen et Jaffe, 1991). Par unité de surface,

nous ne pouvons statistiquement rendre compte de cet accroissement du nombre de récepteurs dans l'entière du follicule. Par contre, nous affirmons, en accord avec la littérature (Yen et Jaffe, 1991; Thibault et Levasseur, 1991), que la majorité des sites de fixation spécifiques de la FSH est rencontrée au niveau de la granulosa, quelle que soit la taille du follicule.

II.3.2. Influence de la taille du follicule sur la quantité et la localisation des récepteurs à l'IGF-I.

Nous avons déjà mentionné qu'un diamètre de 2 mm représente, pour un follicule, la limite au dessus de laquelle les gonadotropines sont essentielles pour la croissance et la différenciation folliculaires.

D'après Monget et ses collaborateurs (1993), les follicules de petite taille chez la brebis présentent une hausse du nombre de leurs récepteurs à l'IGF-I jusqu'à ce que le follicule atteigne une taille supérieure à 2 mm. A partir de ce moment précis, la quantité des récepteurs de type I ne varie plus avec la taille folliculaire. Nos résultats confirment donc ceux obtenus par Monget et ses collaborateurs.

Suivant Monget *et al.* (1993), il en est de même en ce qui concerne les teneurs en IGF-I contenues dans le liquide folliculaire. Selon lui, l'action de l'IGF-I sur la croissance folliculaire peut dépendre de la quantité de récepteurs de type I situés à la surface cellulaire du follicule mais aussi celle des protéines de liaison de l'IGF-I. Les modifications du profil des IGFBPs seraient responsables d'altérations non négligeables de la biodisponibilité des IGFs sur les cellules folliculaires. L'évolution des teneurs intrafolliculaires en IGFBPs constitue certainement un élément clef de la folliculogenèse.

Les récepteurs de type I sont retrouvés principalement dans les cellules de la granulosa des follicules présentant des tailles distinctes. Ceci confirme les conclusions données pour l'expérience précédente.

II.3.3. Evolution des sécrétions stéroïdiennes au cours de la culture in vitro et influence de la taille des follicules sur ces sécrétions.

L'évolution observée par les taux des stéroïdes émis dans le milieu périfusé lors de la culture *in vitro* des follicules, suit le schéma traditionnel décrit par Renard (1991), Botspoel (1993) et Quewet (1993) lors d'une double stimulation des follicules aux gonadotropines pendant la saison de reproduction et en fin de phase folliculaire.

Les taux de **progestérone** sécrétés par les deux types de follicules varient très peu tout au long de la culture. Ce stéroïde est sans doute converti en androstènedione de façon accrue. En effet, d'après Denning-Kendall et Wathes

(1994), Dérivaux et Ectors (1986) et bien d'autres auteurs, la LH stimule la production de progestérone.

Nous observons lors de la culture des follicules une augmentation des taux d'**androstènedione** suivant les stimulations gonadotropes. Ces résultats ajoutés aux précédents sont également occasionnés par une action de la LH sur la stimulation de l'enzyme P_{450-17 α} dans les cellules thécales. Cette enzyme favorise la synthèse de Δ 4. Nous n'observons aucune différence significative dans les sécrétions d'androstènedione entre les follicules moyens et gros, et cela durant toute la culture. En effet, les taux de ces stéroïdes ainsi que ceux de la progestérone n'augmentent qu'après l'ovulation, en phase lutéale (Denning-Kendall et Wathes, 1994); cette phase est gouvernée par l'action de la LH transmise par l'intermédiaire de ses récepteurs situés à la surface des cellules de la granulosa (Harrison *et al.* , 1987).

Une augmentation des taux d'**oestradiol** est enregistrée après les stimulations gonadotropiques. En effet, la FSH anime alors l'action de l'aromatase dans les cellules de la granulosa et stimule la production de E₂ dans ces cellules (Mc Neilly, 1984).

Le fait que nous n'ayons pu mettre en évidence une modification des sécrétions de E₂ dans les gros follicules comparées à celles des follicules de taille moyenne, renforce l'idée que la hausse des concentrations en E₂ se produit déjà au début de la croissance terminale d'un follicule, dès l'apparition des récepteurs à la LH dans sa granulosa.

II.3.4. Relation entre la quantité et la localisation des récepteurs aux gonadotropines et les sécrétions stéroïdiennes des différents types de follicules.

La FSH induit la synthèse d'oestradiol en stimulant la catalysation de la Δ 4 en E₂ par l'enzyme aromatase dans la granulosa (Yen et Jaffe, 1991). Les follicules de grosse taille sont pourvus d'un plus grand nombre de cellules de la granulosa et donc d'une quantité plus importante de récepteurs à la FSH. D'après Armstrong et ses collaborateurs (1981), les taux d'oestrogènes devraient également s'intensifier avec la multiplication des cellules de la granulosa et avec elles, celle des récepteurs à la FSH. Nous n'avons pu rendre compte de ce phénomène dans notre travail.

Les quantités de récepteurs à la LH et à la FSH situés sur les cellules de la granulosa ne peuvent être mises en relation avec les taux de sécrétion de progestérone, celle-ci étant essentiellement sécrétée par le corps jaune (Driancourt *et al.* , 1984). Dans les follicules ovariens, la progestérone ne représente qu'une étape intermédiaire dans la biosynthèse de l'oestradiol (Driancourt *et al.* , 1984).

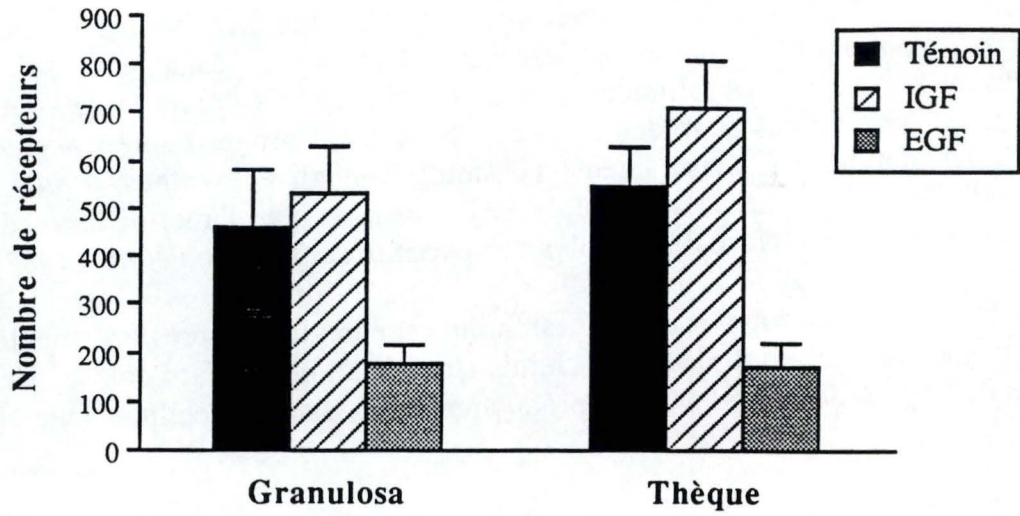


Figure 63: Influence des stimulations *in vitro* par l'IGF-I et par l'EGF sur la quantité des récepteurs folliculaires à la LH, comptés par unité de surface, dans la granulosa et la thèque des follicules étudiés.

III. Influence des stimulations réalisées *in vitro* par les facteurs de croissance IGF-I et EGF sur les trois types de récepteurs étudiés.

III.1. Description.

Rappelons que les ovaires sont prélevés chez des brebis en phase folliculaire du cycle oestral suite à une synchronisation des cycles. Les follicules obtenus à partir de ces ovaires sont placés en culture suivant trois catégories:

- la première représente les follicules témoins. Ils ne sont stimulés que par les gonadotropines.
- la seconde est constituée des follicules stimulés par l'IGF-I avant leur traitement aux gonadotropines.
- la dernière regroupe les follicules traités par l'EGF, suivant un schéma identique à celui utilisé dans la deuxième catégorie.

Tous ces follicules ont été prélevés durant une même saison (celle de reproduction) et possèdent un diamètre supérieur à 4 mm. Ces précautions permettent de réaliser des comparaisons nettes entre les trois classes distinctes de follicules.

Parallèlement à l'étude des récepteurs, nous parlerons des résultats obtenus par Botspoel (1993) sur les taux de sécrétions stéroïdiennes émises par ces mêmes follicules.

Les comparaisons sont analysées statistiquement par le test Anova 2 dont les critères de classification sont le traitement (fixe) et la quantité de liaisons spécifiques retrouvées par unité de surface (aléatoire). L'analyse entre moyennes est réalisée par le test de Scheffé. Le test est significatif à 95%.

III.2. Résultats.

Les figures 63, 64 et 65 représentent les quantités de récepteurs à la LH, à la FSH et à l'IGF-I retrouvées par unité de surface dans la thèque et la granulosa des follicules stimulés par les facteurs de croissance IGF-I et EGF par rapport à celles comptées dans les follicules témoins.

III.2.1. Traitement à l'IGF-I.

Nous observons, à la figure 63, dans la thèque des follicules traités à l'IGF-I une augmentation significative de la quantité des récepteurs à la LH oscillant autour

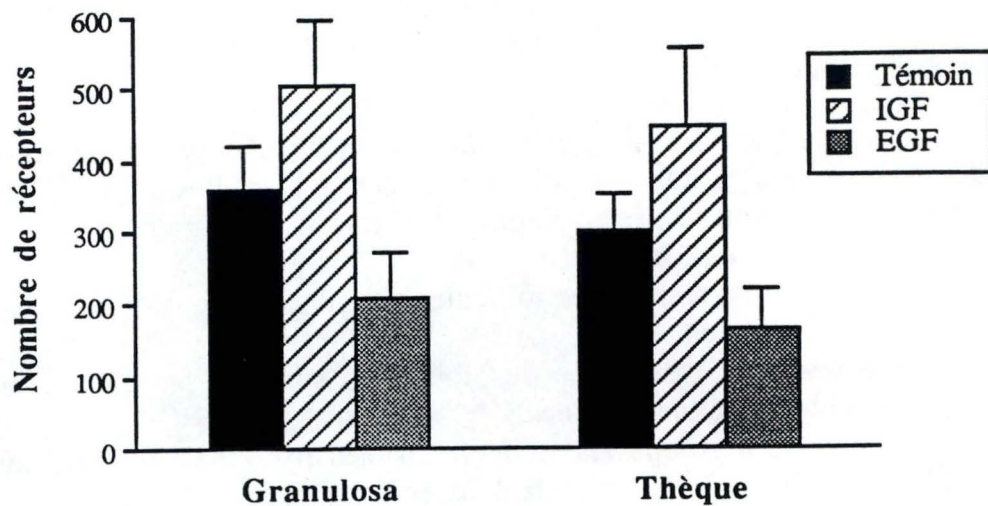


Figure 64: Influence des stimulations *in vitro* par l'IGF-I et par l'EGF sur la quantité des récepteurs folliculaires à la FSH comptés par unité de surface dans la granulosa et la thèque des follicules étudiés.

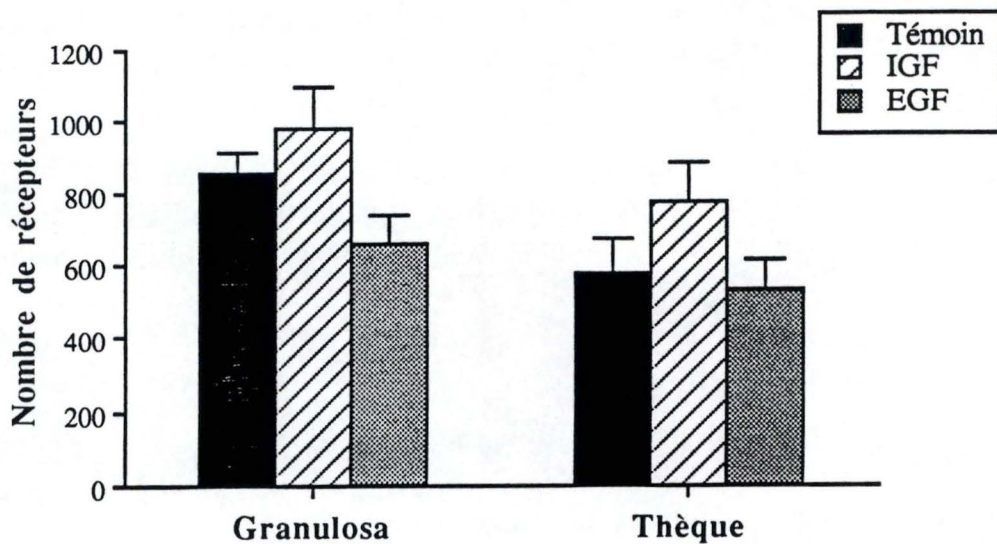


Figure 65: Influence des stimulations *in vitro* par l'IGF-I et par l'EGF sur la quantité des récepteurs folliculaires à l'IGF-I comptés par unité de surface dans la granulosa et la thèque du follicule étudié.

d'une valeur de 714 par unité de surface par rapport à celle obtenue dans la thèque des follicules témoins (548 récepteurs par unité de surface).

Un tel accroissement du nombre de récepteurs à la LH paraît aussi se produire dans la granulosa des follicules traités mais il n'a pu être démontré statistiquement.

Dans la granulosa et dans la thèque des follicules stimulés par l'IGF-I et représentés à la figure 64, une nette intensification du nombre de liaisons spécifiques à la FSH est constatée. Celle-ci est significative. En effet, les quantités moyennes de récepteurs à la FSH retrouvées dans la granulosa et la thèque des follicules traités sont de 503 et 446 à côté des 358 et 299 récepteurs comptés en moyenne dans ces tissus des follicules témoins.

Nous observons également une hausse significative de la quantité des récepteurs de type I dans la thèque et la granulosa des follicules traités à l'IGF-I par rapport à celle obtenue dans les follicules témoins (fig. 65). Ces nombres moyens varient autour de valeurs égales à 773 et 982 récepteurs de type I trouvés par unité de surface dans respectivement la thèque et la granulosa des follicules traités et diminuent à des valeurs moyennes de 578 et 883 récepteurs pour les mêmes tissus des follicules témoins.

III.2.2. Traitement à l'EGF.

Dans la thèque des follicules stimulés par l'EGF, la régression des récepteurs aux gonadotropines est très hautement significative par rapport à la quantité de liaisons spécifiques à ces hormones hypophysaires comptées par unité de surface dans les tissus des follicules témoins (fig.63 et 64). En effet, dans la thèque des follicules traités, les quantités moyennes des récepteurs à la LH et à la FSH sont de 170 et 163 récepteurs seulement à côté des 548 et 358 récepteurs à ces deux gonadotropines retrouvés en moyenne par unité de surface dans la thèque des follicules témoins.

Cette différence entre quantités moyennes de récepteurs à la LH et à la FSH situés dans la granulosa des follicules traités (175 récepteurs à la LH et 209 récepteurs à la FSH par unité de surface) par rapport à celles retrouvées dans la granulosa des follicules témoins (463 et 358 récepteurs respectivement à la LH et à la FSH) est elle aussi très nette.

Nous observons à la figure 65 ($p < 0,05$), au niveau de la granulosa des follicules traités, une forte diminution des récepteurs de type I (nombre moyen par unité de surface = 658) par rapport à la quantité moyenne de récepteurs obtenue dans la granulosa des follicules témoins (nombre moyen de récepteurs de type I obtenus

par unité de surface = 854). Par contre, cette régression n'a pu être vérifiée dans la thèse des mêmes follicules comparée à celle des follicules témoins.

III.3. Discussion.

III.3.1. Traitement à l'IGF-I.

III.3.1.1. Influence sur le nombre de récepteurs aux gonadotropines.

Il fut démontré dans la littérature que le facteur de croissance IGF-I est un modulateur des actions gonadotropiques chez la ratte, la truie et la brebis (Adashi *et al.*, 1988; Campbell *et al.*, 1994). En réalité, chez le rat, l'IGF-I seul ou en synergie avec la FSH, stimule l'action de la FSH sur une augmentation des récepteurs ovariens à la LH (Holly et Wass, 1989; Tilly *et al.*, 1992). L'IGF-I détiendrait également un effet favorisant l'action de la FSH sur la production de ses propres récepteurs (Giudice, 1992).

En nous basant sur nos résultats, nous pouvons confirmer ces dires chez la brebis. L'IGF-I bénéficie donc d'un effet potentialisateur sur la production des récepteurs aux gonadotropines dans le follicule de la brebis.

III.3.1.2. Influence sur la quantité de récepteurs à l'IGF-I.

L'IGF-I jouit d'un effet potentialisateur sur la production de ses propres récepteurs ovariens, quelle que soit leur répartition folliculaire. Mais la compréhension du mode d'action de ce facteur de croissance se révèle bien plus compliquée à cause de la composition du follicule en protéines de liaison à l'IGF-I. Celles-ci semblent en effet représenter un élément majeur en ce qui concerne, chez la brebis, les modulations de l'atrésie et de la croissance folliculaires induites par l'IGF-I. La compréhension des relations existant entre les taux d'IGFs-I, ceux de leurs protéines de liaison et la quantité des récepteurs de type I retrouvés à la surface cellulaire des ovaires, reste encore très vague et mérite que certaines recherches, plus approfondies, s'attardent à ce sujet.

III.3.2. Traitement à l'EGF.

III.3.2.1. Influence sur les récepteurs des gonadotropines.

L'EGF est de toute évidence un inhibiteur de la production des récepteurs à la LH et à la FSH dans le follicule ovarien de la brebis. Nos résultats s'accordent avec ceux de certains auteurs qui préconisent que l'EGF supprime l'action stimulatrice fournie par la FSH sur la production de ses propres récepteurs (Tilly *et al.*, 1992) ainsi que sur celle des récepteurs à la LH (Endo *et al.*, 1987) dans les follicules de la ratte.

Néanmoins, dans les cellules granulosales porcines, l'EGF bénéficierait d'un rôle modulateur et le plus souvent positif sur la régulation du taux des transcrits de la FSH ainsi que sur l'expression de son site de liaison (Morbeck *et al.*, 1993).

III.3.2.2. Influence sur les récepteurs de l'IGF-I.

L'EGF possède également une action inhibitrice sur la parution de récepteurs de type I à la surface des cellules folliculaires. Nous n'avons aucun support littéraire concernant un effet direct exercé par l'EGF sur la production de ces récepteurs. Toutefois, d'après Adashi et ses collaborateurs (1988), la production de récepteurs de type I est potentialisée par la LH et la FSH. Or, d'après Tilly *et al.* (1992) et Botspoel (1993), l'EGF modifie la sensibilité des follicules aux gonadotropines. Il pourrait ainsi agir sur la diminution de la quantité de récepteurs de type I retrouvés à la surface folliculaire.

III.3.3. Influence du traitement aux facteurs de croissance sur la sécrétion stéroïdienne des follicules et comparaison avec l'évolution du nombre de récepteurs aux gonadotropines.

III.3.3.1. Traitement des follicules à l'IGF-I.

Des travaux de dosages des stéroïdes réalisés par Botspoel en 1993 sur les follicules ayant servi à nos essais sur les récepteurs, révèlent que, dans l'ensemble de la saison de reproduction, une stimulation exercée par l'IGF-I sur les follicules induit les sécrétions d'oestradiol, mais ne bénéficie d'aucun effet sur les sécrétions d'androstènedione et de progestérone. Par contre, selon Hernandez *et al.* (1988), l'IGF-I possède un effet positif sur la sécrétion en progestérone et en androstènedione en stimulant l'action de la LH, par l'intermédiaire de ses récepteurs situés dans la thèque, sur l'expression du messenger de l'enzyme 3β -hydroxystéroïde déshydrogénase. D'autres résultats présentés par Monniaux et Pisselet (1992) sont en désaccord avec ceux mis en évidence par Botspoel (1993). En effet ils plaident pour une action inductrice de l'IGF-I sur la stimulation occasionnée par la FSH, par l'intermédiaire de ses récepteurs situés dans la granulosa, sur la sécrétion de progestérone et également d'oestradiol.

Nos résultats confirment ceux rapportés dans la littérature.

III.3.3.2. Traitement des follicules à l'EGF.

Les taux des sécrétions stéroïdiennes obtenus par Botspoel (1993) sur les mêmes follicules que nous avons étudiés, révèlent que l'EGF modifie la sensibilité des follicules aux hormones gonadotropes dans le sens d'une production accrue de progestérone et d'une inhibition de l'effet stimulateur sur la sécrétion d'oestradiol. De

même, conformément aux recherches de Hsueh et ses collaborateurs (1989), l'EGF est un répresseur de l'activité aromatasase se déroulant dans la granulosa folliculaire et indispensable à la formation d'oestradiol. Nous pouvons expliquer cette répression exercée par l'EGF par sa capacité de produire une diminution des récepteurs aux gonadotropines dans la granulosa des follicules et ainsi de réduire l'activité de l'aromatase et par le fait même la synthèse d'oestradiol. La modification de la sensibilité ressentie par les follicules traités à l'EGF et remarquée par les différents auteurs constituerait dès lors une conséquence de l'action inhibitrice exercée par l'EGF sur la production de récepteurs aux gonadotropines.

IV. Conclusions.

Nos différents essais nous permettent de tirer les conclusions suivantes:

- dans la plupart des follicules, quelles que soient leur origine et leur taille, les sites de haute affinité pour la FSH et l'IGF-I se trouvent principalement au niveau des cellules de la granulosa des follicules.

- la quantité de récepteurs folliculaires à la LH, varie très fortement dans la granulosa d'après la taille et le stade de développement du follicule.

- les follicules prélevés en fin de phase folliculaire pendant la saison de reproduction de la brebis et qui entament leur croissance folliculaire terminale sont caractérisés par une apparition et une augmentation du nombre de récepteurs à la LH dans leurs cellules granulosales. Nous pouvons supposer, en nous basant sur nos résultats, que la croissance folliculaire implique également un accroissement de la quantité de récepteurs à la FSH, mais celui-ci n'est pas significatif.

- dans les mêmes follicules, la quantité de récepteurs spécifiques de l'IGF-I, reste constante par unité de surface lors de la folliculogénèse.

- nous n'avons pu démontrer une variation des sécrétions stéroïdiennes dans les follicules de tailles différentes.

- un traitement par de l'IGF-I de follicules maturés *in vitro* a un effet stimulateur sur la production des récepteurs aux gonadotropines et à l'IGF-I lui même.

- par contre, les follicules stimulés par l'EGF sont caractérisés par une diminution de leurs récepteurs. L'EGF, chez la brebis, provoque une diminution de la sensibilité des follicules aux hormones gonadotropiques en diminuant la quantité de leurs récepteurs ainsi que celle des sites de liaison de l'IGF-I.

Bibliographie.

Adashi E.Y. , Resnick C.E. , D'Ercole A.J. , Svoboda M.E. and Van Wyk J.J. , 1985. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocrine reviews*, 6, 400-420.

Adashi E.Y. , Resnick C.E. , Svoboda M.E. and Van wyk J.J. , 1986. Somatomedin-C as an amplifier of follicle-stimulating hormone action: enhanced accumulation of adenosine 3', 5'-monophosphate. *Endocrinology*, 118, 149-155.

Adashi E.Y. , Resnick C.E. , Hernandez E.R. , May J.V. , Knecht M. , Svoboda M.E. and Van Wyk J.J. , 1988. Insulin-like growth factor-I as an amplifier of follicle-stimulating hormone action studies on mechanism(s) and site(s) of action in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, 122, 1583-1591.

Adashi E.Y. , Resnick C.E. , Hernandez E.R. , Svoboda M.E. and Van Wyk J.J., 1988. Characterisation and regulation of a specific cell membrane receptor for somatomedin-C/insulin-like growth factor I in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, 122, 194-201.

Adashi E.Y. , Resnick C.E. and Rosenfeld R.G. , 1989. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II hormonal action in cultured rat granulosa cells: Mediation via type I but not type II IGF receptors. *Endocrinology*, 126, 216-222.

Adashi E.Y. , Resnick C.E. , Hernandez E.R. , Hurwitz A. and Rosenfeld R.G. , 1990. Follicle-stimulating hormone inhibits the constitutive release of insulin-like growth factor binding proteins by cultured rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology*, 126, 1305-1307.

Adashi E.Y. , Resnick C.E. , Hurwitz A. , Ricciarelli E. , Hernandez E.R. and Rosenfeld R.G. , 1991. Ovarian granulosa cell-derived insulin-like growth factor binding proteins: modulatory role of follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, 128, 754-760.

Adashi E.Y. , Resnick C.E. , Vera A. and Hernandez E.R. , 1991. *In vivo* regulation of granulosa cell type I insulin-like growth factor receptors: evidence for an inhibitory role for the putative endogenous ligand(s) of the ovarian gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocrinology*, 128, 3130-3137.

Alberts B. , Bray D. , Lewis J. , Raft M. , Roberts K. et Watson J.D. , 1990. *Biologie moléculaire de la cellule*. Edition Flammarion, Médecine-Sciences, 2^e édition.

Armstrong D.T. , Weiss T.J. , Selstam G. and Seamark R.F. , 1981. Hormonal and cellular interactions in follicular steroid biosynthesis by the sheep ovary. *Journal of reproduction and fertility*, 30, 143-154.

Bahr J. , Gardner R. , Schenk P. and Shahabi N. , 1980. Follicular steroidogenesis: effects of reproductive condition. *Biology of reproduction*, 22, 817-826.

Baird D.T. , 1977. Synthesis and secretion of steroid hormones by the ovary *in vivo*. In: *The ovary*, 2nd edition, Zuckerman S., 3, 305-357, Academic Press, New York.

Barreca A. , Minuto F. , Volpe A. , Cecchelli E. , Cella F. , Del monte P. , Artini P. and Giordano G. , 1990. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I binding protein in the follicular fluids of growth hormone treated patients. *Clinical endocrinology*, 32, 497-505.

Bister J.L. , 1980. Influence de la photopériode sur la physiologie de la reproduction de la brebis Texel. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences. FUNDP, Namur.

Bister J.L. and Paquay R. , 1983. Fluctuations in the plasma levels of the follicle-stimulating hormone during estrous cycle, anestrus, gestation and lactation in the ewe: evidence for an endogenous rhythm of FSH release. *Theriogenology*, 19, 565-582.

Bister J.L., 1991. Physiologie spéciale, tome 2, FUNDP Namur.

Bogovich K. , Richards J.S. and Reichert L.E. Jr. , 1981. Obligatory role of luteinizing hormone (LH) in the initiation of preovulatory follicular growth in the pregnant rat: specific effects of human chorionic gonadotropin and follicle-stimulating hormone on LH receptors and steroidogenesis in theca, granulosa, and luteal cells. *Endocrinology*, 109, 860-867.

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

Braden T.D. and Conn P.M. , 1992. Activin-A stimulates the synthesis of gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrinology*, 130, 2101-2105.

Bramley T.A. , Stirling D. , Swanston I.A. , Menzies G.S. and Baird D.T. , 1987. Specific binding sites for LH/chorionic gonadotrophin, low-density lipoprotein,

prolactin and FSH in homogenates of human corpus luteum. I: validation of methods. *Journal of endocrinology*, 113, 305-315.

Brännström M. , 1988. Mechanism of ovulation. Studies using the *in vitro* perfused rat ovary. Department of Physiology. University of Göteborg.

Bukovsky A. , Chen T.T. , Wimalasena J. and Caudle M.R. , 1993. Cellular localization of luteinizing hormone receptor immunoreactivity in the ovaries of immature, gonadotropin-primed and normal cycling rats. *Biology of reproduction*, 48, 1367-1382.

Campbell B.K. , McBride D. and Webb R. , 1994. Interaction between insulin and IGF-I on the stimulation of proliferation and oestradiol production by cultured ovine granulosa cells from small follicles. *Journal of reproduction and fertility*, abstract.

Carroll R.S. , Kowash P.M. , Lofgren J.A. , Schwall R.H. and Chin W.W. , 1991. *In vivo* regulation of FSH synthesis by inhibin and activin. *Endocrinology*, 129, 3299-3304.

Carson R.S. , Findlay J.K. , Burger H.G. and Trounson A.O. , 1979. Gonadotropin receptors of the ovine ovarian follicle during follicular growth and atresia. *Biology of reproduction*, 21, 75-87.

Chakravorty A. , Mahesh V.B. and Mills T.M. , 1993. Control of peptides regulating mitosis of granulosa cells in immature rat ovary by oestrogen and gonadotrophin. *Journal of reproduction and fertility*, 97, 91-100.

Chapman and Hall , 1981. Receptor regulation. *Receptors and recognition*, 13, series B. Edited by Lefkowitz R.J. Published in 1981 by Chapman and Hall.

Chari S. , Kail W. , Daume E. and Sturm G. , 1992. Isolation of luteinising hormone receptor binding inhibitor from bovine corpus luteum. *Molecular and cellular endocrinology*, 87, 115-123.

Crowder M.E. and Nett T.M. , 1984. Pituitary content of gonadotropins and receptors for gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and hypothalamic content of GnRH during the periovulatory period of the ewe. *Endocrinology*, 114, 234-239.

Currie W.D. , Medhamurthy R.J. , Cook S.J. and Rawlings N.C. , 1993. Seasonal fluctuation in diurnal rhythms of luteinizing hormone secretion in ewes during the mid-luteal phase of the oestrus cycle. *Journal of reproduction and fertility*, 97, 71-74.

Czech M.P. ,1989. Signal transmission by the insulin-like growth factors. *Cell*, 39, 235-238.

Darnell J. , Lodish H. et Baltimore D. , 1993. Biologie moléculaire de la cellule. Scientific American Books Inc. Distr. W. H. Freeman. Edition De Boeck-Wesmael. 2^e édition.

Dattatreyamurty B. , Smith R.A. , Zhang S.B. , Santa-Coloma T.A. and Reichert L.E. Jr. , 1992. The size of the mature membrane receptor for follicle-stimulating hormone is larger than that predicted from its cDNA. *Journal of molecular endocrinology*, 9, 115-121.

Davoren J.B. and Hsueh A.J.W. , 1986. Growth hormone increases ovarian levels of immunoreactive somatomedin C/insulin-like growth factor I *in vivo*. *Endocrinology*, 118, 888-890.

Davoren J.B. , Kasson B.G. , Li C.H. and Hsueh A.J.W. ,1986. Specific insulin-like growth factor (IGF) I- and II-binding sites on rat granulosa cells: relation to IGF action. *Endocrinology*, 119, 2155-2162.

Demuynck F. , 1990. Mise au point d'une technique de culture *in vitro* de follicules ovariens de brebis. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Licencié en Sciences Biologiques. FUNDP, Namur.

Denning-Kendall P.A. and Wathes D.C. , 1994. Acute effects of prostaglandin F_{2α}, luteinizing hormone, and estradiol on second messenger systems and on the secretion of oxytocin and progesterone from granulosa and early luteal cells of the ewe. *Biology of reproduction*, 50, 765-773.

Dérivaux J. et Ectors F. , 1986. Reproduction chez les animaux domestiques. Cabay, Louvain-La-Neuve.

Dorrington J.H. , Bendell J.J. , Chuma A. and Lobb D.K. , 1987. Actions of growth factors in the follicle. *J. Steroid. Biochem.* , 27, 405-411.

Driancourt M.A. and Cahill L.P. , 1984. Preovulatory follicular events in sheep. *Journal of reproduction and fertility*, 71, 205-211.

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

Driancourt M.A. , Philipon P. , Terqui M. , Molenat G. , Mirman B. , Louault C., Avdi M. , Folch J. et Cognie Y. , 1990. Possibilités de l'immunisation contre les

stéroïdes pour améliorer les performances ovulatoires et la taille de la portée des ovins et caprins. INRA Productions animales, 3, 31-37.

Dunkel L. , Tilly J.L. , Shikone T. , Nishimori K. and Hsueh A.J.W. , 1994. Follicle-stimulating hormone receptor expression in the rat ovary: increases during prepubertal development and regulation by the opposing actions of transforming growth factors b and a. *Biology of reproduction*, 50, 940-948.

Endo K. , Atlas S.J. , Rone J.D. , Zanognola V.L. , Kuo T.C. , Dharmarajan A.M. and Walloch E.E. , 1992. Epidermal Growth Factor inhibits follicular response to human chorionic gonadotropin: possible role of cell to cell communication in the response to gonadotropin. *Endocrinology*, 130(1), 186-192.

England B.G. , Webb R. and Dahmer M.K. , 1981. Follicular steroidogenesis and gonadotropin binding to ovine follicles during the estrous cycle. *Endocrinology*, 109, 881-887.

Fortune J.E. and Vincent S.E. , 1983. Progesterone inhibits the induction of aromatase activity in the rat granulosa cells *in vitro*. *Journal of reproduction and fertility*, 28, 1078-1089.

Francis G.L. , Mc Neil K.A. , Wallace J.C. , Ballard F.J. and Owens P.C. , 1989. Sheep insulin-like growth factors I and II: sequences, activities and assays. *Endocrinology*, 124, 1173-1183.

Giudice L.C. , 1992. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocrine reviews*, 13, 641-669.

Goodman R.L. and Karsch F.J. , 1981. A critique of the evidence on the importance of steroid feedback to seasonal changes in gonadotrophin secretion. *Journal of reproduction and fertility*, 30, 1-13.

Harrison L.M. , Kenny N. and Niswender G.D. , 1987. Progesterone production, LH receptors, and oxytocin secretion by ovine luteal cell types on days 6, 10 and 15 of the oestrous cycle and day 25 of pregnancy. *Journal of reproduction and fertility*, 79, 539-548.

Heckert L.L. , Daley I.J. and Griswold M.D. , 1992. Structural organization of the follicle-stimulating hormone receptor gene. *Molecular endocrinology*, 6, 70-80.

Hernandez E.R. , Resnick C.E. , Svoboda M.E. , Van Wyk J.J. , Payne D.W. and Adashi E.Y. , 1988. Somatomedin-C/insulin-like growth factor I as an enhancer of androgen biosynthesis by cultured rat ovarian cells. *Endocrinology*, 122, 1603-1612.

Hernandez E.R. , Roberts C.T. , Jr. , Hurwitz A. , Leroith D. and Adashi E.Y., 1990. Rat ovarian insulin-like growth factor II gene expression is theca-interstitial cell-exclusive: hormonal regulation and receptor distribution. *Endocrinology*, 127, 3249-3251.

Hill D.J. , 1989. Growth factors and their cellular actions. *Journal of reproduction and fertility* , 85, 723-734.

Hodgkinson S.C. , Moore L. , Napier J.R. , Davis S.R. , Bass J.J. and Gluckman P.D. , 1989. Characterisation of insulin-like growth factor binding proteins in ovine tissue fluids. *Journal of endocrinology*, 120, 429-438.

Holly J.M. and Wass J.A.H. , 1989. Insulin-like growth factors; paracrine or endocrine? New perspectives of the somatomedin hypothesis in the light of recent developments. *Journal of endocrinology*, 122, 611-618.

Hsueh A.J.W. , Bicsak T.A. , Jia X.C. , Dahl K.D. , Fauser B.C.J.M. , Galway A.B., Czekala N. , Pavlou S.N. , Papkoff H. , Keene J. and Boime I. , 1989. Granulosa cells as hormone targets: role of biologically active follicle-stimulating hormone in reproduction. *Recent progress in hormone research*, 45, 209-265.

Hua K.M. , Ord R. , Kirk S. , Li Q.J. , Hodgkinson S.C. , Spencer G.S.G. , Molan P. C. and Bass J.J. , 1993. Regulation of plasma and tissue levels of insulin-like growth factor-I by nutrition and treatment with growth hormone in sheep. *Journal of endocrinology*, 136, 217-224.

Iwai M. , Yasuda K. , Fukuoka M. , Iwai T. , Takakura K. , Taii S. , Nakanishi S. and Mori T. , 1991. Luteinizing hormone induces progesterone receptor gene expression in cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology*, 129, 1621-1627.

Jansson J.-O. , Ekberg S. , Hoath S.B. , Beamer W.G. and Frohman L.A. , 1988. Growth hormone enhances hepatic epidermal growth factor receptor concentration in mice. *J. clin. invest.*, 82, 1871-1876.

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

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

Johansson S. , Husman B. , Norstedt G. and Andersson G. , 1989. Growth hormone regulates the rodent hepatic epidermal growth factor receptor at a pretranslational level. *Journal of molecular endocrinology*, 3, 113-120.

Joseph I.B.J.K. , Currie W.D. , Ravindra J.P. , Cook S.J. and Rawlings N.C. , 1994. Oestradiol and the surge release of gonadotrophins in the ewes. *Animal reproduction science*, 34, 217-230.

Junqueira L.C. , Carneiro J. and Kelley R.O. , 1989. Basic histology. A Publishing Division of Prentice Hall. Edition Appleton & Lange. Sixth edition.

Karsch F.J. , Legan S.J. , Ryan K.D. and Foster D.L. , 1980. Importance of estradiol and progesterone in regulating LH secretion and estrous behavior during the sheep estrous cycle. *Biology of reproduction*, 23, 404-413.

Karsch F.J. , Dahl G.E. , Evans N.P. , Manning J.M. , Mayfield K.P. , Moenter S.M. and Foster D.L. , 1993. Seasonal changes in gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe: alteration in response to the negative feedback action of estradiol. *Biology of reproduction*, 49, 1377-1383.

Kamada S. , Kubota T. , Taguchi M. , Wen-Rong H. , Sakamoto S. and Aso T., 1992. Effects of insulin-like growth factor-II on proliferation and differentiation of ovarian granulosa cells. *Hormone research*, 37, 141-149.

Kaneko H. , Terada T. , Taya K. , Watanabe G. , Sasamoto S. , Hasegawa Y. and Igarashi M., 1991. Ovarian follicular dynamics and concentrations of oestradiol-17 β , progesterone, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone during the periovulatory phase of the oestrus cycle in the cow. *Reprod. fertil. dev.*, 3, 529-535.

Kikuchi M. and Ishii S. , 1992. Changes in luteinizing hormone receptors in the granulosa and theca layers of the ovarian follicle during follicular maturation in the japanese quail. *General and comparative endocrinology*, 85, 124-137.

Koea J.B. , Gallaher B.W. , Breier B.H. , Douglas R.G. , Hodgkinson J.H. , Shaw J.H.F. and Gluckman P.D. , 1992. Passive immunization against circulating insulin-like growth factor-I (IGF-I) increases protein catabolism in lambs: evidence for a physiological role for circulating IGF-I. *Journal of endocrinology*, 135, 279-284.

Legan S.J. , L'Anson H. , Fitzgerald B.P. and Fitzovich D. , 1985. Does the seasonal increase in oestradiol negative feed-back prevent luteinizing hormone

surges in anoestrus ewes by suppressing hypothalamic gonadotrophin-releasing-hormone pulse frequency ? *Biology of reproduction*, 33, 117-131.

Magoffin D.A. and Weitsman S.R. , 1993. Insulin-like growth factor-I stimulates the expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acid in ovarian theca-interstitial cells. *Biology of reproduction*, 48, 1166-1173.

Maiter D. , Underwood L.E. , Maes M. , Davenport M.L. and Ketelslegers J.M., 1988. Different effects of intermittent and continuous growth hormone (GH) administration on serum somatomedin C/insulin-like growth factor I and liver GH receptors in hypophysectomised rats. *Endocrinology*, 123, 1053-1059.

Malpoux B. , Daveau A. , Maurice F. , Gayrard V. and Thiery J.-C. , 1993. Short-day effects of melatonin on luteinizing hormone secretion in the ewe: evidence for central sites of action in the mediobasal hypothalamus. *Biology of reproduction*, 48, 752-760.

Mandiki S.N.M. , 1991. Allaitement et reprise de l'activité reproductrice chez la brebis Texel. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences. FUNDP, Namur.

Mann G.E. , Mc Neilly A.S. and Baird D.T. , 1992. Hormone production *in vivo* and *in vitro* from follicles at different stages of the oestrus cycle in the sheep. *Journal of endocrinology*, 132, 225-234.

Marshall J.C. , Dalkin A.C. , Haisenleder D.J. , Paul S.J. , Ortolano G.A. and Kelch R.P. , 1991. Gonadotropin-releasing hormone pulses: regulators of gonadotropin synthesis and ovulatory cycles. *Recent progress in hormone research*, 47, 155-187.

Martikainen H. , Tapanainen J. , Rönöberg L. , Kauppila A. , Selenius P. and Seppälä M. , 1991. Insulin-like growth factor binding protein-1 and ovarian stimulation. *Human reproduction*, 6, 1220-1222.

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

May J.V. , Buck P.A. and Schomberg D.W. , 1987. Epidermal growth factor enhances ¹²⁵I iodo-follicle-stimulating hormone binding by cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology*, 120, 2413-2420.

McNatty K.P. , Gibb M. , Dobson C. , Thurley D.C. and Findlay J.K. , 1981. Changes in the concentration of gonadotrophic and steroidal hormones in the antral fluid of ovarian follicles throughout the oestrous cycle of the sheep. *Aust. J. Biol. Sci.*, 34, 67-80.

McNatty K.P. , Hudson N. , Gibb M. , Ball K. , Fannin J. , Kieboom L. and Thurley D. C. , 1984. Effects of long-term treatment with LH on induction of cyclic ovarian activity in seasonally anoestrus ewes. *Journal of endocrinology*, 100, 67-73.

McNatty K.P. , Lun S. , Heath D.A. , Kieboom L.E. and Henderson K.M. , 1985. Influence of follicular atresia on LH-induced cAMP and steroid synthesis by bovine thecae interna. *Molecular and cellular endocrinology*, 39, 209-215.

McNeilly A.S. , Kerin J. , Swanston I.A. , Bramley T.A. and Baird D.T. , 1980. Changes in the binding of human chorionic gonadotrophin/luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin to human corpora lutea during the menstrual cycle and pregnancy. *Journal of endocrinology*, 87, 315-325.

McNeilly A.S. , 1984. Changes in FSH and the pulsatile secretion of LH during the delay in oestrus induced by treatment of ewes with bovine follicular fluid. *Journal of reproduction and fertility*, 72, 165-172.

McNeilly A.S. , Jonassen J.A. and Fraser H. M. , 1986. Suppression of follicular development after chronic LHRH immunoneutralization in the ewe. *Journal of reproduction and fertility*, 76, 481-490.

Mondschein J.S. , Smith S.A. and Hammond J.M. , 1990. Production of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) by porcine granulosa cells: identification of IGFBP-2 and -3 and regulation by hormones and growth factors. *Endocrinology*, 127, 2298-2306.

Monget P. , Monniaux D. and Durand P. , 1989. Localization, characterisation, and quantification of insulin-like growth factor-I-binding sites in the ewe ovary. *Endocrinology*, 125, 2486-2493.

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

Monget P. , Monniaux D. , Pisselet C. and Durand P. , 1993. Changes in insulin-like growth factor-I (IGF-I) , IGF-II, and their binding proteins during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Endocrinology*, 132, 1438-1446.

Monniaux D. , 1987. Short-term effects of FSH *in vitro* on granulosa cells of individual sheep follicles. *Journal of reproduction and fertility*, 79, 505-515.

Monniaux D. and de Reviere M.M. , 1989. Quantitative autoradiographic study of FSH binding sites in prepubertal ovaries of three strains of rats. *Journal of reproduction and fertility*, 85, 151-162.

Monniaux D. and Pisselet C. , 1992. Control of proliferation and differentiation of ovine granulosa cells by insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone *in vitro*. *Biology of reproduction*, 46, 109-119.

Morbeck D.E. , Flowers W.L. and Britt J.H. , 1993. Response of porcine granulosa cells isolated from primary and secondary follicles to FSH, 8-bromo-cAMP and epidermal growth factor *in vitro*. *Journal of reproduction and fertility*, 99, 577-584.

Noël B. , Bister J. L. and Paquay R., 1993. Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. *Journal of reproduction and fertility*, 99, 695-700.

Nishimoto I. , Hata Y. , Ogata E. and Kojima I. , 1987. Insulin-like growth factor II stimulates calcium influx in competent BALB/c 3T3 cells primed with epidermal growth factor. *The journal of biological chemistry*, 262, 12120-12126.

Obasiolu C.C.W. , Khan-Dawood F.S. and Dawood M.Y. , 1992. Insulin-like growth factor I receptors in human corpora lutea. *Fertility and sterility*, 57, 1235-1240.

Oxberry B.A. and Greenwald G.S. , 1982. An autoradiographic study of the binding of ¹²⁵I-labeled follicle-stimulating hormone, human chorionic gonadotropin and prolactin to the hamster ovary throughout the estrous cycle. *Biology of reproduction*, 27, 505-516.

Peluso J.J. and Hirschel M.D. , 1987. Role of gonadotropins and insulin in controlling steroidogenesis and growth of antral bovine follicles in perfusion culture. *Theriogenology*, 28, 503-512.

Peng X.R. , Hsueh A.J.W. , LaPolta P.S. , Bjersing L. and Ny T. , 1991. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology*, 129, 3200-3207.

Petäjä-Repo U.E. , Merz W.E. and Rajaniemi H.J. , 1991. Significance of the glycan moiety of the rat ovarian luteinizing hormone/chorionic gonadotropin (CG) receptor and human CG for receptor-hormone interaction. *Endocrinology*, 128, 1209-1217.

Pöhländ R. , Becker F. , Kanitz W. and Schneider F. , 1994. Influence of oestrous cycle on prostaglandin mediated down regulation of LH binding sites and proliferation of bovine luteal cells *in vitro*. *Journal of reproduction and fertility*, abstract.

Quewet B. , 1993. Effets de l'état physiologique sur l'évolution du nombre de récepteurs à la LH et à la FSH sur les cellules de la granulosa au cours d'un cycle oestral chez la brebis Suffolk. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Licencié en Sciences biologiques. FUNDP, Namur.

Radford H.M. , Panoretto B.A. , Avenell J.A. and Turnbull K.E. , 1987. Effect of mouse Epidermal Growth Factor on plasma concentrations of FSH, LH and progesterone and on oestrus, ovulation and ovulation rate in Mérino ewes. *Journal of reproduction and fertility*, 80, 383-393.

Renard D. , 1991. Influence hormonale sur l'activité de follicules ovariens de brebis en culture. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Licenciée en Sciences biologiques. FUNDP, Namur.

Rogers S.A. and Hammerman M. , 1989. Mannose 6-Phosphate potentiates insulin-like growth factor II-stimulated inositol triphosphate production in proximal tubular basolateral membranes. *The journal of biological chemistry*, 264, 4273-4276.

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

Ruckebusch Y., Phaneuf L.P. and Dunlop R., 1991. Physiology of small and large animals. BC Decker, Inc. Philadelphia Hamilton.

Rutanen E-M. and Pekonen F. , 1990. Insuline-like growth factors and their binding proteins. *Acta endocrinologica*, 123, 7-13.

Rutanen E-M. , Pekonen F. and Mäkinen T. , 1988. Soluble 34K binding protein inhibits the binding of insulin-like growth factor I to its cell receptors in human secretory phase endometrium: evidence for autocrine/paracrine regulation of growth factor action. *Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 66, 173-180.

Samaras S.E. , Hagen D.R. , Bryan K.A. , Mondschein J.S. , Canning S.F. and Hammond J.M. , 1994. Effects of growth hormone and gonadotropin on the insulin-like growth factor system in the porcine ovary. *Biology of reproduction*, 50, 178-186.

Sara V.R. and Hall K. , 1990. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiological reviews*, 70, 591-614.

Schneyer A.L. , Sluss P.M. , Whitcomb R.W. , Martin K.A. , Sprengel R. and Crowley W.F. Jr. , 1991. Precursors of α -inhibin modulate follicle-stimulating hormone receptor binding and biological activity. *Endocrinology*, 129, 1987-1999.

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

Sluss P.M. and Schneyer A.L. , 1992. Low molecular weight follicle-stimulating hormone receptor binding inhibitor in sera from premature ovarian failure patients. *Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 74, 1242-1246.

Spicer L.J. , Hanrahan J.P. , Zavy M.T. and Enright W.J. , 1993. Relationship between ovulation rate and concentrations of insulin-like growth factor-1 in plasma during the oestrous cycle in various genotypes of sheep. *Journal of reproduction and fertility*, 97, 403-409.

Talavera F. and Menon K.M.J. , 1991. Studies on rat luteal cell response to insulin-like growth factor I (IGF-I): Identification of a specific cell membrane receptor for IGF-I in the luteinized rat ovary. *Endocrinology*, 129, 1340-1346.

Teissier M-P. , Monget P. , Monniaux D. and Durand P. , 1994. Changes in insulin-like growth factor-II/Mannose-6-Phosphate receptor during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Biology of reproduction* , 50, 111-119.

Terqui M. , Berthelot F. and Driancourt M.A. , 1988. Morphological and functional features of ovine follicles in perfusion with pulsatile hormone delivery. *Reprod. Nutr. Dévelop.* , 28, 1093-1104.

Thibault C. et Levasseur M.-C. , 1991. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Editions Ellipses, INRA.

Thimonier J. , 1979. Hormonal control of oestrus cycle in the ewe (a review). *Livestock production science*, 6, 39-50.

Tilly J.L. , Aihara T. , Nishimori K. , Jia X.C. , Billig H. , Kowalski K.I. , Perlas E.A. and Hsueh A.J.W. , 1992. Expression of recombinant human follicle-stimulating hormone receptor: species-specific ligand binding, signal transduction, and identification of multiple ovarian messenger ribonucleic acid transcripts. *Endocrinology*, 131, 799-806.

Tilly J.L. , LaPolt P.S. and Hsueh A.J.W. , 1992. Hormonal regulation of follicle-stimulating hormone receptor messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, 130, 1296-1302.

Tsonis C.G. and Sharpe R.M. , 1986. Dual gonadal control of follicle-stimulating hormone. *Nature*, 321, 724-725.

Uilenbroek J.Th.J. and Richards J.S. , 1979. Ovarian follicular development during the rat estrous cycle: gonadotropin receptors and follicular responsiveness. *Biology of reproduction*, 20, 1159-1165.

Underwood L.E. , Clemmons D.R. , Maes M. , D'Ercole A.J. , Ketelslegen J.-M., 1986. Regulation of somatomedin C/Insulin-like growth factor-I by nutrients. *Hormone research*, 24, 166-176.

Veldhuis J.D. and Furlanetto R.W. with the technical assistance of Juchter D., Garmay J. and veldhuis P. , 1985. Trophic actions of human somatomedin C/insulin-like growth factor I on ovarian cells. *Endocrinology*, 116, 1235-1242.

Wang X.N. and Greenwald G.S. , 1993. Synergistic effects of steroids with FSH on folliculogenesis, steroidogenesis and FSH- and hCG-receptors in hypophysectomized mice. *Journal of reproduction and fertility*, 99, 403-413.

Wang X.N. and Greenwald G.S. , 1993. Hypophysectomy of the cyclic mouse. II. Effects of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone on folliculogenesis, FSH and human chorionic gonadotropin receptors, and steroidogenesis. *Biology of reproduction*, 48, 595-605.

Webb R. and England B.G. , 1982. Relationship between LH receptor concentrations in thecal and granulosa cells *in vivo* and *in vitro* steroid secretion by ovine follicles during the preovulatory period. *Journal of reproduction and fertility*, 66, 169-180.

Webb R. and Gauld I.K. , 1984. Final maturation of the preovulatory follicle in the ewe. *Période préovulatoire*. Ed. Jarat-Baraux 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. *Journal of reproduction and fertility*, 87, 243-255.

Wheater P.R. , Burkitt H.G. et Daniels V.G. , 1987. Longman Group Limited. Edition MEDSI/McGraw-Hill. 2^e édition.

Widnell C. and Pfinninger K.H. , 1990. Hormone action. In: *Essential cell biology*, chapter 9, 194-204. International Edition Williams & Wilkins.

Williams R.H. , 1972. *Traité d'endocrinologie*, Edition Flammarion Med. Sci., Paris.

Yamamoto K. , Altschuler D. , Wood E. , Horlick K. , Jacobs S. and Lapetina E. G. , 1992. Association of phosphorylated insulin-like growth factor-I receptor with the SH₂ domains of phosphatidylinositol 3-kinase p85. *The journal of biological chemistry*, 267, 11337-11343.

Yang K.P.P. , Gray K.N. , Jardine J.H. , Yen H.L.N. , Samaan N.A. and Ward D.N. , 1984. LH-RBI : an inhibitor of *in vitro* luteinizing hormone binding to ovarian receptors and LH-stimulated progesterone synthesis by ovary. *Reproductive physiology*, 3, 61-77.

Yarney T.A. and Sairam M.R. , 1991. Differences in properties of the sheep testicular LH and FSH receptors. *Journal of molecular endocrinology*, 6, 291-297.

Yen S.S.C. and Jaffe R.B. , 1991. *Reproductive endocrinology*. Third edition. W.B. Saunders company.

Zhou J. and Bondy C. , 1993. Anatomy of the human ovarian insulin-like growth factor system. *Biology of reproduction*, 48, 467-482.