

2M11.2749.10

Université de Montréal

**La sécrétion de l'inhibine dimère par les cellules de
granulosa bovine antrales et murales *in vitro***

par

Mohamed Lotfi BOUDJEMAA

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.)
en biomédecine vétérinaire

Août 1998

© Mohamed Lotfi BOUDJEMAÂ 1998



01.942.1112

SF
607
U54
1999
V.008

Ministry of Education

La section de l'éducation est honorée par les contributions de
gratuites données aux écoles et aux collèges de

Ministry of Education

Ministry of Education

Ministry of Education

1999



Ministry of Education

Faculté des études supérieures

Ce mémoire de maîtrise est intitulé:

**La sécrétion de l'inhibine dimère par les cellules de
granulosa bovine antrales et murales *in vitro***

Présenté par:

Mohamed Lotfi BOUDJEMAÂ

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Alan K. Goff

Dr Denis Vaillancourt

Dr Christopher A. Price

Mémoire accepté le:.....08.01.1999

Sommaire

Initialement on pensait que le développement folliculaire était régularisé principalement par les gonadotrophines FSH et LH. Toutefois, plusieurs évidences expérimentaux démontrent que les facteurs de croissance et d'autres hormones protéiniques produites par les cellules folliculaires sous l'effet des gonadotrophines modulent l'action des gonadotrophines sur la différenciation des cellules folliculaires. Parmi ces hormones protéiniques et ces facteurs de croissance synthétisés par les cellules folliculaires, plus particulièrement par les cellules de la *granulosa in vivo* et *in vitro*, nous avons décidé d'analyser les mécanismes de sécrétion *in vitro* des inhibines par les cellules de la *granulosa*.

Les inhibines sont des glycoprotéines hétérodimères qui font partie de la grande famille des facteurs de croissance transformant- β (TGF- β) qui sont impliquées dans la régulation de la prolifération et de la différenciation de nombreux types cellulaires. La forme d'inhibine qui est dotée d'une activité biologique possède une structure dimère, composée d'une sous-unité α et d'une sous-unité β liées par des ponts disulfures. Les inhibines agissent sélectivement en supprimant la sécrétion de l'hormone de stimulation folliculaire (FSH) par les cellules de la glande pituitaire sans affecter la libération de la (LH).

Le but de cette étude était donc de tester les hypothèses qu'il existerait une différence entre les deux types de cellules de la *granulosa* dans un même follicule (i.e. antrale et murale) et entre les cellules de *granulosa* des petits et gros follicules sur la sécrétion de l'inhibine monomère et dimère *in vitro*. et que l'augmentations de la sécrétion, la quantité et les formes d'inhibine dimère seraient dépendantes des doses de FSH ajoutées au milieu de culture. Afin de vérifier ces hypothèses, la sécrétion des inhibines monomère et dimère a été analysée dans différentes types de milieu de culture.

Dans la première expérience des sous-populations de cellule de la *granulosa* (i.e. antrales et murales) sont utilisées. Les cellules ont été récoltées des follicules ovariennes de génisses prépubaires traitées avec de la gonadotrophine chorionique équine (eCG). Les cellules de la *granulosa* ont été maintenues pendant 4 jours dans un milieu de culture avec 0, 0.5, 1 et 10ng/ml de FSH. Les concentrations de l'inhibine dimère ont été déterminées par la méthode d'ELISA et par le RIA pour la sous-unité α monomère

d'inhibine dans un milieu de culture récolté à chaque 24h. La sécrétion de l'inhibine (i.e. monomère et dimère) par les cellules de la granulosa variait avec le temps de culture ($P < 0.001$) et le type cellulaire, les cellules antrales secrètent plus d'inhibine monomère ou dimère que les murales ($P < 0.05$). Cette sécrétion chute de 90% ($P < 0.001$) entre 24 et 48h de culture dans le cas de l'inhibine- α et de 70-80% ($P < 0.001$) pour l'inhibine dimère.

Le traitement des cellules avec différentes doses de FSH n'avait aucun effet sur la sécrétion de l'inhibine dimère par les cellules antrales et murales ($P > 0.05$) en culture. Cependant, on a remarqué une augmentation de la sécrétion de l'inhibine- α par les cellules de granulosa antrales entre 24 et 48h de culture sous l'effet de la FSH ($P < 0.05$). Toutefois, cet effet disparaît entre 48 et 72h. On ne remarque aucun effet du traitement sur la sécrétion de l'inhibine- α par les cellules de la granulosa murales ($P > 0.05$).

La deuxième expérience consistait à mettre en culture des cellules de la granulosa récoltées des petits follicules ($< 8\text{mm}$) et des grands follicules ($\geq 8\text{mm}$) provenant de vaches normalement cyclées. Les cellules ont été maintenues en culture pendant 8 jours pour les petits follicules et 6 jours pour les grands follicules avec 0, 1, 10 ou 100ng de FSH. Le changement du milieu de culture se faisait à chaque 48h.

Les résultats démontrent que la sécrétion de l'inhibine dimère par les cellules de la granulosa des petits et grands follicules, augmente durant toute la période de culture ($P < 0.001$). Le traitement des cellules avec les différentes doses de FSH n'avait aucun effet sur la sécrétion des inhibines par les deux types de cellules de granulosa ($P > 0.05$).

La troisième expérience avait pour but de définir les différentes formes d'inhibine dimères sécrétées par les cellules de la granulosa dans le milieu de culture, en comparaison avec celles retrouvées dans le liquide folliculaire. Les résultats obtenus, démontrent que les formes les plus abondantes détectées dans le milieu de culture étaient 48 et 58kDa avec une autre bande de 77 kDa. D'autres bandes de faible intensité avaient un poids moléculaire de 32 et 39 kDa. Dans le liquide folliculaire immunoprécipité, les formes obtenues étaient de 24, 32, 39, 48, 58, 68, 77, et > 100 kDa.

L'ensemble des résultats des ces trois expériences démontrent que les cellules de la granulosa (antrales et murales) en culture cellulaire avaient un profil bien défini sur la sécrétion des inhibines et une réponse au traitement à la FSH variable selon le type cellulaire (antrale versus murale) et pendant une certaine période de culture entre (24 et 48h). La sécrétion des inhibines par les cellules de granulosa récoltées des petits et gros follicules augmente considérablement durant la période d'incubation. La FSH n'avait aucun effet sur le niveau des inhibines sécrété par les cellules de la granulosa. Les cellules de la granulosa *in vitro* sécrètent beaucoup plus les formes d'inhibine de 58 et 48kDa que la forme mature de 32kDa.

En conclusion, on a remarqué que les cellules de la granulosa antrale et murale, ainsi que celles récoltées des petits et gros follicules avaient un profil de sécrétion bien défini pour chaque types de cellules, donc la première partie de l'hypothèse à été vérifiée. En ce qui concerne la deuxième partie de l'hypothèse, on a remarqué aucun effet significatif de la FSH sur la concentration, la quantité ou les formes d'inhibines sécrétées par les cellules de la granulosa *in vitro*. Ces résultats nous amènes a rejeté la deuxième partie de l'hypothèse.

Table des matières

Sommaire	iii
Table des matières	vi
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Remerciments	xii
Dédicace.....	xiii
1.INTRODUCTION	1
2. REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	5
2.1. LA FONCTION OVARIENNE.....	5
2.2. FOLLICULOGENÈSE.....	5
2.2.1. Croissance folliculaire.....	7
2.2.1.1. Le recrutement.....	8
2.2.1.2. La sélection	10
2.2.1.3. La dominance folliculaire.....	11
2.3. Atrésie folliculaire:.....	13
2.3.1. Apoptose.....	15
2.4. RÉGULATION DE LA CROISSANCE FOLLICULAIRE	17
2.4.1. Le contrôle endocrinien de la Folliculogenèse.....	17
2.4.1.1. Les stéroïdes.....	18
2.4.1.1.1.Les précurseurs.....	20

2.4.1.1.2. Les enzymes stéroïdiens	20
2.4.1.1.2.1. La P450 _{scc}	21
2.4.1.1.2.2. La 3 β -HSD.....	21
2.4.1.1.2.3. La P450 _{17α}	22
2.4.1.1.2.4 La P450 _{arom}	22
2.4.1.2. Les Facteurs de croissances.....	23
2.4.1.2.1. Insuline et la somatomédine (IGFs)	23
2.4.1.2.2. Famille du facteur de croissance epidermal (EGF)	30
2.4.1.2.3. Famille du facteur de croissance fibroblastique (FGF).....	30
2.4.1.2.4. Famille du facteur de croissancetransformant- β (TGF- β)	31
2.4.1.3. Famille des inhibines et activines.....	34
2.4.1.3.1. Les inhibines	34
2.4.1.3.1.1. Synthèse et structure de l'inhibine	34
2.4.1.3.1.1.1. Structure des gènes.....	36
2.4.1.3.1.1.2. Isolement et caractérisation des formes d'inhibine.....	36
2.4.1.3.1.1.3. Les méthodes de détermination des inhibines	38
2.4.1.3.1.1.3.1. Essai radioimmunologique (RIA)	38
2.4.1.3.1.1.3.2. Dosage biologique	40
2.4.1.3.1.1.4 Biosynthèse des formes d'inhibine.....	40
2.4.1.3.1.1.5 Les facteurs de régulation de la production de l'inhibine.....	42
2.4.1.3.1.1.6 Rôle de l'inhibine ovarienne.....	44

2.4.1.4 Les activines	47
2.4.1.5 Les Protéines de liaison des inhibines et des activines.....	48
2.4.1.5.1 L' α_2 macroglobuline	48
2.4.1.5.2 Les follistatines	49
2.5 Problématique, hypothèse, objectif et cheminement du travail expérimental.....	50
2.5.1 Problématique.....	50
2.5.2 Hypothèses et objectif.....	50
2.5.4 Cheminement du travail expérimental	50
3. Article: Effect of FSH cell localization on dimeric inhibin secretion from bovine granulosa cells in culture.....	52
3.1 Abstract.....	53
3.2 Introduction.....	53
3.3 Materials and Methods.....	55
3.4 Results.....	59
3.5 Discussion	60
3.6 References	64
4. Conclusion générale.....	80
5. Bibliographie.....	82

Liste des figures

REVUE DE LITTÉRATURE

Figure 1. Représentation schématique de la folliculogénèse ovarienne	9
Figure 2. Représentation schématique de la stéroïdogénèse ovarienne.....	19
Figure 3. Représentation schématique des structures de l'IGF, de l'insuline, des récepteurs à IGF, à l'insuline, aux IGFBP et les protéases.....	25
Figure 4. Représentation schématique du système de rétrocontrôle intrafolliculaire positif et négatif chez les ruminants.....	29
Figure 5. Représentation schématique de la structure des différentes formes d'inhibine et activines.	35
Figure 6. Résumé des rôles autocrine/paracrine et des actions de rétrocontrôle endocrinien des inhibines activines et follisatatine.....	46

ARTICLE

Figure 1. Effect of time of culture on inhibin- α (A) and dimeric inhibin (B) secretion.	70
Figure 2. Effect of FSH on the secretion of inhibin- α	72
Figure 3. Effect of time of culture on the secretion of dimeric inhibin.....	74
Figure 4. Effect of FSH on dimeric inhibin secretion from cells.	76
Figure 5. Representative Western immunoblots of inhibin.....	78

Liste des abréviations

17 β -HSD	17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase
3 β -HSD	3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase
ADN ou DNA	Acide désoxyribonucleique
AMP	Adenosine monophosphate
AMPc ou cAMP	adenosine monophosphate-3', 5' Cyclique
ARN ou RNA	Acide ribonucléique
coll.	Collaborateurs
CRE	Octamère répondant à l'AMPc
Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Calcium/Magnesium
DHEA	la déhydro-épiandrostérone
DHT	Dihydrotestostérone
eCG	Gonadotrophine chorionique équine
ECM	Compartiment de la matrice extracellulaire
EGF	Facteur de croissance epidermique
ELISA	Dosage par la méthode ELISA
FCF	Sérum de veau foetal
FGF	Facteur de croissance fibroblastique
FSH	Hormone folliculo-stimulante
FST ou FSP	Follistatine
GnRH	Hormone gonadolibérine

GMPc	Cyclic Guanine monophosphate
hCG	Gonadotrophine chorionique humaine
HS	Sulfate d'héparine
IGF	Facteur de croissance analogue à l'insuline (Somatomédine)
IGFBP	Protéine liante de l'insuline comme facteur de croissance (Insuline like growth factor binding protein)
IRMA	Dosage par la méthode immunoradiométrique
LH	Hormone lutéinisante
MIS	Hormone antimüllérienne
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
P450	Enzyme cytochrome P450
P450 _{17α}	P450 17 α -hydroxylase
P450 _{arom}	P450 aromatasase
P450 _{scc}	Enzyme cytochrome P450 coupant la chaîne latérale
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
RIA	Dosage radioimmunologique
StAR	protéine de régulation rapide de la stéroïdogénèse
TGF- β	Facteur de croissance transformant- β
vgr-1 ou BMP-6	Bone Morphogenetic Protein-6

Remerciements

Je voudrais en premier lieu remercier Dieu le tout puissant de me permettre d'être à chaque jour en contact avec les merveilles et les splendeurs de sa création. J'espère demeurer au service de sa volante tout au long de ma vie.

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, le docteur **C.A. Price** pour avoir accepté de diriger mes travaux de recherche, pour sa grande disponibilité et son dévouement.

Je remercie particulièrement le directeur du Centre de Recherche en Reproduction Animale (CRRA) Docteur **Bruce Murphy** pour son amitié, pour sa disponibilité et la disponibilité de sa bibliothèque.

Je tiens à remercier également les professeurs **Docteur Jaques Lussier** et **Paul Carrière** pour leur aide si fructueuse dans le domaine de la science et pour leur disponibilité en tout temps.

Mes remerciements les plus chaleureuses vont aux secrétaires du centre de recherche **Madame Micheline Sicotte** et **Madame Hélène Boucher Rhéaume** pour leur amitié et leur sympathie ainsi pour le travail de secrétariat qui a été toujours accompli avec beaucoup d'amour et de sincérité.

Je tiens aussi à remercier **Madame Mira Dobias**, **Docteur Odette Hélie** et **Monsieur Luc Moquin** pour leur sympathie leur aide et leur sens de l'humour ont été très appréciés.

Mes remerciements vont également à la grande famille du Centre de Recherche en Reproduction Animale Professeur, Technicienne de laboratoire et Étudiants pour leur esprit collective leur grande sympathie et disponibilité.

Je tiens à profiter de cette occasion pour remercier nos collaborateurs Docteur **Louis Guilbault** et le Docteur **Paul Rouillier** pour leur aide dans la culture cellulaire et dans l'étude statistique des résultats

Mes profondes remerciements vont à **mes parents, mes frères et mes sœurs** pour leur soutien moral et financier leur encouragement sans oublier leur amour.

Dédicace

Je dédie ce mémoire à toute ma famille, mes amie (es), mes neveux, mes nièces
et mes amis ainsi à une amie très chère Judith Gagnon.

1. INTRODUCTION

Le processus du développement folliculaire ovarien est long et complexe. Il consiste en une prolifération et une différenciation des éléments de deux types cellulaires soit germinale et somatique. Cet agenda explosif est sous le contrôle des principaux facteurs habituels, soit les gonadotrophines pituitaires et les stéroïdes ovariens. D'un autre côté, il est devenu plus apparent que plusieurs phénomènes importants qui concernent la physiologie ovarienne ne sont pas considérés par les principales conventions endocriniennes. Une attention particulière doit être portée sur le processus de sélection folliculaire, par lequel un nombre prédéterminé de follicules sont sélectionnés après que tous les follicules auraient subi une stimulation identique aux gonadotrophines, recrutés et finalement ovulent. Toutefois, ces observations suggèrent que la régulation de la fonction ovarienne est sous le contrôle de d'autres groupes de type modulateur ovarien, connu sous un terme générique ou général de "Régulateurs intraovariens". On pense qu'à un moment bien précis ou synchronisé, il y aurait une expression hautement régionalisée de ces dérivés locaux, souvent peptidergiques, qui comptent parmi les facteurs qui joueraient un rôle au cours de la fonction ovarienne, qui dans quelques situations (i.e. rôles endocrinien et exocrinien) qui remettent en question les explications conventionnelles dans certains cas.

Les gonadotrophines, l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone de stimulation folliculaire (FSH) jouent un rôle majeur dans la régulation de la reproduction des mammifères dont les principales fonctions sont; la stimulation de la gamétogenèse et de la stéroïdogénèse. La stimulation de la relâche de la LH et la FSH de la glande pituitaire antérieure est régulée par l'hormone hypothalamique, la gonadolibérine (GnRH). Toutefois, plusieurs classes de régulateurs intraovariens sont connus, bien qu'une attention particulière ait été portée sur les hormones protéiques. On sait que les gonades produisent des substances ayant une rétroaction par laquelle ils influencent la sécrétion des gonadotrophines, soit par voie directe au niveau de la glande pituitaire ou bien en modulant la production de la GnRH hypothalamique. Certaines de ces hormones protéiques ont été caractérisées comme étant des modulateurs spécifiques de la synthèse et de la sécrétion de la FSH dont deux hormones appartenant à la famille des facteurs de croissance transformant-béta (TGF- β) les inhibines et les activines (revue par Ying, 1987, 1988; Findlay, 1993; Knight, 1996).

L'inhibine est une glycoprotéine qui supprime préférentiellement la sécrétion de la FSH au niveau de la glande pituitaire. L'inhibine a été isolée, du liquide folliculaire de la

truite sous forme d'une molécule hétérodimérique constituée de deux sous-unités différentes liées entre elles par des ponts disulfure. La sous-unité la plus grosse a été nommée α et la plus petite, β . Deux formes d'inhibine désignées par A et B ont été isolées, elles diffèrent par leurs séquences d'acides aminés au niveau de la sous-unité β : l'inhibine A comprend les sous-unités α - β_A et l'inhibine B, les sous-unités α - β_B (de Kretser et Robertson, 1989).

Le respect de la vie animale ainsi que les coûts élevés rattachée aux études *in vivo* ont amené les chercheurs à favoriser l'approche *in vitro* plutôt qu'*in vivo* dans l'investigation du mode de sécrétion de ces hormones protéiques, plus spécifiquement des inhibines par les cellules de la granulosa en culture. Malgré le nombre plus ou moins croissant d'études *in vitro* sur ce sujet, le rôle de certaines formes d'inhibine comme inhibiteurs de la sécrétion de la FSH au niveau de la glande pituitaire, ainsi que le moment et le mode de sécrétion des différentes formes durant le cycle œstral chez la vache restent inconnus. Il existe une cause fondamentale à cela. Les différentes méthodes de culture des cellules de la granulosa que l'on utilise jusqu'à maintenant pour l'étude du mode de sécrétion d'inhibine par les cellules de la granulosa bovine, ne permettent pas le maintien des caractéristiques physiologiques des cellules de granulosa *in vivo* exemple; la production d'œstradiol *in vitro* en réponse à la FSH. L'activité aromatasase des cellules de la granulosa est le plus important marqueur de la différenciation des follicules ovariens.

Différents travaux ont été réalisés *in vivo*, démontrant ainsi l'effet de la FSH comme régulateur de la sécrétion d'inhibine par les cellules de la granulosa chez la rate (Fahy et coll., 1995), la brebis (Campbell et coll., 1991) et la vache (Taya et coll., 1991). Parmi ces expériences, la suroovulation chez la vache par la FSH résulte en une augmentation relative de la sécrétion des inhibines par les cellules de la granulosa, en réponse à une stimulation exogène de FSH. D'autres travaux ont supportent cette observation en contrôlant la sécrétion des inhibines par la FSH suite à une immunisation active ou passive contre soit la sous-unité α des inhibines ou soit contre la molécule native. Cela résultait en augmentation accrue de la concentration de la FSH suivie d'une hausse du nombre des follicules ovulatoires. D'autres expériences ont démontré *in vivo* l'existence de différentes formes d'inhibine dans le liquide folliculaire au cours du développement du follicule dominant et atérique chez différentes espèces animales. Toutefois, quelques travaux ont été accomplis *in vitro* démontraient ainsi qu'une augmentation de la concentration de la sous-unité α libre sécrétée par les cellules de la granulosa suite à un traitement à la FSH, en présence ou en absence de sérum de

veau fœtal (FCS) pendant une très courte période d'incubation. Jusqu'à présent les problématiques à l'étude de la sécrétion des inhibines *in vitro*, c'est que les cellules de la granulosa bovine en culture se lutéinisent spontanément et perdent leur capacité à synthétiser l'œstradiol, qui est une composante clé de la différenciation et du développement des cellules de la granulosa *in vivo* et *in vitro*. Chez la femme et la vache en particulier, les cellules de la granulosa *in vivo* synthétisent et sécrètent dans le liquide folliculaire une grande quantité d'inhibine- α libre dépourvue d'activité biologique par rapport à la forme dimère (α et β) qui est biologiquement active. Ceci engendre une mauvaise lecture des résultats lors du dosage par ELISA l'inhibine dimère dimères qui se traduit par la réaction croisée de la sous-unité α libre et celle du dimère avec l'anticorps. En nous inspirant des différents travaux réalisés *in vivo* et les différents progrès en ce qui attrait aux cultures cellulaires *in vitro* et aux différents types de dosage des inhibines *in vivo* et *in vitro* développés à nos jours, nous avons tracé l'objectif général de notre étude.

L'objectif général est de mettre au point un système de culture cellulaire permettant de maintenir les cellules de la granulosa dans un milieu similaire au milieu biologique afin de permettre l'induction de la production de l'œstradiol en réponse à la FSH par les cellules de la granulosa indifférenciées des petits follicules et maintenir la production de l'œstradiol par les cellules de la granulosa différenciées issues des grands follicules. La production de l'œstradiol par les cellules de la granulosa démontre que les cellules seraient saines et prolifèrent bien dans ce milieu sans aucun aspect de lutéinisation apparente. La prochaine étape sera de vérifier l'effet de la FSH sur la sécrétion des inhibines par les cellules de la granulosa *in vitro*. Pour cela les cellules seront traitées avec différentes doses de FSH puis déterminer la concentration de l'inhibine dimère sécrétée par les cellules de la granulosa *in vitro* en comparaison avec des cellules non traitées. Des travaux réalisés *in vivo* démontrent l'existence de deux types de cellules de la granulosa et qui sont fonctionnellement différentes selon leur position dans le follicule: les cellules de la granulosa antrales qui sont proches de l'antrum et les cellules de la granulosa murales situées près de la lame basale séparant la thèque interne des cellules de la granulosa. Des résultats obtenus des études *in vitro* démontrent que sous l'effet de la FSH, les cellules antrales de la granulosa produisent beaucoup plus d'œstradiol que les cellules murales de la granulosa. D'autres résultats, issus des études réalisées *in vitro* sur les cellules de la granulosa de la brebis pendant une période de 8 jours, démontrent que la sécrétion de l'œstradiol et la sous-unité alpha

d'inhibine sont beaucoup plus dépendantes de la durée de culture que du traitement par la FSH.

Notre première expérience, consiste à déterminer l'effet de traitement à la FSH sur la sécrétion des inhibines (libres et dimère) par les sous-populations de cellule de la granulosa *in vitro*, en utilisant un procédé de culture cellulaire mis au point par Saumande (1991) et modifié par Rouiller et coll. (1996). La deuxième expérience consiste à vérifier l'action des différentes doses de la FSH sur la sécrétion de l'inhibine par les cellules de la granulosa non différenciées et différenciées (i.e. petits follicules et grands follicules) récoltées des ovaires de vaches normalement cyclées. Pour réaliser cette expérience, nous utilisons le principe de culture des cellules de la granulosa développé par Campbell et coll. (1996). La troisième expérience, consiste à déterminer les formes d'inhibine sécrétées par les cellules de la granulosa en culture en présence ou en absence de la FSH.

2. REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1. LA FONCTION OVARIENNE

L'ovaire est le siège de l'activité folliculaire, il joue un rôle très important dans le contrôle de la fertilité et le maintien des réserves ovocytaires chez la femelle (revue par Driancourt et coll., 1991). La première fonction ovarienne est d'assurer la croissance régulière des follicules dont quelques-uns arriveront au stade ovulatoire pour enfin libérer un ovocyte mature. L'autre rôle très important joué par l'ovaire est d'assurer la bonne préparation de l'utérus à recevoir l'embryon pour son développement. Les deux organites de l'ovaire (i.e. follicules et corps jaune) produisent des facteurs impliqués dans le contrôle de la croissance folliculaire, la régulation des fonctions utérines et l'expression des caractères sexuels secondaires chez la femelle.

L'ovocyte est enveloppé par un follicule qui le maintient en arrêt méiotique tout en lui procurant un environnement nutritionnel essentiel à son développement et à sa maturation (Wise et Maurer, 1994; Wise et coll., 1994). Le contact étroit entre l'ovocyte et les cellules de la paroi folliculaire est assuré par les prolongations des cellules de granulosa qui permettent le couplage ionique et le passage des molécules plus petites que 1kD (Szöllösi, 1991). Les mécanismes qui maintiennent l'ovocyte en arrêt méiotique ne sont pas encore complètement élucidés, mais on reconnaît que les cellules de la paroi folliculaire (i.e. granulosa et thèque) assurent grandement cette inhibition (Charbonneau et Sirard, 1994; Richard et Sirard, 1996 a et b).

2.2. FOLLICULOGENÈSE

La folliculogenèse se définit comme étant l'ensemble des différentes étapes de la croissance folliculaire, depuis le petit follicule préantral jusqu'à l'ovulation du follicule dominant sélectionné ou bien sa régression par le phénomène d'atrésie.

Chez les différents espèces, les follicules ovariens sont formés pendant la vie fœtale. Chez la vache, Les follicules primordiaux apparaissent vers le 90^{ième} jour, les follicules primaires vers le 140^{ième} jour et les follicules secondaires apparaissent vers le 230^{ième} jour de gestation (Rüsse, 1983). Chez la vache, le nombre de follicules à la naissance est estimé entre 40,000 et 800,000 (Erickson, 1966). Ce nombre décroît au cours de la vie animale suite à une dégénérescence des follicules par le phénomène d'atrésie (Koering, 1969; Pederson, 1970). La formation du follicule débute au moment où quelques cellules indifférenciées de la granulosa entourent l'ovocyte

donnant ce qu'on appelle les follicules primordiaux (Rajakoski, 1960; Anderson, 1979; Matton et coll., 1981; Driancourt et coll., 1991). Les follicules primordiaux se transforment en follicules intermédiaires. Les cellules de la granulosa qui entourent l'ovocyte deviennent cuboïdales pour donner naissance aux follicules primaires. Les follicules primordiaux et les follicules primaires forment la réserve de follicules ovariens et ils représentent la majorité de la population folliculaire (> 95%). La mitose des cellules de la granulosa amène à la formation de deux à trois couches de cellules, ce qui se traduit par le passage du follicule primaire en follicule secondaire. À ce moment, la thèque interne s'ébauche et la zone pellucide entourant l'ovocyte se forme à partir des protéines sécrétées par ce dernier. Cette dernière (la thèque interne) est constituée par des cellules stéroïdogènes et des capillaires (plexus interne). La thèque interne et les couches de cellules de la granulosa sont séparées par une membrane basale. La thèque externe est formée par les cellules du tissu conjonctif, qui comprend les fibroblastes, les cellules nerveuses et les capillaires, qui donnent une anastomose avec le système capillaire stromal (plexus externe). La division des cellules de la granulosa se poursuit et amène la formation de petites cavités entre les cellules de la couche granuleuse. Les cavités vont éventuellement se fusionner pour former l'antra folliculaire, c'est à cet instant que le follicule secondaire deviendra un follicule antral ou follicule de Degraaf (Spicer et Echtenkamp, 1986).

En résumé, le follicule antral est composé d'une thèque externe, d'une thèque interne séparée des cellules de la granulosa par une lame basale et d'un ovocyte et de son noyau ou vésicule germinative couronné par un amas de cellules de la granulosa nommé cumulus baignant dans la cavité folliculaire appelée l'antra.

L'antra est rempli d'un liquide dont la composition est proche de celle du plasma (Fortune et Hansel, 1985). Des évidences morphologiques et chimiques donnent à croire que la plupart des molécules à l'exception des grosses molécules circulent librement à travers la paroi folliculaire selon un gradient de concentration (Gosden et coll., 1988). La concentration de certaines molécules du liquide folliculaire varie dramatiquement en fonction du diamètre et du niveau d'atrésie folliculaire (Wise, 1987; Bomsel-Helmreich et coll., 1979; Wise et Maurer, 1994; Monniaux et coll., 1997). Cette variation du liquide folliculaire porte essentiellement sur les stéroïdes (Ireland et Roche, 1983 a, b; Echtenkamp et coll., 1994; Bodensteiner et coll., 1996; Ginther et coll., 1997), l'inhibine (Ireland et coll., 1994; Guilbault et coll., 1993; Sunderland et coll., 1996; Guthrie et coll., 1997), les protéines de liaison (i.e. IGFBPs et les glycosaminoglycans) (Monget et coll., 1993; Schuller et coll., 1993; Wise et Maurer,

1994), les gonadotrophines (McNatty et coll., 1975; Dieleman et coll., 1983) et la somatomédine (IGF) (Adashi et coll., 1985; Funston et coll., 1995; de la Sota et coll., 1996). La réserve de follicule en croissance (i.e. les follicules primordiaux ou primaires), se situe en périphérie dans le cortex ovarien (Driancourt et coll., 1991). À partir de cette réserve, continuellement, des follicules vont s'échapper pour commencer leur croissance (Thibault et Levasseur, 1979).

2.2.1. Croissance folliculaire

Chez la vache, la population des follicules antraux se renouvelle au cours du cycle œstral par une succession de croissance et de régression folliculaires appelée "vagues". Cette théorie de vagues folliculaires a été controversée pendant trois décennies (Adams et Pierson, 1995). En effet, la première notion de vague de développement folliculaire émane des travaux de Rajakoski (1960). Ces derniers sont basés sur des évaluations histologiques d'ovaires en provenance de vaches abattues à des jours précis du cycle œstral. Plus tard d'autres études sur la distribution des follicules antraux pendant le cycle œstral (Choudary et coll., 1968; Dufour et coll., 1972; Ireland et coll., 1979; Matton et coll., 1981; Ireland et Roche, 1982, 1983 a, b), ont mis en évidence la présence d'un seul follicule d'au moins 10 mm de diamètre et beaucoup plus grand que le follicule subordonné par paire d'ovaires. Ils avaient en plus trouvé qu'il y avait 2 à 4 follicules de 4 à 8 mm de diamètre accompagnant le gros follicule durant plusieurs jours du cycle œstral. Par ailleurs Ireland et coll. (1979) et Matton et coll. (1981) constatent l'existence d'une vingtaine ou d'une quarantaine de follicules de 1 à 3 mm de diamètre à la surface d'un ovaire pendant plusieurs jours du cycle œstral. Dufour et coll. (1979) ainsi que Matton et coll. (1981), ont tenté d'identifier le moment d'apparition du follicule ovulatoire et sa persistance pendant le cycle œstral. Des résultats d'étude obtenus par Ireland et Roche (1987), supportèrent l'hypothèse de Rajakoski (1960) qui soutenait l'existence de deux vagues folliculaires pendant le cycle œstral bovin. D'autres études plus approfondies par le biais de l'échographie offraient l'opportunité d'observer plusieurs événements ovariens. L'espèce bovine fut la première à être examinée (Savio et coll., 1975; Pierson et Ginther, 1984, 1987; Savio et coll., 1988; Sirois et coll., 1988, Singh et coll., 1998) pour caractériser la dynamique folliculaire et lutéale au cours d'un cycle œstral (Savio et coll., 1988; Sirois et Fortune, 1988).

De nos jours, la notion de vagues folliculaires chez la vache est reconnue (Sirois et Fortune, 1988; Savio et coll., 1988; Ginther et coll., 1989 a, b; Knopf et coll., 1989; Adams et coll., 1991; Ahmad, et coll., 1997). Ces vagues se développent plus ou

moins simultanément sur les deux ovaires (Driancourt et coll., 1991). L'échographie des follicules de 4 mm de diamètre ou plus a révélé que deux à trois fois pendant le cycle (Sirois et Fortune, 1988; Savio et coll., 1988; Ginther et coll., 1989; Hamilton et coll., 1995, Ahmad et coll., 1997), des groupes de follicules appelés "vagues" commencent en même temps leur croissance. Quelques jours plus tard, un seul follicule se démarque des autres et continue à croître, tandis que les autres follicules régressent (voir figure 1). On peut d'écrire l'ensemble du processus de croissance d'une vague folliculaire jusqu'à l'apparition du follicule dominant par des concepts de "recrutement", "sélection", "dominance" et "atresie ou ovulation".

2.2.1.1. Le recrutement

Le recrutement est l'entrée en phase terminale de la croissance d'un groupe de follicules qui se sont échappés de la réserve constituée de follicules primaires (voir figure1, Fortune, 1994).

Le recrutement est défini comme des échappés pendant deux à trois fois par cycle d'un groupe ou cohorte composé de trois à six follicules en même temps que des follicules plus large que 5 mm, commencent à se développer (Sirois et Fortune, 1988; Ginther et coll., 1989) suite à un signal leur permettant de continuer à croître et à se développer plutôt que de régresser (Fortune, 1994). Chez la vache, ce signal qui stimule le recrutement, ne fait pas suite à un seul pic de FSH au moment de l'ovulation qui précède la première vague du cycle œstral (Abraham et coll., 1972, Goodman et coll., 1977), mais plutôt à deux. Le premier pic de la FSH coïncide avec le pic préovulatoire de la LH, tandis que le second pic de FSH commence entre 8h et 24h après l'amorce du pic préovulatoire de la LH (Dobson, 1978; Quirk et Fortune, 1986). D'autres légères augmentations de la concentration de la FSH précèdent la seconde et la troisième vague folliculaire du cycle œstral (Adams et coll., 1992) ainsi que les vagues anovulatoires qui surviennent chez les animaux prépubères (Adams et coll., 1994).

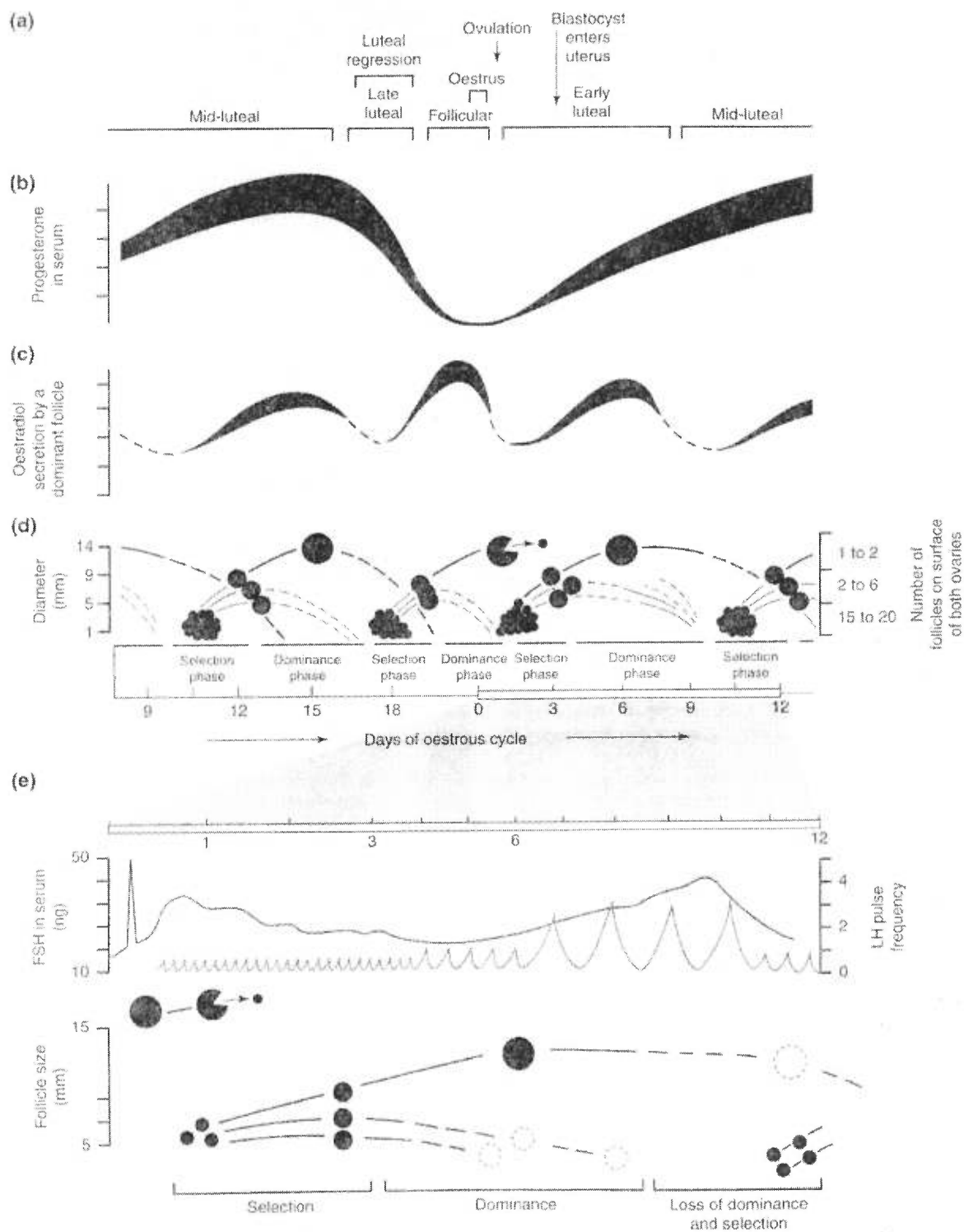


Figure 1. Représentation schématique de la folliculogénèse ovarienne.

(D'après Fortune, 1994)

2.2.1.2. La sélection

La sélection est un processus par lequel un seul follicule au potentiel de compétence suffisant pour atteindre l'ovulation est choisi, tandis que les autres follicules recrutés diminuent de taille ou s'atréfont (Lucy et coll., 1992). Ginther et coll. (1996) définissent la sélection du follicule préovulatoire comme étant un aspect du processus de dominance qui provoque la chute finale du pic de FSH. Au cours de ce processus de dominance, la concentration plasmatique de la FSH est maintenue à un niveau basal, ce qui explique la régression des follicules subordonnés de la même vague et le délai dans l'apparition d'une nouvelle vague. Cette hypothèse a été vérifiée par Adams et coll. (1993), qui ont provoqué le report de la chute des concentrations de FSH par l'injection de FSH exogène pendant 2 jours au moment où le follicule a un diamètre de 6mm. Suite à ce procédé expérimental, on a remarqué que le début du processus de dominance a été retardé pour une période de 48h.

L'autre aspect du processus de dominance s'explique par un changement au sein du follicule sélectionné pour la dominance dans son besoin en gonadotrophine, ce qui s'explique, qu'à ce stade de développement le follicule sélectionné pour la dominance dépendra essentiellement de la LH plasmatique. Cette intervention de la LH pendant le mécanisme de dominance a été supporté par plusieurs travaux. Gong et coll. (1995) démontrent dans leurs travaux, qu'un traitement chronique d'une vache avec un agoniste de la GnRH supprime la sécrétion pulsative de la LH et l'arrêt du développement du follicule le plus large au-delà du diamètre 7-9mm. Cela indique le rôle important de la LH au cours du développement après le processus de dominance. D'autres travaux réalisés par Fortune et coll. (1991), Savio et coll. (1993) et Stock et Fortune (1993) démontrent que la demi-vie du follicule dominant peut être prolongée par l'augmentation des fréquences pulsatives de la LH. L'identité des substances folliculaires responsables de la dépression finale de la concentration plasmatique de la FSH et le potentiel des substances folliculaires impliquées dans le changement de la dépendance en gonadotrophine de la FSH vers LH ne sont pas encore élucidés. Toutefois le follicule dominant produit et secrète de l'œstradiol au moment du mécanisme de dominance et au cours des phases de son développement subséquent. On peut donc postuler que l'œstradiol peut être impliqué dans les deux aspects du mécanisme de déviation (i.e. changement de gonadotrophine et l'inhibition des concentrations de la FSH circulante). On remarque une augmentation de la concentration de l'œstradiol dans le liquide folliculaire du follicule le plus large au

moment où son diamètre est à 9mm (Martin et coll., 1991; Bodensteiner et coll., 1996; Sunderland et coll., 1996; Guilbaut et coll., 1993).

2.2.1.3. La dominance folliculaire

La dominance folliculaire, se définit comme la phase qui fait suite à la phase de sélection. Le follicule sélectionné dont le diamètre est supérieur à 10mm inhibe l'apparition d'une autre vague folliculaire (Fortune, 1994). Le premier follicule dominant de la première vague folliculaire reste actif jusqu'à la moitié du cycle œstral (i.e. entre le 8 et le 11^{ème} jour) (Ginther et coll., 1989a). Le follicule dominant ovule si la régression du corps jaune est induite suite à une injection de prostaglandine F_{2α} (PGF_{2α}) exogène entre le 5 et le 8^{ème} jour (Kastelic et coll., 1990; Savio et coll., 1990). Chez la vache, l'ovulation du follicule dominant appartenant à la deuxième vague ou la troisième vague se réalise, si sa maturation coïncide avec la lutéolyse et la régression spontanée du corps jaune (Sirois et coll., 1988; Savio et coll., 1988; Taylor et Rajamahendran, 1991). Il est à noter que selon la population de vaches d'où provenaient les données, les chercheurs ont observé une majorité d'animaux manifestant deux vagues ovulatoires (80% des vaches) (Ginther et coll., 1989) ou trois vagues (81% des vaches) (Savio et coll., 1988; Sirois et coll., 1988)

Les follicules dominants sont ainsi appelés parce qu'on pense qu'une fois sélectionnés, ils vont d'une certaine manière arrêter tout développement et différenciation subséquents des "follicules-sœurs ou subordonnés" et aussi supprimer d'autres recrutements folliculaires (Fortune, 1994). Les mécanismes responsables de la désignation du follicule dominant et du temps relatif à l'apparition de la vague folliculaire sélectionnée ne sont pas connus. Toutefois, deux hypothèses ont été suggérées afin d'expliquer plus ou moins par quel moyen le follicule dominant exercerait sa dominance sur les follicules subordonnés (Stock et Fortune, 1993; Spears et coll., 1996; Fortune, 1994, Armstrong et Webb, 1997). La première hypothèse stipule que le follicule dominant sécrète directement une substance qui inhibe la croissance et le développement des follicules subordonnés. Chez les animaux mono-ovulatoires, une telle substance est de nature endocrine puisqu'elle induit une régression des follicules subordonnés dans les deux ovaires (Ireland, 1987). La deuxième hypothèse supporte l'idée, que le follicule dominant pourrait causer indirectement la régression de ceux qui lui sont subordonnés par un mécanisme de rétrocontrôle négatif au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

Selon cette dernière hypothèse, la sécrétion par le follicule dominant des régulateurs de rétrocontrôle tels que, l'œstradiol (Butler, et coll., 1983; Price et Webb, 1988; Price et coll., 1995; Carrière et coll., 1996; Stewart et coll., 1996; Badinga et coll., 1992,1993; Evans et Fortune, 1997) et l'inhibine (Quirk et Fortune, 1986; Price, 1991), seraient responsables de la diminution de la concentration de FSH par un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de la FSH (Adams et coll., 1992; Stock et Fortune, 1993). La chute de la concentration de FSH circulante compromet le développement des follicules subordonnés. Cependant ceux qui sont plus développés ou sont moins dépendants de la FSH survivent (Zelevnik et Hillier, 1984; Baird, 1987). Des études réalisées chez la brebis (Picton et coll., 1990) suite à une administration chronique d'un puissant agoniste de (GnRH) afin de supprimer les gonadotrophines endogènes suivie d'un traitement avec des hormones de remplacement, ont démontré que la croissance des follicules au stade ovulatoire est totalement dépendante de la FSH.

Toutefois le follicule préovulatoire est dépendant d'une part du niveau de la FSH et d'autre part du temps de son exposition à la FSH. Quoiqu'il en soit, l'hormone LH seule ne stimule pas le développement folliculaire. Des amplitudes pulsatives élevées de LH peuvent inhiber partiellement l'action stimulatrice de la FSH sur la croissance folliculaire, dépendamment du niveau de stimulation de la FSH (McNeilly et coll., 1991). Pradalement, une élimination complète de l'hormone LH par immunisation passive, inhibe l'effet de la FSH sur le développement folliculaire (McNeilly et coll., 1991). D'autres travaux ont confirmé les résultats de McNeilly et coll. (1991), montrant que les faibles amplitudes et fréquences des pulsations de la LH ont un effet potentialisant la FSH à stimuler le développement des larges follicules antraux (Campbell et coll., 1995). Cependant en l'absence de LH, ces follicules demeurent sous une dépendance critique à la FSH comme support gonadotrophique. Pour les larges follicules antraux leur besoin en hormones gonadotrophines se transfèrent de la FSH vers la LH, si cette dernière (i.e. LH) est délivrée à haute fréquence et avec des amplitudes pulsatives faibles. Ce mécanisme de transfert des besoins en gonadotrophine de la FSH vers la LH utilisé par le follicule préovulatoire induit la chute de la concentration de FSH au début de la phase folliculaire juste après la régression lutéale (Campbell et coll., 1995). Le rôle de la LH comme support pendant la phase terminale de la croissance folliculaire, ne se limite pas au remplacement de l'action de la FSH. Premièrement, la LH stimule les cellules de la thèque interne à en produire des androgènes, donc indirectement elle augmente la synthèse de l'œstradiol par l'aromatation des androgènes produits par les cellules de la thèque sous l'effet de la LH (Erickson et coll., 1985). Deuxièmement, la LH supporte la maturation terminale

du follicule. En effet, à la fin de la phase folliculaire, une importante augmentation de la pulsatilité de la LH entraîne une augmentation des récepteurs à la LH aux cellules de la granulosa du follicule préovulatoire. La LH stimule le développement terminal du follicule dominant et permet le maintien de sa dominance (Savio et coll., 1993). De plus, un rôle possible du rapport LH/FSH dans la sélection du follicule dominant a été proposé par McNeilly et coll. (1992). Une augmentation de ce rapport entraîne le maintien de la croissance folliculaire et accélère l'atrésie des petits follicules antraux dépourvus de récepteurs à la LH.

2.3. Atrésie folliculaire

L'atrésie folliculaire se définit comme étant le processus de dégénérescence par lequel les follicules régressent avant d'atteindre l'ovulation. Le mot atrésie vient d'un mot grec qui signifie nonperforé. On l'utilise fréquemment pour décrire la nonperforation d'un orifice naturel. Selon une définition plus stricte, l'atrésie fait référence à un follicule antral en dégénérescence avant l'ovulation. Ce terme a été utilisé plus ou moins par en physiologie de la reproduction afin de décrire les changements dégénératifs pendant le développement ovarien. Cette dégénérescence cellulaire programmée dans l'ovaire est prépondérante et probablement en liaison avec la réorganisation de la masse tissulaire durant chaque vague de croissance folliculaire, ovulation, lutéinisation et la mort du corps jaune (Hsueh et coll., 1994). La plupart des follicules ovariens sont voués à l'atrésie, seulement quelques-uns ovulent. La proportion des follicules atrétiques et sains est constatée pendant la période de la vie fertile, toutefois, elle varie entre les espèces. Chez la rate et la femme, respectivement 70% et 50-75% des follicules sont atrétiques (Mandel et Zuckerman, 1950; Block, 1951). Toutefois, chez vache, l'atrésie folliculaire est plus fréquente dans les follicules dont le diamètre varie entre 3.7mm ou plus (Lussier et coll; 1987, 1994).

Des travaux réalisés chez la vache par McNatty et coll. (1984) ont pu déterminé morphologiquement les différents stades d'atrésie folliculaire. Parmi les critères d'identification, on distingue la présence ou l'absence des capillaires sanguins dans la thèque, la présence ou l'absence des débris dans le liquide folliculaire, l'état de l'ovocyte (sain, dégénéré ou absent), le nombre total des cellules de la granulosa exprimé sous forme d'un pourcentage du maximum de cellules observées dans un follicule antral (McNatty et coll., 1984) et la couleur ou l'apparence de la couche interne de la thèque (rouge, rose et blanche). On remarque 3 groupes ou grades d'atrésie 1, 2 et 3.

Grade 1. Représente les follicules avec une thèque interne vascularisée de couleur rouge qui tend vers le rose, absence de débris dans le liquide folliculaire, >75% du nombre maximal de cellules de la granulosa et un ovocyte sain.

Grade 2. Représente les follicules avec une thèque interne vascularisée de couleur rouge tendant vers le rose, présence d'un peu de débris dans le liquide folliculaire, <75% du nombre maximal de cellules de la granulosa, absence ou présence d'un ovocyte sain ou dégénéré.

Grade 3. Les follicules contiennent une thèque interne blanche, des débris dans le liquide folliculaire, <50% le nombre maximal de cellules de la granulosa, présence d'un ovocyte dégénéré.

Du point de vue histologique, des travaux réalisés *in situ* par Grimes et coll. (1987) comparaient des sections de follicules non atrétiques avec des sections de follicules à différent degré d'atrésie. Ils ont remarqué les caractéristiques suivantes. Le follicule non atrétique ou dominant, se compose de 7 couches de cellules de la granulosa dont quelques-unes apparaissent relativement fragmentées ou pycnotiques. La lame basale de la granulosa peut être en colonne et la membrane basale est souvent présente. L'épaisseur de la thèque interne est inférieure à celle de la granulosa. La thèque interne a souvent des cellules glandulaires et fibroblastiques et ces couches de la ont une orientation parallèle à la membrane basale. Follicule intermédiaire atrétique elle se compose de 2 à 6 couches de cellules de granulosa qui peuvent être désorganisées. Les cellules de la granulosa fragmentées ou pycnotiques sont abondantes. La couche basale des cellules de la granulosa ainsi que la membrane basale sont souvent absentes. La thèque interne est de 2 à 3 fois plus épaisse que les couches de la granulosa et les cellules de la thèque interne ont une structure arrondie. Le follicule atrétique: il se caractérise par des cellules de granulosa éparpillées ou presque absentes. Présence de quelques cellules squameuses parmi les cellules de la thèque interne. Elle varie en épaisseur et elle est désorganisée. La membrane basale est absente. Le follicule atrétique luteinisé: comprend une à deux couche(s) de cellules de la granulosa d'aspect hypertrophié et dotées d'une structure allongée et d'un cytoplasme basophile. Cependant, la couche de la thèque interne est mince et désorganisée.

Huet et coll. (1998), démontrent d'après leurs résultats que les premiers signes de l'atrésie folliculaire apparaissent au niveau de la thèque interne, ce qui s'explique par une diminution des concentrations de la fibronectine et du récepteur IGF-II/M6P. Dans

les différents modèles d'atrésie induite expérimentalement, les concentrations plasmatiques de l'œstradiol (Dufour et coll., 1979; Otsuka et coll., 1997; Jolly et coll., 1997) et de la P450arom dans les cellules de granulosa diminuent rapidement (Hubbard et Greenwald, 1985; Huet et coll., 1997, 1998). D'autres travaux réalisés chez la vache (Henderson et coll., 1984; Guilbaut et coll., 1993, Hopko-Ireland et coll., 1994, Price et coll., 1995; Sunderland et coll., 1996) et la truie (Guthrie et coll., 1997), démontrent que dans le follicle dominant morphologiquement atrétique en phase de régression, les concentrations des inhibines dimères (α et β) dans le liquide folliculaire sont considérablement élevées par rapport à l'inhibine- α monomère en comparaison avec les concentrations dans un follicule sain en phase de croissance.

2.3.1. Apoptose

Dans plusieurs organes, le remaniement et la dégénérescence des tissus font appel à un processus actif, nommé apoptose. Le mot apoptose signifie une chute des feuilles des arbres ou bien des pétales d'une fleur.

Des études basées sur les différences morphologiques et biochimiques signalent clairement qu'il existe deux voies entraînant ainsi la mort cellulaire: la nécrose et l'apoptose (Wyllie, 1981; Waring et coll., 1991; Walker, 1988). En général, la nécrose d'un tissu est la conséquence d'une lésion cellulaire ou d'autres traumatismes (Trump, et coll., 1982), qui se caractérisent par la perte de la structure cellulaire, une enflure causée par un changement de la perméabilité de la membrane cellulaire (Trump et coll., 1984) et enfin une rupture de la cellule qui peut provoquer des dommages aux cellules avoisinantes, entraînant ainsi une inflammation due à l'infiltration du milieu par des cellules immunitaires (Schwartzman et Cidlowski, 1993). La nécrose affecte typiquement un groupe de cellules contiguës. Cependant, souvent une réaction inflammatoire se développe au niveau du tissu viable adjacent en réponse aux débris cellulaires libérés (Schwartzman et Cidlowski, 1993). Parmi les points communs qui existent entre la nécrose et l'apoptose, mentionnons l'augmentation de la concentration intracellulaire du calcium (Ca^{++}) (Oshimi et coll., 1996). Au contraire, l'apoptose est un événement ordonné qui prend place dans les tissus qui subissent des changements de développement ou bien en réponse à des stimulus d'altération physiologique. Ce processus prend place dans des cellules ayant des concentrations normales d'ATP et affecte des cellules isolées et éparpillées, entraînant ainsi leur rétrécissement, la condensation de leur chromatine et finalement la formation des corps apoptiques résultant de la rupture de la membrane cellulaire. Les corps apoptiques sont ensuite

phagocytées par les cellules avoisinantes (Wyllie et coll., 1983). Le phénomène phagocytaire prend souvent place avant la perte de l'intégrité de la membrane plasmique, ce qui se traduit par l'absence de fuite des composés cytoplasmique, en conséquence, absence des réactions inflammatoires (Hsueh et coll., 1994). L'apoptose se caractérise par le déclenchement de l'activité endonucléase dépendante de la concentration de Ca^{++} et de Mg^{++} , qui spécifiquement clive l'ADN cellulaire entre les espaces réguliers des unités nucléosomales. Ceci donne naissance à des fragments d'ADN de 185 à 200 paires de bases (Wyllie, 1981; Gaido et Cidlowski, 1991; Walker et Sikorska, 1994; Tilly, 1994, 1996).

Du point de vue endocrinologique, la plupart des facteurs autocrines ou paracrines, tels que les stéroïdes, les peptides gonadiques et les facteurs de croissance, dont ils modulent la différenciation des cellules de la granulosa, exercent leurs effets biologiques de manière paradoxale (Amsterdam et Selvaraj, 1997). Au début du développement folliculaire, ces derniers jouent un rôle mitogène, cependant pendant les étapes du développement folliculaire ils augmentent la différenciation et la luteinisation des cellules de la granulosa de manière coordonnée avec les signaux produits par l'AMPc des gonadotrophines (Richards, 1980; Amsterdam et coll., 1996). Les principaux facteurs impliqués dans la modulation du signal de la tyrosine kinase tels que l'insuline (Spicer et Echanterkamp, 1995; Willis et coll., 1996), les IGF (Adashi et coll., 1985; Monget et coll., 1996), le facteur de croissance épidermique (EGF) (May et Schomberg, 1989; Mason et coll., 1990; Tilly et coll., 1992a), le facteur de croissance fibroblastique (FGF) (Yamoto et coll., 1993, Tilly et coll., 1992a), le facteur de croissance transformant- α (TGF- α) (May et coll., 1989; Onagbeasen et coll., 1996), TGF- β (Dorrington et coll., 1988; Pazdrak et coll., 1995), la prolactine (Veldhuis et Hammond, 1980; Prevarskaya et coll., 1995) et les gonadotrophines (Billig et coll., 1996; Tilly et coll., 1992b; Tapanainen et coll., 1993, Chun et coll., 1993; Dharmarajan et coll., 1994; Chun et coll., 1996). En outre, les hormones stéroïdiennes agissent comme des supprimeurs ou des stimulateurs du processus apoptotique au niveau des différents tissus. Les œstrogènes inhibent l'apoptose au niveau des cellules de la granulosa ovarienne (Tilly et coll., 1992b; Guthrie et coll., 1995), par contre, les androgènes augmentent le processus d'apoptose au niveau des cellules de la granulosa (Billig et coll., 1993). Cependant, chez le mâle, on constate un effet inhibiteur de l'apoptose par les androgènes (Billig et coll., 1996). Les effets des facteurs cités plus hauts peuvent être modulés par l'activation ou la modulation des proto-oncogènes tels que le RAS, le WAF-1, le c-myc, le c-jun, le c-fos et les gènes

suppresseurs des tumeurs tels que, la p53 (Amsterdam et coll., 1992; Peluso et coll., 1995).

2.4. RÉGULATION DE LA CROISSANCE FOLLICULAIRE

2.4.1. Le contrôle endocrinien de la folliculogénèse

Le développement folliculaire se caractérise par d'importants changements morphologiques et fonctionnels au niveau des cellules de la thèque et des cellules de la granulosa (prolifération, sensibilité aux gonadotrophines et production d'hormones stéroïdiennes) et dans l'ovocyte (maturation du cytoplasme et du noyau). Il existe des évidences substantielles démontrant que la FSH et la LH jouent un rôle clé dans le contrôle de la folliculogénèse. Cependant, il existe plusieurs autres facteurs d'origine endocrinienne et paracrinienne modulant le développement folliculaire dont les stéroïdes et les facteurs de croissance.

Les stéroïdes sont impliqués directement dans le maintien de la fonction reproductrice et le développement des caractères sexuels mâle et femelle. Par contre, les facteurs de croissance sont impliqués directement dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire, et probablement jouent un rôle essentiel dans le processus de la morphogénèse, la croissance, la différenciation cellulaire et la maintien de l'homéostasie. Les principaux stéroïdes de la reproduction sont les androgènes chez le mâle et la femelle et les œstrogènes et les progestagènes chez la femelle. En ce qui concerne les facteurs de croissance, ils ont été regroupés sous forme de familles en se basant sur leur structure et leur activité biologique. On distingue la famille du facteur de croissance épidermique (EGF), la famille du facteur de croissance fibroblastique (FGF), la famille de la somatomédine (IGF) et la famille du facteur de croissance transformant- β (TGF- β). À la famille du TGF- β se rattachent des peptides qui possèdent des cystéines en position 7-9 comme la TGF- β , ce sont les inhibines, les activines et leurs protéines de liaisons nommées α_2 macroglobuline et follistatines. Notre connaissance sur le rôle exact de ces facteurs de croissance dans la folliculogénèse reste limitée pour deux raisons. Premièrement, ces facteurs de croissance sont omniprésents étant sécrétés par différents types de cellules et agissant localement par le biais de deux voies: la paracrine ou l'autocrine. Quelques-uns, comme l'EGF et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et plusieurs cytokines sont exprimés sous forme transmembranaire et peuvent activer les récepteurs des cellules adjacentes par voie dite juxtacrine (Wong et coll., 1989). En plus, un mode d'action intracellulaire

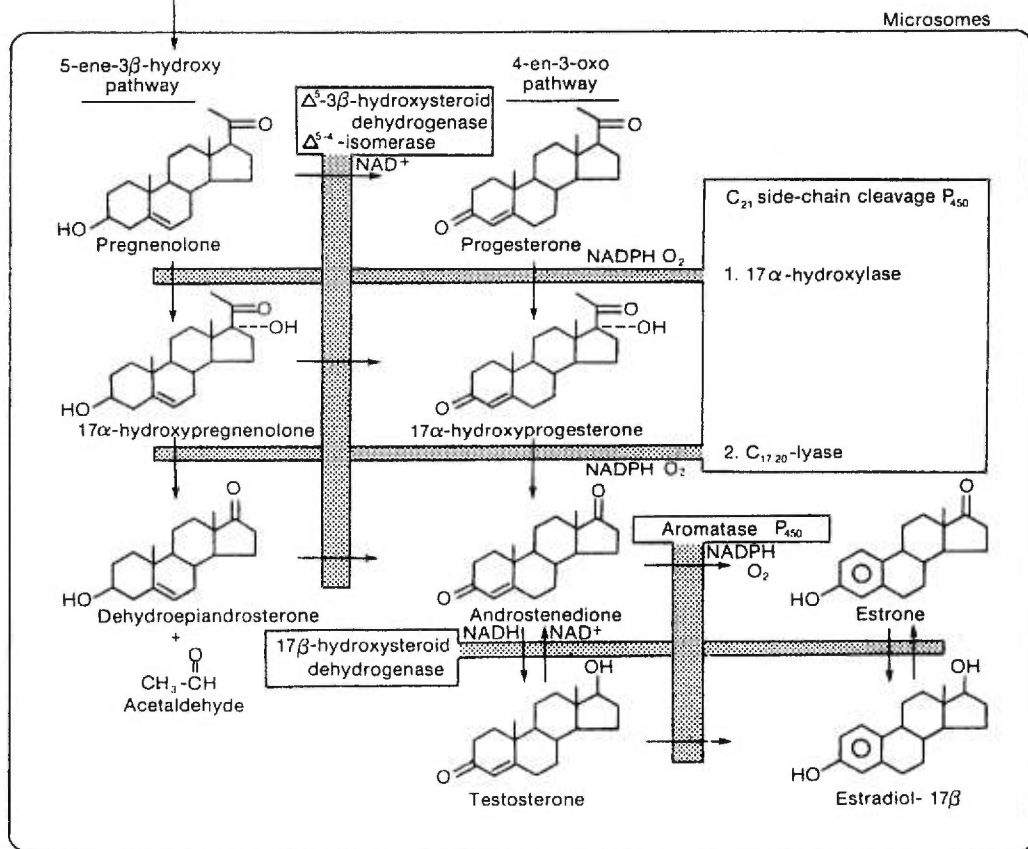
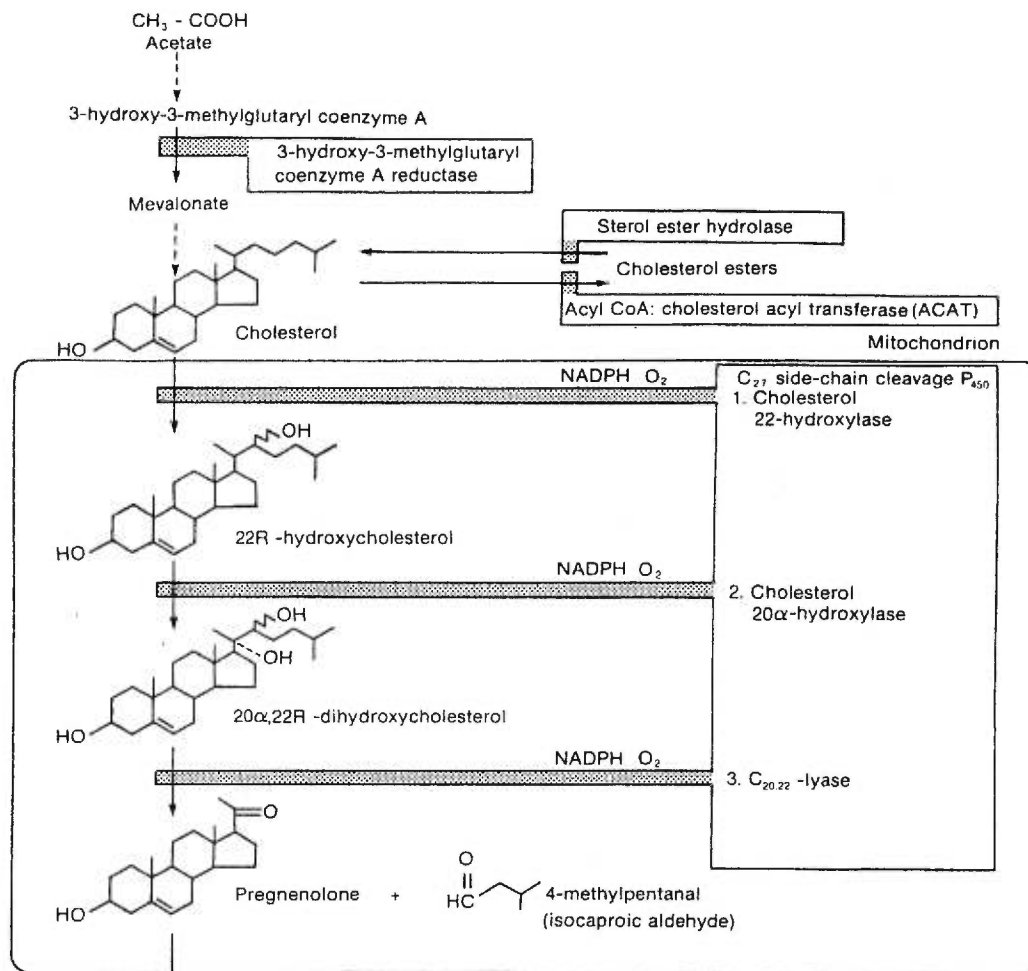
bien particulier, "l'action intracrine", a été décrite pour l'EGF (Logan, 1990). Cependant, les facteurs de croissance peuvent aussi agir sur les cellules cibles par voie endocrine, comme les hormones. Deuxièmement, les facteurs de croissance appartiennent à un système très complexe, incluant tous les facteurs structurellement et fonctionnellement apparentés, leur(s) récepteur(s) et, dans la plupart des cas, les protéines de liaison ou les protéoglycanes (Monget et Manniaux, 1995).

2.4.1.1. Les stéroïdes

Les stéroïdes constituent une classe de composés très importants chez toutes les espèces animales. On distingue les stéroïdes synthétisées par les glandes surrénales, dites les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes, qui jouent un rôle critique dans la maintenance du métabolisme des hydrates de carbone, le stress et l'équilibre de la concentration du sel dans l'organisme. Les organes reproducteurs sont l'autre site majeur de la synthèse des stéroïdes. Chez la femelle, les stéroïdes sexuels sont représentés par les progestatifs et les œstrogènes, synthétisés par les ovaires et le placenta. Ils jouent aussi un rôle très important dans l'apparition des caractères sexuels secondaires et dans la reproduction (Revue par, Yamamoto, 1985; Catt, 1987; Miller, 1988).

Les stéroïdes ovariens peuvent être organisés en trois groupes selon leur action physiologique et le nombre de carbone qu'ils renferment: les progestatifs (C₂₁), les androgènes (C₁₉) et les œstrogènes (C₁₇) (Miller, 1988; Gore-Langton et Armstrong, 1994). Ces classes d'hormones sont structurellement similaires, possèdent un noyau cyclo-pentanophénanthrénique comportant trois anneaux hexagonaux A, B, C et un cycle pentagonal D. Elles dérivent toutes d'une série de cascades communes (voir figure 2).

Figure 2. Représentation schématique de la stéroïdogénèse ovarienne.
(D'après Gore-Langton et Armstrong, 1994).



2.4.1.1.1. Les précurseurs

La molécule mère des les stéroïdes s'avère être le cholestérol (Miller, 1988) qui dérive de l'une des deux sources possibles soit 1) le cholestérol préformé, pris à partir du sang, dans lequel il circule sous forme de lipoprotéine et 2) le cholestérol synthétisé *de nova* dans les cellules ovariennes à partir des composés qui contiennent 2 carbones dérivant du métabolisme des hydrates de carbone, des matières grasses ou des protéines dans la cellule (Gore-Langton et Armstrong, 1994). La source de cholestérol utilisée pour la stéroïdogénèse dans un tissu ou un autre varie selon l'espèce animale et le type de cellule impliqué (Strauss et coll., 1981). Plusieurs études sur le rôle du cholestérol de différentes sources comme précurseur de la stéroïdogénèse, ont montré que le cholestérol circulant sous forme de lipoprotéine serait être la principale source dans la stéroïdogénèse (Gwynne et Strauss, 1982; O'Shaughnessy et Wathes, 1985). Dans ce processus, le cholestérol doit être transporté dans la mitochondrie vers le cytochrome de coupure de la chaîne latérale (P450_{sc}) qui se trouve du côté matriciel de la membrane mitochondriale interne. Toutefois, comme le cholestérol est une molécule hydrophobique, elle ne diffuse pas facilement à travers cette membrane mitochondriale interne et a besoin d'une protéine de transport pour franchir la barrière aqueuse se trouvant dans l'espace intermitochondrial (Stocco et Clark, 1996). Plusieurs protéines ont été associées à des effets de stimulation rapide du transport du cholestérol dans la mitochondrie. Toutefois, la protéine la mieux étudiée et caractérisée pour cet effet est la "protéine de régulation rapide de la stéroïdogénèse" ou (StAR) (Stocco et Clark, 1996).

2.4.1.1.2 Les enzymes stéroïdiens

Les six enzymes impliqués dans la synthèse des stéroïdiens appartiennent à la famille du groupe oxydase du cytochrome P450. Trois des six de ces enzymes sont localisés dans la membrane interne de la mitochondrie, les cytochromes de coupure de la chaîne latérale (P450_{sc}), P450_{11β} et la P450 aldostérone (P450_{aldo}). Les autres trois enzymes sont localisées au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, P450_{c21}, P450_{17α} et le cytochrome œstrogène synthétase, aromatase (P450_{arom}) (Miller et Levine, 1987; Nebert et Gonzales, 1987; Omura et Morohashi, 1995). La cytochrome P450 est un terme générique attribué à un grand nombre d'enzymes oxydatives constituées de 500 acides aminés et un groupement hème. Elles sont responsables de l'hydroxylation des substrats lipophiles (Hall, 1984) et réduisent l'oxygène atmosphérique O₂ ou moléculaire (Hall, 1984; Rodgers, 1990; Nebert et McKinnon,

1994) avec des électrons provenant du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Les électrons du NADPH atteignent la P450 par l'intermédiaire d'un ou de quelques transporteurs d'électrons, dont l'un est toujours une flavoprotéine (Nebert et McKinnon, 1994). Les cytochromes P450 sont des enzymes qui lient le substrat stéroïdien et procèdent à sa conversion sur un site associé au groupement hème (Martucci et Fishman, 1993).

2.4.1.1.2.1. La P450_{scc}

La conversion du cholestérol en prégnénolone, première étape de la stéroïdogénèse (Stone et Hetcher, 1954; Garren et coll., 1971), est catalysée par la P450_{scc}. Trois réactions chimiques distinctes sont impliquées dans cette transformation en prégnénolone et en acide isocaproïque: la 20 α -hydroxylation, la 22-hydroxylation et la rupture de la chaîne latérale du cholestérol au niveau des atomes de carbone 20-22. (voir figure 2; Gore-Langton et Armstrong, 1994). Les électrons du NADPH sont acceptés par une flavoprotéine appelée adrénodoxine réductase, qui est associée avec la membrane interne des mitochondries (Nakamura et coll., 1966).

2.4.1.1.2.2. La 3 β -HSD

Suite à la coupure de la chaîne latérale du cholestérol par le cytochrome P450_{scc} conduisant ainsi à la formation de la prégnénolone et des hydroxystéroïdes Δ^5 -3 β qui y sont associés, elles peuvent être soumises à une oxydation et une isomérisation du Δ^5 en Δ^4 . Cette étape enzymatique est catalysée par la 3 β -HSD (Readhead et coll., 1983; The et coll., 1989) et transforme notamment la prégnénolone en progestérone, 17 α -hydroxyprégnénolone en 17 α -progestérone, la déhydro-épiandrostérone (DHEA) en androstènedione (Δ^4 -dione) et l'androst-5-ene-3 β , 17 β -diol (Δ^5 -diol) en testostérone (voir figure 2; Readhead et coll., 1983; The et coll., 1989). Ainsi, la 3 β -HSD joue un rôle clé dans la physiologie ovarienne et la fonction de la reproduction (Couet et coll., 1990) car elle est indispensable à la formation de la progestérone, le premier stéroïde biologiquement important dans la cascade, de même que les androgènes et les œstrogènes. Le ou les enzyme(s) catalysant la 3 β -désydrogénation et l'isomérisation de la double liaison de l'anneau B (stéroïdes Δ^5) en anneau A (stéroïde Δ^4) reste(nt) inconnu(s) (Miller, 1988).

2.4.1.1.2.3. La P450_{17 α}

La prégnénolone et la progestérone peuvent subir une 17 α hydroxylation pour donner la 17 α hydroxyprégnénolone et la 17 α hydroxyprogestérone (Zuber et coll., 1986; Payne, 1990; Goascogne et coll., 1995). Ces derniers peuvent subir une scission au niveau de la liaison carbone du C-17 et 20 pour donner la dehydroépiandrostérone (DHEA) et l'androstènedione respectivement (Youngblood et coll., 1991; Le Goascogne et coll., 1995). La P450_{17 α} possède l'activité de la 17 α -hydroxylase et de la C17-20 lyase la rendant ainsi un site important de la biosynthèse des hormones stéroïdiennes (Fevold et coll., 1989). Chez le bovin, l'androstènedione est le principal stéroïde aromatisable produit par les cellules de la thèque interne. Cette espèce utilise préférentiellement les Δ^5 -3 β -hydroxystéroïdes (Lacroix et coll., 1974; McNatty et coll., 1984; Fortune et Hansel 1985; Fortune, 1986).

2.4.1.1.2.4. La P450_{arom}

L'aromatisation du Carbone C-19 des androgènes en Carbone C-18 des stéroïdes oestrogéniques est activée par la P450_{arom} localisée dans le réticulum endoplasmique (Fevold et coll., 1989). La réaction nécessite le NADPH, 3 moles d'O₂ et implique 3 hydroxylations (Gore-Langton et Armstrong, 1994). Le complexe enzymatique P450_{arom} fut nommé ainsi à cause de la structure aromatique du produit formé (Thompson, 1974; Zuber et coll., 1986). L'aromatase possède une fonction oxydase qui catalyse une cascade de réaction l'aboutissant à l'enlèvement du groupe méthyle au niveau du C-10 à la formation d'acide formique suivit par un réarrangement de l'anneau A en structure aromatique (Fevold et coll., 1989).

Des travaux réalisés par Flack (1959), ont apporté des évidences très convaincantes sur la relation des cellules de la thèque et les cellules de la granulosa pour la synthèse de l'œstradiol. Les cellules de la thèque peuvent convertir le cholestérol en androgène qui est stimulée par la LH (Fortune et Armstrong, 1978). Mais ces cellules apparaissent moins habiles à aromatisées les androgènes en œstradiol (Fortune et Armstrong, 1977). Par contre, les cellules de la granulosa *in vitro* sont capables de convertir les androgènes exogènes en œstradiol (Dorrington et coll., 1975, Fortune et Armstrong, 1977, Erickson et Hsueh, 1978), mais sont incapables de produire les androgènes (Fortune et Armstrong, 1977). D'autres travaux *in vitro* démontrent que les cellules de granulosa synthétisent de la progestérone, mais elles

seraient incapables de continuer la voie stéroïdogénèse jusqu'aux androgènes. Cela s'explique par l'absence de deux d'enzymes indispensable: la 17 α -hydroxylase et la 17-20 désmolase. (Fortune et Quirk, 1988). Les cellules de la granulosa récoltées d'un rat immature ou bien d'un rat hypophysectomisé manquent d'aromatase. Cependant, l'enzyme peut être induite *in vitro* ou bien *in vivo* par l'action de la FSH, mais non par la LH (Dorrington et coll., 1979; Armstrong et Papkoff, 1976). Ces résultats montrent clairement le model "deux cellules, deux gonadotrophines" pour en produire de l'œstradiol (Fortune et Quirk, 1988). Les stéroïdes sécrétés par les gonades sont capables de moduler et même, en général, d'inhiber l'activité des enzymes de la stéroïdogénèse (i.e. rétroinhibition; Robel, 1991). Les stéroïdes se lie à un récepteur nucléaire qui est attaché à un site accepteur génique pour induire la synthèse d'ARNm spécifiques (Robel, 1991). L'ajout d'œstradiol *in vitro* inhibe chez le bovin la production de la progestérone par les cellules de la granulosa et par les cellules de la thèque en culture (Fortune and Hansel 1979; Roberts and Skinner 1990a). Ceci suggère que, chez le bovin, les concentrations d'œstradiol du le liquide folliculaire pourraient moduler la sécrétion de la progestérone et la différenciation des deux types cellulaires. La production de la progestérone par les cellules de la granulosa en culture est aussi inhibée de façon proportionnelle à la dose administrée par l'ajout des stéroïdes suivants: œstradiol, œstrone, testostérone, androstènedione et 5 α -dihydro-testostérone (Henderson et coll., 1987). La diminution de la production de progestérone par les cellules de la granulosa en présence d'une forte concentration d'androstènedione semble favoriser la sécrétion d'œstradiol par ces dernières (Sirard et coll., 1991). Chez la vache, l'ajout d'œstradiol aux cultures de cellules de la thèque favorise aussi la production d'androstènedione par ces cellules ce qui suggère que l'œstradiol pourrait donc avoir un rôle important dans le contrôle de la fonction et de la différenciation des cellules de la thèque (Roberts and Skinner 1990b). Chez la rate, l'injection d'œstradiol semble favoriser la prolifération plutôt que la différenciation cellulaire par l'entremise de TGF- β (Bendell et Dorrington, 1991).

2.4.1.2 LES FACTEURS DE CROISSANCE

2.4.1.2.1 Insuline et la somatomédine (IGF)

Le foie est probablement la source de la plupart des IGF circulants et l'organe où l'ARNm qui code pour ces facteurs est le plus abondant (Murphy et coll., 1987). Les IGF agissent comme modulateurs de l'action des gonadotrophines au niveau cellulaire et stimulent la prolifération et la différenciation des cellules de la granulosa et de la

thèque. Elles montrent un patron d'expression spécifique aux espèces dans le tissu folliculaire. Chez les rongeurs (Oliver et coll., 1989) et chez la truie (Zhou et coll., 1996), l'expression de l'ARNm qui code pour l'IGF-I est confinée au tissu de la granulosa. Alors que chez l'humain, l'ARNm qui code pour IGF-II est localisé dans le tissu de la granulosa (Zhou et Bondy, 1993).

L'expression de l'ARNm qui code pour l'IGF-II a été décelée au niveau des cellules de la thèque du follicule ovarien bovin (Armstrong et Webb, 1997) avec la même distribution spatiale que chez la brebis (Perks et coll., 1995). L'expression de l'IGF-I par les cellules de la granulosa ou la thèque n'est pas encore élucidée chez les ruminants. Leeuwenberg et coll. (1995) ont démontré que chez la brebis, l'ARNm qui code pour l'IGF-I est détecté dans de les cellules de la granulosa et la thèque, cependant Perks et coll. (1995) n'ont pas détecter son expression dans le follicule ovarien chez la brebis. Chez la vache, Gutierrez et coll. (1997) n'ont pas été capable de démontré la présence d'IGF-I ou son ARNm dans les cellules de la granulosa avant et après leur culture. La signification fonctionnelle de ces différences dans l'expression de l'ARNm qui code pour les IGF entre les espèces est inconnue. Il se peut, toutefois, que cela reflète un changement dans le rôle relatif des IGF-I et IGF-II, qui agiraient sous forme endocrine ou comme régulateurs ovariens de la croissance folliculaire. Ce changement de rôle pourrait s'être développé afin de fonctionner en harmonie avec un modèle particulier de développement folliculaire et de maximiser le potentiel reproductif chez des espèces particulières (Armstrong et Webb, 1997). *In vitro*, l'IGF-I et l'IGF-II stimulent la prolifération et la stéroïdogenèse des cellules de la granulosa chez la rate, brebis et la femme (Adashi et coll., 1992; Giudice, 1992). L'IGF-I aussi stimule la stéroïdogenèse dans les cellules de la thèque. En plus, chez la femme (Voutilainen et Miller 1987) et la truie (Hammond et coll., 1993), les gonadotrophines stimulent respectivement la synthèse de l'IGF-II et l'IGF-I par les cellules de la granulosa *in vitro*.

Les IGF induisent une réponse cellulaire en se liant à des récepteurs spécifiques localisés sur la surface des membranes cellulaires. On distingue deux types de récepteurs d'IGF soit I et II. Le récepteur de type I intervient dans la plupart des actions reliées aux IGF (I et II) (Roth et Kiess 1994). Il a une structure tétramère $\alpha_2\beta_2$ (i.e. deux sous-unités α liées entre-elles par deux sous-unités β) (Monget et coll., 1996), qui est structurellement et fonctionnellement semblable au récepteur de l'insuline (voir figure 3). L'affinité de ce récepteur est légèrement plus élevée pour l'IGF-I que pour l'IGF-II et beaucoup plus élevée pour l'IGF-I que pour l'insuline (Monget et

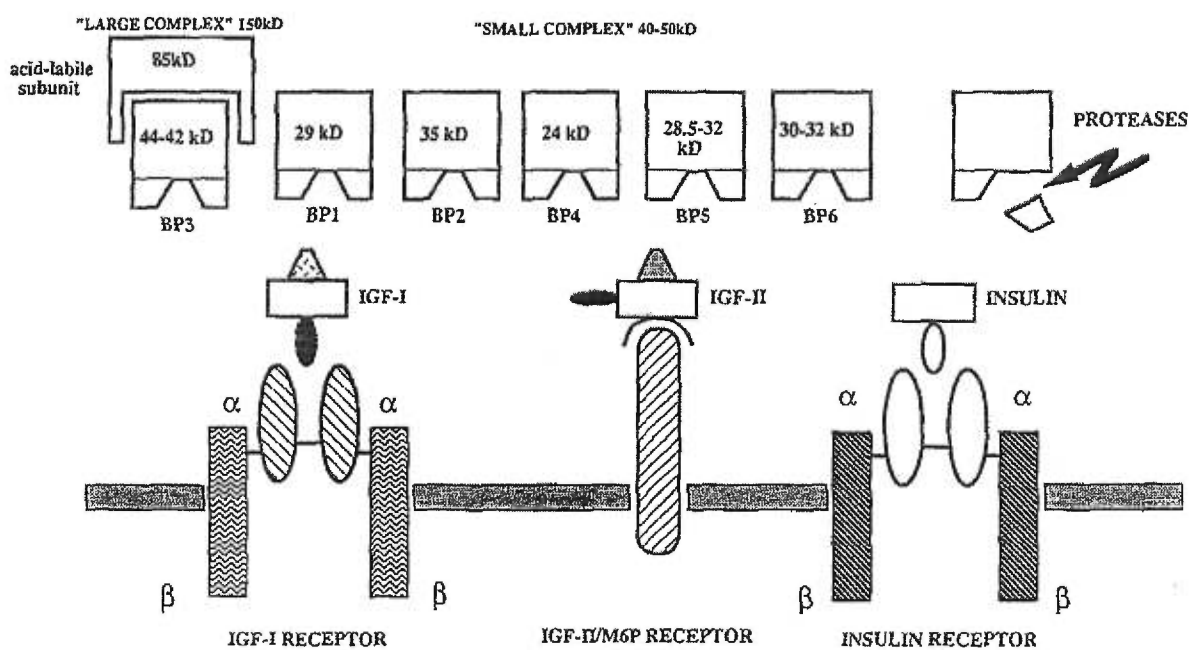


Figure 3. Représentation schématique des structures des IGF, de l'insuline, des récepteurs à IGF, à l'insuline, aux IGFBP et les protéases.
(D'après Monget et Monniaux)

Monniaux, 1995). Le récepteur de type II ou récepteur de l'IGF-II-mannose-6-phosphate (IGF-II-M6P) lie les IGF-II et toutes les molécules qui possèdent des résidus de mannose-6-phosphate, comme les enzymes lysosomales et la TGF- β 1 (voir figure 3; Nissely et Kiess, 1991; Monget et coll., 1996). Ce récepteur ne lie pas l'insuline, mais il lie l'IGF-I avec une affinité très faible. Il est improbable que le récepteur IGF-II-M6P soit le médiateur de l'action de l'IGF-I *in vivo*.

Il existe six types de protéines de liaison des IGF (IGFBP) qui lient l'IGF-I et II avec une grande affinité (voir figure 3; Rechler, 1993). Les IGFBP se retrouvent dans tous les liquides biologiques et on les a classées arbitrairement en deux groupes.

a) Les IGFBP-1, -2, -4, -5 et -6, sont visualisés par technique de buvardage de Western. Leurs poids moléculaire varie entre 24 et 35kDa. Ces protéines de liaisons se retrouvent dans le sérum et les autres liquides formant ce qu'on appelle des petits complexes. Dans le sérum, leur concentration est négativement corrélée (i.e. IGFBP-1 et -2) ou non sont pas affectées régulées par l'hormone de croissance (GH) (Monget et Monniaux, 1995).

b) IGFBP-3 est la principale protéine de liaison des IGF dans le sérum, Elle s'y présente sous forme d'une protéine de 150kDa formant ainsi un gros complexe composé de l'IGF-I ou l'IGF-II et une sous-unité d'acide-labile de 85kDa. La protéine originale de l'IGFBP-3 est visualisée par la technique de buvardage de type Western sous forme de doublet de 42 et 44kDa. La concentration de l'IGFBP-3 est régulée positivement par l'hormone de croissance (GH) et l'IGF-I (Monget et Monniaux, 1995). Comme celle des IGF, l'expression spatiale de ces protéines de liaisons dans les follicules ovariens est en grande partie spécifique à l'espèce. Par exemple, chez la vache (Armstrong et coll., 1996a) et la brebis (Besnard et coll., 1996 a, b) l'expression de l'ARNm qui code pour l'IGFBP-4 et -2 dans l'ovaire est limitée aux tissus de la thèque interne et la granulosa. Par contre, l'expression de l'ARNm qui code pour l'IGFBP-4 dans l'ovaire de la truie est attribué principalement aux cellules de la granulosa (Grimes et coll., 1994).

En général, les concentrations d'insuline, de l'IGF-I et de l'IGF-II sont équivalentes entre le liquide folliculaire et le plasma (Hammond et coll., 1988; Jesionowska et coll., 1990; Samaras et coll., 1994). Des études réalisées *in vivo* chez la vache, la truie et la brebis, ont montré que la concentrations des IGF dans les petits follicules ou follicules antraux ($\leq 4\text{mm}$) est plus faible que celle des grands follicules (\geq

5mm) (Hammond et coll., 1988; Spicer et Enright 1991; Spicer et coll., 1992; Echtenkamp et coll., 1994) et que la concentration de l'IGF-I est en corrélation positive avec le diamètre folliculaire chez la vache (Spicer et coll., 1988; Echtenkamp et coll., 1990; Spicer et Enright, 1991). Par contre, la concentration des IGF-II est un peu plus élevée dans les petits follicules que dans les gros follicules chez la vache et la brebis (Spicer, et coll., 1995).

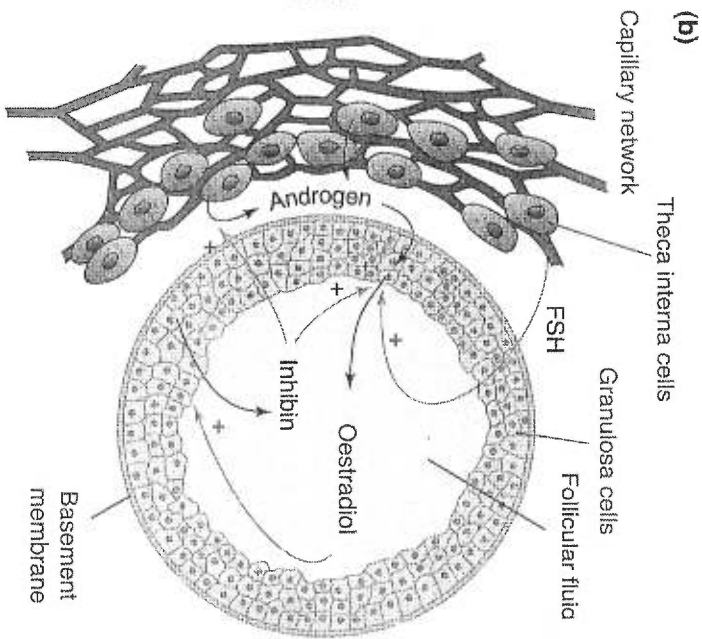
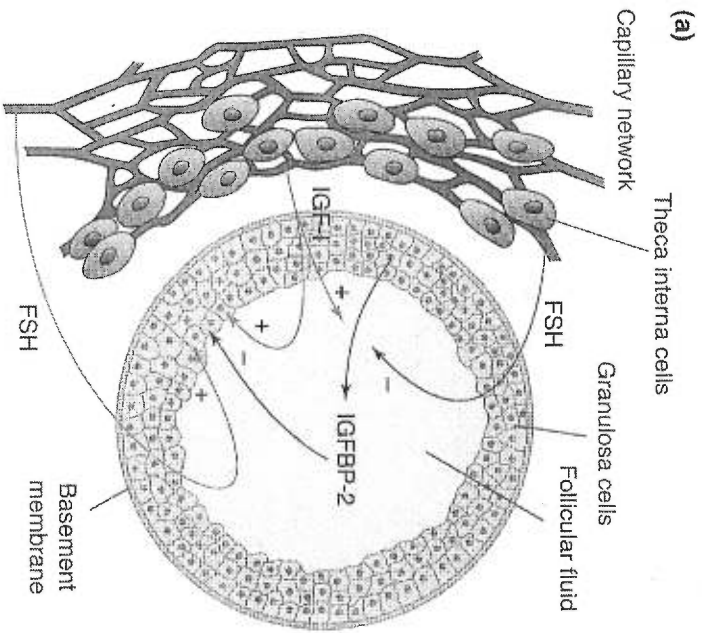
Les effets de l'insuline, l'IGF-I et l'IGF-II sur la production des œstrogènes varient selon l'espèce. Par exemple, chez le rat et les primates, des études indiquent que l'insuline, l'IGF-I et l'IGF-II peuvent stimuler la production *in vitro* de l'œstradiol par les cellules de la granulosa via le récepteur de type I (Giudice, 1992; Kamada et coll., 1992; Shaw et coll., 1993). Cependant, chez la vache, l'insuline apparaît plus puissante et plus efficace comme stimulatrice de la production de l'œstradiol que l'IGF-I (Saumande 1991; Spicer et coll., 1993; Gong et coll., 1994). En réalité, IGF-I n'a pas d'effet ou inhibe la production basale d'œstradiol et celle induite par la FSH au niveau des cellules de la granulosa des petits follicules (i.e. 1-5mm). Toutefois, l'IGF-I possède un faible effet stimulateur sur la production de l'œstradiol par les cellules de la granulosa des grands follicules (i.e. ≥ 8 mm) (Spicer et coll., 1993; Gong et coll., 1994). D'autres travaux réalisés *in vitro* sur les cellules de la granulosa de la brebis (Campbell et coll., 1996), de la truie (Howard et coll., 1994) et de la vache (Gutiérrez et coll., 1997) démontrent que l'IGF-I a des effets stimulateurs sur l'activité aromatasase au niveau des cellules de la granulosa et sur la prolifération cellulaire. Plusieurs études chez les mammifères tels que la vache et la truie, ont démontré que l'insuline, IGF-I et IGF-II stimulent la production de la progestérone par les cellules de la granulosa dans un ordre de potentialité croissant IGF-I > IGF-II > Insuline (Monniaux et Pisselet 1992; Spicer et coll., 1993). Chez la vache et la brebis un traitement à la FSH augmente la stimulation de l'IGF-I sur la synthèse de la progestérone (Monniaux et Pisselet 1992; Spicer et coll., 1993). Chez la brebis, il apparaît que les cellules de la granulosa des gros follicules (5-7mm) répondent bien mieux à l'IGF-I en terme de production de la progestérone que celles des petits follicules (1-2mm) (Monniaux et Pisselet, 1992; Monniaux et coll., 1994).

En ce qui concerne la production des androgènes, l'insuline et IGF-I ont un effet stimulateur sur l'induction de LH pour la biosynthèse des androgènes par les cellules de la thèque interne chez la truie (Caubo et coll., 1989; Morley et coll., 1989), la rate (Hernandez et coll., 1988; Magoffin et Weitsman 1993a) et la femme (Bergh et coll., 1993). Le mécanisme par lequel l'IGF-I stimule la production des androgènes et la

progestérone par les cellules de la thèque chez la rate via la LH serait par la stimulation des ARNm des cellules de la thèque qui codent pour la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (Magoffin et Weitsman, 1993a), la P450_{scc} et la 17 α -hydroxylase (Magoffin et coll., 1990; Magoffin et Weitsman, 1993b).

Dans les systèmes de cultures de cellules ovariennes examinés jusqu'à maintenant, les IGFBP atténuent les effets des IGF (Monget et coll., 1993). Toutefois, une diminution de la production des IGFBP folliculaires entraîne une augmentation de l'activité biologique des IGF produits localement, ce qui entraîne une augmentation de la sensibilité des follicules aux gonadotrophines. Les mécanismes par lesquels la régulation des concentrations des IGFBP-2, -4 et -5 dans le liquide folliculaire du follicule dominant et des follicules subordonnés restent inconnus. Toutefois, plusieurs mécanismes peuvent être impliqués (Liu et coll., 1993) et sous la régulation de la FSH qui peut stimuler la production des protéases qui cindent les IGFBP -2, -4 et -5 sous forme de fragments de faible poids moléculaire qui ne peuvent se lier aux IGF contenus dans le liquide folliculaire (Liu et coll., 1993). Pour vérifier cette hypothèse, des études sur des cultures de cellules de la granulosa de rate indiquent clairement que la FSH stimule la production des protéases qui dégradent les IGFBP-2, -4 et -5 dans le milieu de culture (Liu et coll., 1993). D'autres études *in vitro* en utilisant des cellules de granulosa dans un milieu de culture sans sérum, ont démontré que la FSH, à une concentration physiologique, inhibe l'expression de l'ARNm qui code pour l'IGFBP-2 (Armstrong et coll., 1996b). Ces résultats démontrent qu'au cours du développement de la dominance folliculaire chez la vache, l'inhibition de l'expression de l'ARNm qui code pour l'IGFBP-2 serait dépendante de la concentration de la FSH dans le liquide folliculaire ovarien. Cependant, une augmentation de la bioactivité des IGF au sein de ces follicules devrait augmenter la réponse des cellules de la granulosa à la FSH (voir figure 4).

Figure 4. Représentation schématique du modèle de rétrocontrôle intrafolliculaire positif et négatif chez les ruminants. a) montre la production de l'IGFBP-2 par les cellules de la granulosa est régulée par IGF-I et FSH. b) la production de l'inhibine est stimulée par les androgènes et les œstrogènes. En retour l'inhibine stimule la production de l'œstradiol par le biais de la FSH. (D'après Armstrong et Webb, 1997).



2.4.1.2.2 Famille du facteur de croissance epidermal (EGF)

L'EGF et son homologue structural le TGF- α sont des facteurs mitogène qui agissent via un récepteur membranaire commun spécifique aux cellules de la granulosa chez la vache et la brebis (Armstrong et Webb, 1997). Comme pour la FGF, la TGF- α stimule la prolifération des cellules de la thèque interne et les cellules de la granulosa. Il inhibe aussi la différenciation des cellules de la thèque interne stimulées par les gonadotrophines (Roberts et Skinner, 1991). L'ARNm qui code pour la TGF- α est exprimé dans la thèque interne chez la vache. Toutefois, Campbell et coll., 1994 ont démontré suite à l'utilisation du modèle d'autotransplantation chez la brebis, ils ont remarqué que la TGF- α plasmatique avait une action inhibitrice sur la sécrétion de l'œstradiol, androsténédionne, l'inhibine et stimule la sécrétion de la progestérone. Ces résultats démontrent que le TGF- α sécrété par les cellules de la thèque interne, stimule la prolifération des cellules de la granulosa via une voie paracrine. Chez la brebis Murray et coll. (1993) ont démontré aussi que l'EGF agit directement au niveau des ovaires en inhibant la sécrétion de l'œstradiol, l'inhibine et augmente la sécrétion de la progestérone.

Ces facteurs de croissance sont synthétisés sous forme d'un précurseur glycosylé de haut poids moléculaire et d'une région membranaire hydrophobe. Les formes membranaires dentées de l'EGF et le TGF- α peuvent stimulées par voie juxtacrine les récepteurs de l'EGF des cellules adjacentes. Dans l'ovaire, la voie juxtacrine est probablement impliquée dans la restriction de l'expression des gènes dans un groupe de cellules au sein d'un tissu particulier (Armstrong et Webb, 1997).

2.4.1.2.3. Famille du facteur de croissance fibroblastique (FGF)

Les FGF appartiennent à la famille des hormones de croissance qui se lient à l'héparine et dont les effets sont modulés via les récepteurs de la tyrosine kinase (Fering et Gallagher, 1994). Dans l'ovaire le FGF-2 (FGF basique) est celui qui a été le plus étudié dans ce groupe. Chez la vache, la production de cette hormone de croissance se fait par les cellules de la granulosa (Neufield et coll., 1987) et il a été démontré que ce facteur de croissance stimule la prolifération des cellules de la thèque interne (Spicer et Stewart, 1996). L'activité immunohistochimique de la FGF-2 a aussi été détectée au niveau des follicules de souris (Wordinger et coll., 1993) et ce facteur de croissance inhibe l'induction de l'expression des récepteurs de la LH au niveau des cellules de la granulosa et réduit la liaison spécifique de l'IGF aux cellules de la thèque

interne. Les FGFs sont des facteurs angiogènes potentiels en vertu de leur effet stimulateur sur la prolifération des cellules endothéliales. Cependant, leur rôle précis comme régulateur de l'angiogénèse dans l'ovaire reste incertain (Redmer et Reynolds, 1996).

Les FGF ont une grande affinité pour les molécules de sulfate d'héparine (HS) au niveau de la matrice extracellulaire (ECM) et des membranes plasmiques. L'association des FGF avec la matrice est considérée comme un complexe clé dans la régulation de leur activité (Armstrong et Webb, 1997). Cependant, il apparaît que l'attachement des FGF avec la sulfate d'héparine est une nécessité préalable à l'activité biologique normale (Armstrong et Webb, 1997). À titre d'exemple, le potentiel du FGF-1 est 100 fois plus grand en présence de l'héparine (Thorton et coll., 1983). L'interaction du FGF-2 avec le sulfate d'heparine dans la matrice est nécessaire pour la fixation du FGF aux récepteurs (Yayon et coll., 1991). La variation de l'interaction des isoformes du FGF avec la matrice peut réguler à la fois, la stabilité et les propriétés de diffusion des facteurs de croissance (Armstrong et Webb, 1997). L'association des molécules solubles de l'héparine aux FGF inhibe la liaison subséquente des FGF à la matrice pour faciliter leur diffusion du tissu où ils ont été synthétisé (Flaumenhaft et coll., 1990). La sulfatation de l'héparine serait très importante pour le contrôle de la fixation de l'FGF à la matrice et aux membranes cellulaire (Fering et Gallagher, 1994).

2.4.1.2.4 Famille du facteur de croissance transformant- β (TGF- β)

La superfamille des TGF- β est composée d'un groupe de protéines de structure apparentées, qui règlent la croissance, la différenciation, le mouvement, (ex.: des spermatozoïdes), l'organisation et la mort cellulaire. Leurs effets sont observées depuis les premiers stades de l'embryogénèse jusqu'aux tissus adultes incluant la formation et la fonction de multiples organes tels que le cartilage, l'os, les organes sexuels, les systèmes endocrinien et immunitaire (Roberts et Sporn, 1991; Massagué, 1990). Certains auteurs suggèrent que la TGF- β serait un peptide ayant de multiple fonctions selon les conditions expérimentales. *In vitro*, il stimulerait ou inhiberait la prolifération, la différenciation ou l'activité cellulaire (Sporn et coll., 1986).

Chez la vache, la TGF- β agit comme un inhibiteur de la prolifération des cellules de la granulosa et de la thèque interne mais augmenterait la stimulation de la stéroïdogénèse par les gonadotrophines (Roberts et Skinner 1991).

La famille des TGF- β comprend plusieurs membres d'étroite parenté et un nombre croissant de polypeptides de structure plus éloignée. Actuellement, six TGF- β homologues sont connus: les TGF- β -1, -2, -3, -4, -5, -6 (Goddard et Benahmed, 1994). Parmi les analogues structuraux de la TGF- β nous trouvons l'inhibine (Mason et coll., 1985), l'activine (Vale et coll., 1986) l'hormone anti-müllérienne (Cate et coll., 1986; Josso, 1986) et la sous famille vgr-1, aussi nommée protéine-6 de la morphogénétique osseuse (BMP-6), les produits du complexe décapéptaplégique de la drosophile (Padgett et coll., 1987) et les facteurs morphogénique de l'os.

L'expression de l'ARNm de la TGF- β et sa protéine a été démontrée au niveau des cellules de la thèque interne, de la granulosa et des cellules lutéales, avec une augmentation relative de leurs concentration en fonction du stade de développement du follicule (Hernandez et coll., 1990; Chegini et Williams 1992). Feng et coll. (1988), ont démontré chez la rate que le TGF- β *in vitro* stimule la maturation de l'ovocyte et le complexe cumulus-oophorus. Toutefois, le TGF- β n'a aucun effet sur un ovocyte dénudé, ceci implique que le facteur de croissance agit sur la maturation de l'ovocyte par l'intermédiaire des cellules du cumulus oophorus qu'il l'entoure. Des études réalisées par Tsafiriri et coll. (1989), démontrent qu'un cotraitement de la LH avec le TGF- β et l'inhibine, inhibent partiellement l'induction de la méiose par la LH du follicule entourant un ovocyte. Ces résultats s'expliquent par le fait que les facteurs de croissance et les protéines analogues à l'inhibine sont synthétisés par les cellules folliculaires peuvent jouer un rôle important dans la régulation du développement et l'activité de ces follicules.

En plus de son effet sur la développement des cellules de la thèque interne et de la granulosa, le TGF- β agit comme modulateur de l'expression des récepteurs de la FSH et de la LH qui, en retour, régularisent l'expression du TGF- β 1 mais pas du TGF- β 2 (Mulheron et coll., 1992; Roy et coll., 1992; Gitay-Goren et coll., 1993; Dunkel et coll., 1994). Il a été aussi démontré que la TGF- β module la production basale de l'œstradiol et celle induite par les gonadotrophines (Juneja et coll., 1996), l'expression de la P450_{sc}, de la P450_{c17}, le cytochrome P450_{arom} et la production basale de l'inhibine et celle induite par la FSH (Juneja et coll., 1996). D'autres travaux démontrent que le TGF- β module la production des androgènes, de la progestérone et de la testostérone induite par l'action de LH et l'effet inhibiteur de l'EGF sur la production de l'inhibine induite par la FSH (Knecht et coll., 1987; Magoffin et coll., 1989; Hernandez et coll., 1990). En plus de stimuler la croissance et la différenciation d'une variété de cellule, les TGF- β sont impliqués dans le remaniement des tissus par l'intermédiaire de la

régulation de l'expression, la déposition et de la dégradation de la matrice (Bernard et coll., 1990; Matrisian, 1990).

Les TGF- β sont synthétisés par une grande variété de types de cellules *in vitro* et sont sécrétés sous forme de composés biologiquement inactifs. Toutefois ils sont activés en s'attachant à leurs récepteurs (Bernard et coll., 1990; Sato et coll., 1990). Les TGF- β interagissent avec au moins trois protéines de liaison différentes au niveau de la surface des cellules tels que les cellules de la théque, les cellules de la granulosa et les cellules lutéales. Ces protéines sont désignées comme récepteurs de la TGF- β de type-I (50kDa), de type-II (75kDa) et de type-III (bétaglycane, endogline, 300kDa). Le type-III est un protéoglycane membranaire qui peut être indirectement impliqué dans le signal de transduction en présentant les ligands aux récepteurs de type-I et de type-II qui sont les plus importants dans le signal de transduction (Attisano et coll., 1993).

2.4.1.3 Famille des inhibines et activines

2.4.1.3.1 Les inhibines

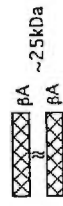
2.4.1.3.1.1 Synthèse et structure des inhibines

L'inhibine a été proposée pour la première fois par McCullagh (1932), comme un extrait hydrosoluble d'origine testiculaire bovine qui a la capacité de supprimer l'hypertrophie de la glande pituitaire suite à une castration. L'inhibine a été mise en évidence à partir d'extraits du liquide folliculaire ovarien (de Jong et Sharpe 1976), du plasma séminal (Franchimont, 1972), du liquide du réseau testiculaire (Setchell et Jacks, 1974; Baker et coll., 1976) et des extraits testiculaires (Keogh et coll., 1976) et ont démontrés qu'elle avait une action suppressive sur la sécrétion de la FSH par la glande pituitaire.

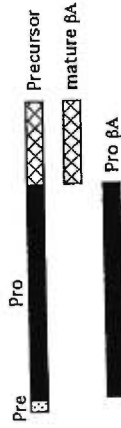
L'inhibine a été isolée du liquide folliculaire bovin et porcin et partiellement séquencée (Robertson et coll., 1985; Miyamoto et coll., 1985; Ling et coll., 1985; Rivier et coll., 1985). Ils ont établi que les inhibines étaient des glycoprotéines hétérodimères constituées de l'assemblage d'une sous-unité glycosylée α (133 acides aminés) et d'une sous-unité non glycosylée: β A ou β B (116 ou 115 acides aminés). On distingue donc l'inhibine A [α et β A] et l'inhibine B [α et β B]. Les deux sous-unités sont liées entre elles par des ponts disulfure (voir figure 5; revue par Ying, 1988). Le clonage subséquent des gènes codant pour les sous-unités α et β a démontré que la forme d'inhibine 32kDa est un produit tronqué de la forme 58kDa obtenu par coupure du segment terminal NH_2 de la sous-unité α (Mason et coll., 1985; Forage et coll., 1986).

Figure 5. Représentation schématique de la structure des différentes formes d'inhibine (i.e. sous-unités α libres et dimères α et β) et d'activine. (D'après Knight, 1996).

activin A



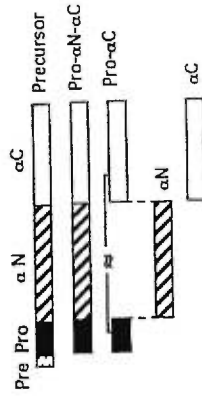
inhibin/activin βA subunit



activin AB



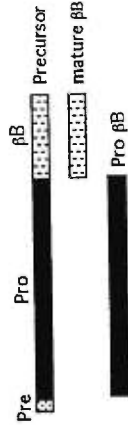
inhibin α subunit



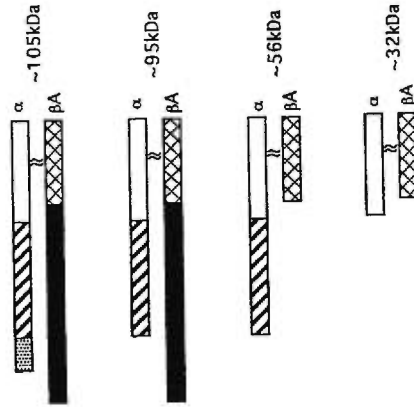
activin B



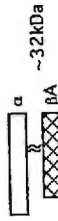
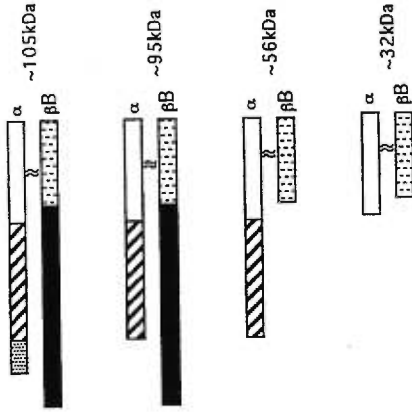
inhibin/activin βB subunit



inhibin A forms



inhibin B forms



2.4.1.3.1.2 Structure des gènes

Sur le plan génomique, les trois sous-unités sont codées par différents gènes localisés sur le chromosome 2 (gène α et gène β B) ou le chromosome 7 (gène β A; Mason et coll., 1987; Barton et coll., 1989). On sait que la partie promotrice des gènes des sous-unités α et β A renferme une boîte octamère (CRE) répondant à l'AMPc et contenant des séquences de nucléotides reconnaissant les facteurs de transcription activés par la signalisation intracellulaire qui est dépendante de l'AMPc. Au contraire, une telle boîte CRE est absente du gène codant pour la sous-unité β B (Dykema et Mayo, 1994). Une similitude significative existe entre les structures des sous-unités α et β au sein et entre les différentes espèces (Mason et coll., 1987; Forage et coll., 1986; Woodruff et coll., 1987; Leversha et coll., 1987). La structure des exons et des introns des gènes codant pour chaque sous-unités est très conservée entre les espèces. Le gène codant pour la sous-unité α humaine contient un intron de 2.1kb qui divise la région codant (Mason et coll., 1987) tandis que la sous-unité α bovine contient un intron de 1.7kb (Stewart et coll., 1986). Un seul intron d'approximativement 10kb a été identifié dans le gène codant pour la sous-unité β A chez l'espèce humaine et bovine (Stewart et coll., 1986). Mason et coll. (1989) ont décrit la séquence complète du gène codant pour la sous-unité β B humaine et ils ont remarqué qu'elle contient un intron de 2.5kb. Cette conservation de la structure génomique est supportée par le fait que les résidus de cystéine sont très conservés entre les trois sous-unités: ces trois protéines apparentées auraient donc une origine commune (Baird et Smith, 1993).

2.4.1.3.1.3 Isolement et caractérisation des formes d'inhibine

Des résultats de la purification des liquides folliculaires chez la truie (Miyamoto et coll., 1985; Ling et coll., 1985; Rivier et coll., 1985), la vache (Robertson et coll., 1985, 1986; van Dijk et coll., 1985; Miyamoto et coll., 1986), la brebis (Dobos et coll., 1983; Leversha et coll., 1987) et la femme (Hasegawa et coll., 1991) montrent que l'inhibine existe sous plus de six formes de dimères bioactifs qui diffèrent par leur poids moléculaires. On ne dispose toujours pas d'analyse comparative détaillée sur la nature des formes d'inhibine dans le liquide folliculaire humain en raison des faibles concentrations de ces dernières (1-5%) par rapport à ce qu'on retrouve dans le liquide folliculaire de la vache (van Dijk et coll., 1985; Robertson et coll., 1990).

Robertson et coll. (1985) ont purifié et homogénéisé du liquide folliculaire bovin. Ils ont remarqué la présence d'une glycoprotéine de poids moléculaire de 58kDa

composée respectivement de deux sous-unités α et β de 43kDa et de 15kDa. Toutefois, une simple précipitation à pH acide en cours de purification leur a permis d'isoler une autre forme d'inhibine de 31kDa (Robertson et coll., 1986). Ils ont alors suggéré que ces petites formes d'inhibine étaient le produit d'une coupure de la sous-unité α de 43kDa en une sous-unité α de 20kDa et de 15kDa. Les mêmes formes ont été isolées du liquide folliculaire par Fukuda et coll. (1986). Miyamoto et coll. (1986), en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre l'inhibine bovine de 32kDa, ont pu identifier dans le liquide folliculaire de la vache les autres formes d'inhibine qui diffèrent par leur poids moléculaire: 32kDa, 55kDa, 65kDa, 88kDa, 108kDa et 120kDa. Les formes 65, 55 et 32kDa ont une structure dimère. Par ailleurs, Miyamoto et coll. (1986) ont remarqué que les formes d'inhibine de poids moléculaire plus élevé, soit de 120, 108 ou 88kDa, sont composées de trois sous-unités polypeptidiques. c'est à dire d'un polypeptide de 62kDa immunologiquement apparenté à l'unité de 32kDa de l'inhibine de bFF, qui est relié par des ponts disulfure à des formes plus légères d'inhibine composées de 2 sous-unités. Ces observations suggèrent que la formation des complexes précurseurs des sous-unités pourrait être cruciale et que des coupures protéolytiques limitées seraient suffisantes pour générer les différentes formes d'inhibines dans le bFF.

Des résultats issus des travaux publiés par Ireland et coll. (1994) et par Good et coll. (1995) démontrent la présence de neuf formes d'inhibines qui diffèrent par leur poids moléculaires dans le liquide folliculaire bovin. Good et coll. (1995) démontrent la présence d'une forme d'inhibine de structure monomère (i.e. sous-unité α) de 29kDa dépourvue d'activité biologique et huit dimères de poids moléculaires différents (34, 49, 53, 58, 77, 88, 110 et >160kDa qui sont biologiquement actifs. Toutefois, Ireland et coll. (1994) rapportent à peu près les mêmes formes d'inhibine, en précisant qu'il existe trois formes monomères (29, 48, et 49kDa) dépourvues d'activité biologique et six formes dimères (34, 58, 68, 77, 122 et >160kDa) et biologiquement actifs. Sunderland et coll. (1996) ont démontré d'après qu'il existe réellement sept formes d'inhibine dont une forme de structure monomère et biologiquement inactif de 29kDa et six formes dimères de 34, 49, 58, 77, 110 et >160kDa. Les formes d'inhibine de faible poids moléculaire (29 et 34kDa) comptent pour un petit pourcentage de (1 à 15%), tandis que les formes ayant des précurseurs de poids moléculaire plus élevé comptent pour la majorité des inhibines totales dans le liquide folliculaire (Sunderland et coll., 1996). Il est généralement connu que les cellules de la granulosa particulièrement chez la vache et la femme, synthétisent beaucoup plus de sous-unités α libres que de sous-unités β libres (Bicsak et coll., 1988; Igarashi et sugino, 1989; Knight et coll., 1989,

1991; Schneyer et coll., 1990). Plusieurs formes de sous-unités α monomères libres ont été identifiées et/ou isolés dans le liquide folliculaire y compris le pro- α N α C (précurseur mature de la sous-unité α) et les fragments α N α C, pro- α C, α C et le α N, qui sont issus du processus protéolytique du précurseur mature (voir figure 4; Bicsak et coll., 1988; Knight et coll., 1989; Hopko-Ireland et coll., 1994; Miyamoto et coll., 1986; Robertson et coll., 1989; Sugino et coll., 1989). Aucune des formes de sous-unités α libres isolées à ce jour ne possède une activité biologique classique similaire à celle de l'inhibine dimère (i.e. suppression de la sécrétion de la FSH par la glande pituitaire). Toutefois, il y a des indications montrant que le précurseur de la sous-unité α (i.e. pro- α C α N) peut agir comme un compétiteur avec la FSH sur son propre récepteur de sorte qu'il entraîne une diminution de l'action biologique de la FSH sur les cellules de la granulosa (Schneyer et coll., 1991). Ainsi, la concentration intrafolliculaire du précurseur α serait un bon facteur de détermination si le follicule a achevé sa réponse à la FSH systémique. Autre produit issu de la traduction du précurseur de la sous-unité α , le fragment α N peut avoir un rôle intrafolliculaire local en facilitant l'ovulation (Findlay et coll., 1989). Une immunisation active contre le fragment de la sous-unité α N chez la brebis, favorise la fertilité chez la brebis qui s'explique par une augmentation du nombre d'agneaux (Wrathall et coll., 1992; Fray et coll., 1994). Toutefois, l'immunisation n'a aucun effet défavorable sur le temps ou l'amplitude du pic FSH/LH préovulatoire ou le profil de la progestérone plasmatique durant le cycle (Findlay et coll., 1989).

2.4.1.3.1.4 Les méthodes de détermination des inhibines

2.4.1.3.1.4.1 Essai radioimmunologique (RIA)

Le dosage des formes d'inhibine par la méthode radioimmunologique (RIA) dans les liquides biologiques s'avère très compliqué, principalement en raison de la présence de plusieurs variétés d'inhibine monomère (voir figure 4), qui ont une réaction croisée avec l'antisérum utilisé dans le dosage. Trois types de dosage immunologique ont été développés jusqu'à présent.

Le premier type d'essai est basé sur un antisérum dirigé contre la région terminale de l'amine synthétique (acides aminés 1-26, 1-30 et 1-32) de la sous-unité α de la forme 20kDa d'inhibine. Les résultats sont exprimés en terme de masse du peptide synthétique (Rivier et coll., 1986; Schanbacher, 1988; Sharpe et coll., 1988; Knight et coll., 1989; McNeilly et coll., 1989; Sinosich et coll., 1991). Dans cette essai on utilise

un peptide avec une amine terminale marquée à l'iode 125 (^{125}I) comme traceur. Cet essai peptidique détecte aussi bien la sous-unité α monomère que le dimère. La réaction croisée entre l'activine, la TGF- β et l'hormone antimüllérienne est assez faible avec ce type d'essai. Toutefois, cet essai n'est pas assez sensible et spécifique pour doser les formes d'inhibine dans la circulation sanguine chez la femme.

Le second méthode de détermination de l'inhibine a été développé par Knight et coll. (1991), repose sur un complexe immunoradiométrique en phase liquide (IRMA). Dans ce type d'essai, on utilise deux sortes d'anticorps. Le premier est un antisérum dirigé contre la sous-unité α de l'inhibine. Ce dernier est produit par immunisation d'une brebis ovariectomisée contre le peptide synthétique qui correspond à la séquence N-terminal (1-32) de la sous-unité α de l'inhibine couplée avec une protéine purifiée qui dérive de la tuberculine (PPD) (Knight et coll., 1989). Le deuxième est un anticorps monoclonal porcine spécifique de la sous-unité β de l'inhibine, et dirigé contre la séquence peptidique qui correspond à la région C-terminal (82-114) de la sous-unité βA de l'inhibine humaine couplée à la PPD (Groome et Lawrence, 1991). Cet essai a été mis au point afin de doser les formes d'inhibine dans le liquide folliculaire bovin, le liquide folliculaire humain et des extraits d'ovaire de rat. Cependant, il n'est pas assez sensible pour doser les différentes formes d'inhibine dans la circulation sanguine et les échantillons de sang veineux ou reconnaître certaines formes d'inhibine de poids moléculaire élevé et actives biologiquement.

Le troisième type d'essai est de type ELISA et il a été développé par Groome et O'Brien (1993). Son principe consiste à utiliser deux anticorps: un anticorps monoclonal immobilisé (E4) ou anticorps de capture dirigé contre le peptide synthétique correspondant à la séquence d'acides aminés 82-114 de la sous-unité βA mature (Groome et Lawrence, 1991). La fraction Fab du deuxième anticorps monoclonal R1 produit chez la souris est dirigé contre la portion N terminale de la sous-unité α de 20kDa. L'anticorps est conjugué à l'alkaline phosphatase, qui agit comme système de détection. Le seuil de détection de l'inhibine dimère dans le sérum ou bien dans le plasma est de 2pg/ml avec une très faible réaction croisée avec l'activine et l'inhibine monomère de l'ordre de 0.05% (Groome et O'Brien., 1993). En utilisant ce type de dosage, Muttukrishna et coll. (1995) ont dosé la concentration de l'inhibine A dans le sérum de la femme au moment de son cycle menstruel normal et durant sa période de gestation, chez la rate au cours de son cycle œstral (Fahy et coll., 1995) et chez une vache superovulée (Price et coll., 1995).

2.4.1.3.1.4.2 Dosage biologique

Le dosage des différentes formes d'inhibine repose sur l'utilisation en culture d'une couche de cellules dispersées provenant de la glande pituitaire d'une rate ou d'une brebis dans laquelle on dose par RIA la quantité de FSH contenue dans les cellules pituitaire (Scott et coll., 1980; Scott et Burger, 1981) et la quantité de FSH et de LH libérée dans le milieu de culture (Steinberger et Steinberger, 1976; Tsonis et coll., 1986, Robertson et coll., 1986) ou encore la sécrétion de LH et de FSH en réponse à une stimulation à la GnRH (de Jong et coll., 1979; Eddie et coll., 1979). Il y a plusieurs complications associées à l'utilisation de cet essai biologique. Les cellules en culture issues de la glande pituitaire d'une rate sont relativement insensibles, donc elles ne sont pas appropriées pour la dosage des diverses formes d'inhibine plasmatique (Baird et Smith, 1993). Toutefois, suivant un ordre de magnitude, on a remarqué que les cellules de la glande pituitaire de brebis sont plus sensibles et reconnu (Tsonis et coll., 1986) pour doser l'activité des formes d'inhibine dans la circulation et le plasma veineux ovarien. Afin de prévenir l'effet des stéroïdes sur la sécrétion de la FSH par les cellules pituitaire en culture, tous les échantillons utilisés doivent être dépouillés de tout contenu en stéroïdes (Eddie et coll., 1979). Il est possible que la présence des activines et des follistatines puissent influencer les résultats obtenus suite à l'utilisation du dosage biologique. La follistatine (FSP) n'a pas de réaction croisée avec les antisérums utilisés dans l'essais radioimmunologique des inhibines (Robertson et coll., 1987) et les concentrations de l'activine et de la FSP des extraits ovariens et testiculaires sont plus faibles (10-20%) que celle de l'inhibine, suggérant ainsi que le dosage biologique utilisé pour estimer l'activité des formes d'inhibine n'est pas remarquablement influencé par la FSP (Robertson, 1990).

2.4.1.3.1.5. Biosynthèse des formes d'inhibine

De Jong et Sharpe, (1976) ont démontré que le liquide folliculaire est une source potentielle des inhibines. Deux années après cette découverte, Erickson et Hsueh, (1978) démontrent que les cellules de la granulosa sont le site majeur de biosynthèse des molécules d'inhibine.

Suite à cela, un grand nombre de résultats obtenus par le biais de l'utilisation respective des méthodes de dosage biologique *in vitro* et d'essai radioimmunologique chez la rate (Hermans et coll., 1982; Croze et Franchiment, 1984 a, b; Sander et coll., 1984, Bicsak et coll., 1986, Zhang et coll., 1987 a, b), la vache (Henderson et

Franchiment, 1981; Wrathall et Knight, 1993), la truie (Channing et coll., 1982; Lindsell et coll., 1994), la femme (Channing et coll., 1984; Tsonis et coll., 1987; Rabinovici et coll., 1991), la brebis (Carson et coll., 1979; Campbell, 1989; Campbell et coll., 1996) et chez les primates (Noguchi et coll., 1987, Rabinovici et coll., 1991), ont apporté ainsi des évidences confirmant les premières observations. Robertson et coll. (1988) et Illingworth et coll. (1991) ont démontré suite à une ovariectomie chez la rate ou une ablation du corps jaune chez la femme, que la concentration de l'inhibine chute drastiquement. Ces résultats indiquent clairement que les ovaires et le corps jaune chez la femme et les primates sont le site le plus important de synthèse et de sécrétion des inhibines.

D'autres résultats, obtenus suite à une localisation cytoplasmique de l'ARNm qui code pour les protéines des sous-unités α et β des inhibines chez la vache indiquent clairement que les cellules de la granulosa sont le site de la production des inhibines dans l'ovaire (Torney et coll., 1989). L'expression des sous-unités α et β des inhibines/activines et l'ARNm codant pour les protéines des deux sous-unité α et β des inhibines a été détectée dans les cellules de la thèque interne chez la rate (Jih et coll., 1993), la femme (Roberts et coll., 1993) et les primates (Schwall, et coll., 1990), les cellules de la granulosa luteinisées du corps jaune chez la femme (Davis et coll., 1987; Roberts et coll., 1993), les primates (Fraser et coll., 1992 et 1995), dans le trophoblaste du placenta et la membrane déciduale chez la femme (Petraglia et coll., 1987, 1990), dans les cellules de Sertoli et de Leydig chez le rat (Risbridger et coll., 1990; Roberts et coll., 1989) et dans les tissus nonreproducteurs tels que le cortex surrénalien chez le mouton (Crawford, et coll., 1987) et la glande pituitaire antérieure, la moelle rouge des os, le cerveau et la colonne vertébrale chez la rate (Meunier, et coll., 1988; Sawchenko, et coll., 1988) et la brebis (Peeters et coll., 1997).

Des études ont démontré que gonades fœtales d'origine bovine contiennent un certain nombre de composés d'inhibine biologiquement et immunologiquement actifs. Chez les deux sexes, on a identifié les protéines de 28 et 30kDa qui ont des propriétés similaires à celle de la protéine d'inhibine bovine purifiée de 31kDa (Torney, et coll., 1992). De plus, des extraits de testicules de fœtus contiennent une large quantité de protéines d'inhibine immunologiquement actives qui sont probablement des fragments des précurseurs de la sous-unité α (Torney et coll., 1992). Selon Rabinovici et coll. (1991) la méthode de la cytochimie immunitaire permet de démontrer la présence des sous-unités α et β des inhibines et des activines dans les testicules fœtaux humains à mi-terme.

2.4.1.3.1.6 Les facteurs de régulation de la production de l'inhibine

Des expériences impliquant l'administration des gonadotrophines exogènes chez la rate (Hasegawa et coll., 1988; Lee et coll., 1982; Rivier et coll., 1986; Toebosch et coll., 1988; Fahy et coll., 1995), la brebis (Campbell et coll., 1991), la vache, la truie (Taya et coll., 1991) et la femme (McLachlan et coll., 1986; Muttukrishna et coll., 1994) ou l'immunoneutralisation des inhibines avec des anticorps dirigés contre la sous-unité α chez la brebis (Wrathall, 1990-1992; Fray et coll., 1994) et la vache (Glencross et coll., 1992), démontrent que la production des inhibines par les ovaires est positivement régulée par la FSH. Ces observations *in vivo* sont supportées par des expériences *in vitro* qui démontrent que l'effet de stimulation de la FSH sur les cellules de la granulosa isolées est simulé par des composés qui font augmenter les concentrations de l'AMPc intracellulaires (Bisack et coll., 1988; Hillier et coll., 1989; LaPolt et coll., 1990; Turner et coll., 1989), parce que les régions promotrices des gènes des sous-unités α et β chez la rate, possèdent des éléments de réponse à l'AMPc qui sont compatibles avec l'implication de l'AMPc (Mayo, 1994).

Chez quelques espèces, la rate (Bisack et coll., 1986) et la femme (Hillier et coll., 1991), il a été démontré que la LH stimule la production des inhibines par les cellules de la granulosa issues des follicules matures ayant donc des récepteurs fonctionnels à la LH. Cependant, chez la plupart des espèces (ratte, brebis, vache et la truie), l'expression des sous-unités α et β des inhibines par les cellules de la granulosa chute dramatiquement après le pic préovulatoire des gonadotrophines (Meunier et coll., 1988; Tierney et coll., 1990). Toutefois, le corps jaune synthétise peu ou pas de sous-unités des inhibines chez ces espèces (Meunier et coll., 1988; Tierney et coll., 1990). Chez la femme et les primates, il a été remarqué que le corps jaune *in vivo*, les cellules de la granulosa luteinisées et les cellules lutéales dispersées *in vitro* continuent à synthétiser et à sécréter les sous-unités α et β des inhibines, ainsi que les différentes formes des inhibines bio- et immunoréactives en réponse à l'action de la LH (Schwall et coll., 1990; Tsonis et coll., 1987; Yamoto et coll., 1991; Fraser et coll., 1992, 1995). Des facteurs produits localement dans les ovaires, stimulent le niveau basal et/ou stimulent la FSH à induire l'expression des gènes codant pour la synthèse des protéines des sous-unités des inhibines et la sécrétion des inhibines immunoréactives par les cellules de la granulosa. Parmi ces facteurs, on reconnaît; l'œstradiol (Aloi et coll., 1995; Hillier et coll., 1991; Turner et coll., 1989; Wrathall et coll., 1990, Michel et coll., 1991), les androgènes aromatisés (i.e. androstènedione et testostérone) (Turner et coll., 1989; Wrathall et coll., 1993), le TGF- β (LaPolt et coll., 1990; Michel et coll., 1991),

l'IGF-I (Carson et coll., 1989) les activines (LaPolt et coll., 1989; Xiao et coll., 1992; Kubo et coll., 1998) et la prostaglandine E₂ (PGE₂) (Michel et coll., 1991). L'effet stimulateur de l'activine sur la production des inhibines est bloqué par la follistatine (Xiao et Findlay, 1991). Cependant, il existe d'autres facteurs tels que l'EGF/TGF- α (Franchiment et coll., 1986; Zhiwen et coll., 1987) et le FGF (LaPolt et coll., 1990), qui suppriment la production des inhibines par les cellules de la granulosa.

Des travaux réalisés par Henderson et Franchiment (1981, 1983), démontrent que, contrairement à l'œstradiol, les androgènes aromatisés ou nonaromatisés sont capables de stimuler la sécrétion des inhibines bio- et immunoactive par les cellules de la granulosa dans un milieu de culture dépourvu du sérum. Cependant, d'autres résultats obtenus par Wrathall et Knight (1993) ont démontré que la sécrétion des inhibines immunoréactives par les cellules de la granulosa en milieu de culture dépourvu de sérum est remarquablement élevée, aussi bien sous l'effet des androgènes aromatisés que par l'œstradiol. Par contre, les androgènes nonaromatisés tels que la dihydrotestostérone (DHT) ont peu d'effet sur la sécrétion des inhibines immunoréactives. En réalité, on pense que ce faible effet de sécrétion retrouvé après le traitement des cellules de la granulosa avec la DHT, est probablement le résultat d'une contamination des échantillons par les androgènes aromatisés. Cette théorie est supportée par le fait que les cellules de granulosa traitées par la DHT produisent des concentrations détectables d'œstradiol (Wrathall et Knight, 1993). Ces résultats démontrent que la sécrétion des inhibines immunoréactives par les cellules de la granulosa est stimulée par l'œstradiol et non pas par les androgènes nonaromatisés. Cette observation est en accord avec les résultats obtenus de cultures cellulaire de la granulosa chez la rate *in vitro* (Turner et coll., 1989), indiquant que l'œstradiol et non la DHT favorise l'expression de l'ARNm des protéines des sous-unités des inhibines α et β .

Plusieurs rapports indiquent que la progestérone peut aussi agir à un niveau local de façon à influencer la fonction des cellules de la granulosa (Michel et coll., 1989; Dimattini et coll., 1986; Greenberg et coll., 1990). Chez les primates, le corps jaune sécrète activement les inhibines immunoréactives (Webley et coll., 1991; McLachlan et coll., 1987 a, b; Reddi et coll., 1990). Toutefois, la progestérone exogène ne stimule pas la production d'inhibine immunoréactive par les cellules de la granulosa bovine en milieu de culture dépourvu de sérum (Wrathall et Knight, 1993) ou par les cellules de granulosa porcine dans un milieu de culture pourvu de sérum (Michel et coll., 1991). Ces résultats sont en contradiction avec les résultats ultérieurs chez la vache, qui

démontrent que la progestérone réduit la production des inhibines *in vitro* (Henderson et Franchiment, 1981).

2.4.1.3.1.7 Rôle de l'inhibine ovarienne

Les récepteurs de l'inhibine ne sont pas jusqu'à ce jour identifiés au niveau des cellules pituitaires qui synthétisent et sécrètent les hormones gonadotrophines. Par conséquent, on ne connaît rien sur le(s) système(s) ou le signal de transduction par les quels les inhibines exercent leur effet inhibiteur sur la biosynthèse de la FSH. Toutefois, il existe quelques travaux publiés récemment concernant l'identification des récepteurs de l'inhibine chez la souris dépourvue du gène codant pour l'ARNm de la protéine de la sous-unité α (Draper et coll., 1998). Ces résultats démontrent la présence de quatre formes de protéines de liaison des inhibines après purification par la méthode de chromatographie d'affinité aux inhibines. Les protéines éluées des colonnes d'inhibine, s'avèrent des récepteurs distincts, qui diffèrent de la follistatine (FST) (Draper et coll., 1998). Des observations issues des espèces examinées (la rate, la brebis, la vache et la truie) supportent le rôle des inhibines ovariennes comme modulateurs de la sécrétion de la FSH par les cellules pituitaires. L'administration d'une préparation hautement purifiée des inhibines dérivées de l'ADN recombinante ou natif démontre qu'elle favorise la suppression sélective de la concentration plasmatique de FSH: chez la rate (Rivier et coll., 1991), la brebis (Findlay, et coll., 1987; Tilbrook et coll., 1993) et la vache (Beard et coll., 1990).

D'autre part, on a constaté qu'après ovariectomie chez la brebis, une élévation de la concentration plasmatique en FSH, qui peut être cependant bloquée par l'administration combinée d'inhibine et de l'œstradiol à des doses physiologiques (Mann et coll., 1990). Par contre, l'administration des préparations contenant de la FSH, favorise une augmentation des concentrations circulantes des inhibines bioactives et immunoréactives (ir-inhibine) et de l'œstradiol chez la rate (Lee et coll., 1982), la vache (Taya et coll., 1991) et la femme (McLachlan et coll., 1986; McLachlan et coll., 1987b; Muttukrishna et coll., 1994), ce qui est en accord avec la relation réciproque entre les inhibines ovariennes et la sécrétion de la FSH.

Des anticorps dirigés contre les inhibines dérivées de l'ADN natif ou recombinante ou contre un fragment synthétique de la sous-unité α de la forme d'inhibine 32kDa humaine (Mason et coll., 1986), bovine (Forage et coll., 1986) ou porcine (Li et Ramsharma, 1987; Brown et coll., 1990), neutralisent efficacement

l'activité biologique des inhibines *in vivo* et *in vitro* et provoquent une augmentation du nombre des follicules ovulatoires chez la truie. Des études utilisant une immunisation active de la brebis et de la vache avec un vaccin contre la sous-unité α de l'inhibine démontrent une augmentation modeste des concentrations de FSH dans le plasma suivie du développement nombreux folliculaire et une augmentation du taux d'ovulation (Forage et coll., 1987; Findlay et coll., 1989; Warthall et coll., 1990; McLed et coll., 1992; Glencross et coll., 1994) et de la prolificité au-dessus de la moyenne (Wrathall et coll., 1992; Fray et coll., 1994). Les mécanismes intracellulaires de l'action des inhibines comme régulatrice de la sécrétion de la FSH au niveau hypophysaire est inconnue. Toutefois, la guanine monophosphate cyclique (GMPc) a été suggérée comme un second messager intracellulaire de la voie d'action des inhibines, puisqu'on a constaté un parallélisme entre la réduction de la sécrétion de la FSH et une augmentation de la GMPc intracellulaire (Franchimont, 1987). L'activité endocrine des inhibines sur l'adénohypophyse d'un rat pourrait être renforcée par une activité paracrine, étant donné qu'on a détecté les ARNm qui codes pour les protéines des sous-unités α et β des inhibines au niveau de l'hypophyse (Roberts et coll., 1989).

En ce qui concerne l'activité paracrine des inhibines au sein des gonades, des études réalisées sur les cellules de la thèque *in vitro*, chez la rate (Hsueh, et coll., 1987), l'humain (Hillier et coll., 1991; Hillier, 1991) et la vache (Wrathall et Knight, 1995), démontrent que l'inhibine potentialise la production des androgènes induite par la LH ce qui provoque une augmentation du substrat qui sera aromatisé par le cellules de la granulosa du follicule dominant. Toutefois, l'activine supprime la production basale des androgènes dans ce système et inhibe l'effet stimulateur des inhibines (Hillier et coll., 1993). D'autre part, l'effet paracrine des inhibines sur la maturation folliculaire a été évalué par l'injection de l'inhibine recombinante humaine-A (rh-inhibine) directement dans les ovaires immatures d'une ratte (Woodruff et coll., 1990), ils constatent une augmentation de la maturation folliculaire. Les inhibines pourraient jouer un rôle dans la maturation folliculaire, particulièrement celle des follicules immatures, pour cela, en stimulant la production des androgènes par les cellules de la thèque interne (voir figure 6; Hsueh et coll., 1987; Sugino et coll., 1988; Vale et coll., 1990). D'autres chercheurs ont émis l'hypothèse concernant le rôle des inhibines endogènes particulièrement les sous-unités α libres dans le maintien de la production de la progestérone par les cellules lutéales. Cette hypothèse a été vérifiée en ajoutant a des milieux de culture de cellules de la granulosa humaine (Webley et coll., 1994) ou de cellules lutéales d'ouistiti (Webley et coll., 1994), un anticorps contre la sous-unité α ,

entraînant ainsi une réduction de la sécrétion de la progestérone induite par traitement avec l'hCG.

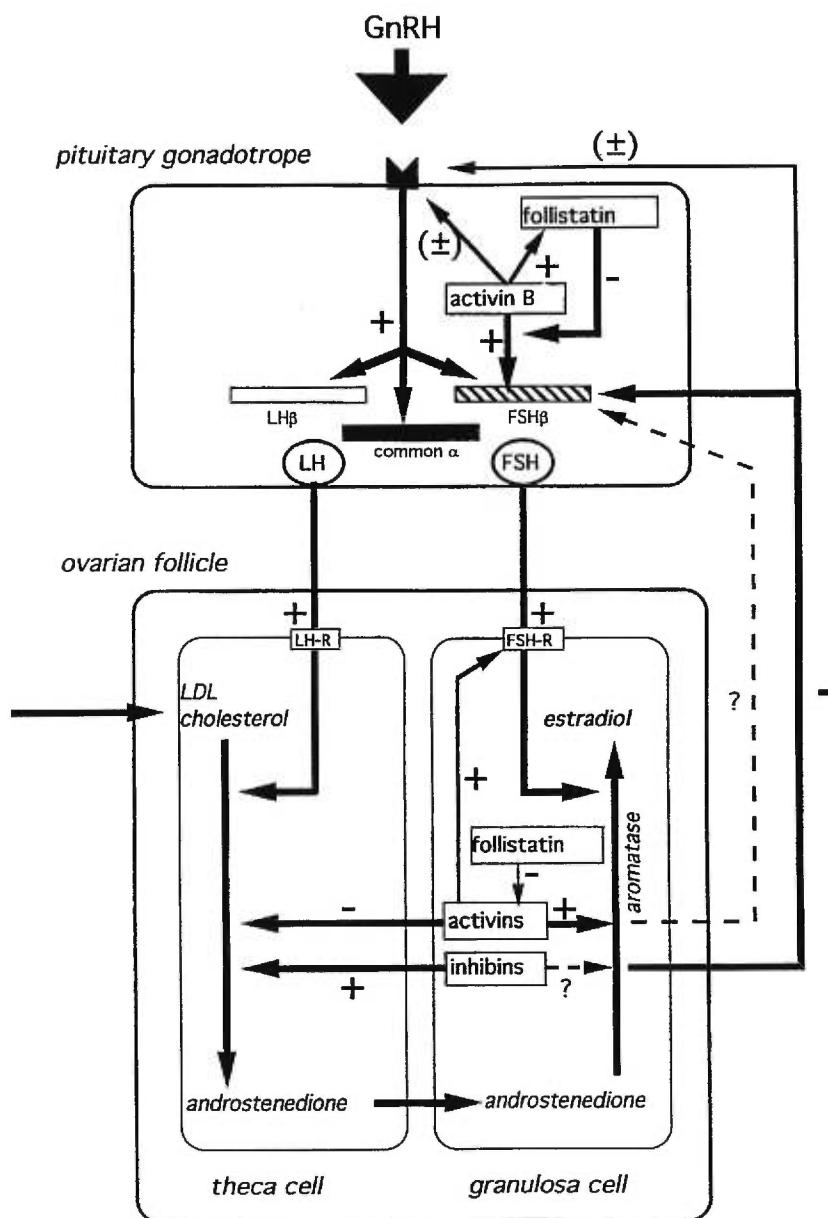


Figure 6. Résumé des rôles autocrine/paracrine et des actions de rétrocontrôle endocrinien des inhibines, activines et follistatine sur l'axe ovaire-glande pituitaire. (Adapté de Knight, 1995)

entraînant ainsi une réduction de la sécrétion de la progestérone induite par traitement avec l'hCG.

2.4.1.3.2 Les activines

L'activine est une protéine qui a été découverte au cours des étapes de purification de l'inhibine du liquide folliculaire chez la truie. On a remarqué que cette protéine a un effet contraire à celui de l'inhibine par son rôle modulateur sur la sécrétion de la FSH de la glande pituitaire (Miyamoto et coll., 1985; Vale, et coll., 1986). Les activines sont des protéines dotées d'une structure dimère de deux sous-unités β d'inhibine qui sont liées par des ponts disulfure (voir figure 4; Vale et coll., 1986; Ling et coll., 1986a). Cinq isoformes- β ont été identifiés jusqu'à présent; β A-, β B-, β AB-, β C-, β D- et β E- (Vale et coll., 1986; Ling et coll., 1986b; Matzuk et coll., 1995a; Schmitt et coll., 1996; Fang et coll., 1996). L'activine AB (β A- β B) et l'activine A (β A- β A) ont été purifiées du liquide folliculaire de la truie (Vale et coll., 1986; Ling et coll., 1986).

L'activine B a été isolée du le liquide folliculaire chez la truie et la femme (Nakamura et coll., 1992; Sugino et coll., 1994; Vassalli et coll., 1994). Les activines ont aussi été isolées du placenta humain (de Krester et coll., 1994 a), du liquide amniotique chez la brebis (de Krester et coll., 1994 b) et du liquide testiculaire (de Winter et coll., 1993). Toutefois, l'assemblage des sous-unités β C-, β D- et β E sous forme homo- ou hétérodimère n'a pas été élucidé jusqu'à date. Des progrès substantiels ont été réalisés suite à la détermination des sites de liaison des activines au niveau de plusieurs types cellulaires tels que, les cellules de la granulosa et les érythrocytes (revue par Mathews, 1994). Les récepteurs des activines sont des protéines transmembranaires possédant une activité intrinsèque sérine/thréonine kinase au niveau de leur domaine intracytoplasmique (Mathews et coll., 1991, 1992; Kingsley, 1994; Attisano et coll., 1992; Mathews, 1994; Halvorson et De Cherny, 1996; Ethier et coll., 1997). Ils sont classés en deux types de récepteurs, le type I (ActRI) et le type II (ActRIIA et ActRIIB) (Mathews et coll., 1992; Mathews et Vale, 1993; Matzuk et coll., 1995b), qui sont structurellement semblables aux récepteurs type I et II de la TGF- β (Takumi et coll., 1995). Des études suggèrent que la présence simultanée de ces deux types de récepteurs est primordiale pour la genèse de la réponse cellulaire aux activines.

Dans l'adénohypophyse, les activines stimulent la biosynthèse de la sous-unité FSH- β au niveau transcriptionnel (Carroll et coll., 1991; Weiss et coll., 1995) qui peut être via une augmentation du nombre de récepteurs sous l'effet de la GnRH (Braden et Conn, 1992). *In vitro*, le taux des ARNm codant pour la sous-unité FSH- β augmente significativement quatre heures après le traitement avec l'activine recombinante humaine-A (rhactivin) avec les cellules de la glande pituitaire de rate (Attardi et Miklos

1990). En 1990, Rabinovici et coll. rapportent que les cellules lutéales de granulosa en culture traitées avec rhactivine-A pour une période de cinq jours, entraînent une augmentation du nombre de cellules selon la dose. Cet effet de l'activine n'a pas été affecté par l'ajout de l'inhibine-A dans le milieu de culture (Rabinovici et coll., 1990). *In vitro*, l'incubation des follicules ovariens d'une rate (i.e. ovocyte et les cellules de la granulosa) avec l'activine-A résulte en une augmentation significative du nombre des cellules de la granulosa, aussi bien que par une augmentation de l'incorporation de la [³H]thymidine par les cellules de la granulosa (Li et coll., 1995). Dans les ovaires fœtaux de rat, l'activineA aussi augmente l'incorporation de la [³H]thymidine par les cellules de la granulosa après un traitement de trois jours. Ces résultats suggèrent que l'activine peut promouvoir la croissance des cellules ovariennes. D'autre part, un grand nombre d'études chez la rate ont indiqué que l'activine en association avec la FSH stimule l'aromatase et production des œstrogènes (Hutchinson et coll., 1987; Miro et coll., 1991; Xiao et coll., 1990), la sécrétion de la progestérone (Miro et coll., 1991; Xiao et coll., 1990), augmente l'expression des récepteurs à la FSH (Hasegawa et coll., 1988; Xiao et coll., 1992) et la follistatine (Michel et coll., 1992). *In vivo*, l'action intraovarienne de l'activine est peu élucidée. Des expériences ont démontré que des injections journalières du facteur de différenciation érythrocytaire (EDF) et d'activine chez une rate immature pendant 1-3 jours, entraîne une augmentation significative dans le sérum de la FSH, de l'inhibine, de l'œstradiol et les récepteurs ovariens de la FSH (Doi et coll., 1992). Ces résultats démontrent que EDF et l'activine non seulement augmentent la sécrétion de la FSH de la pituitaire, selon des modes d'actions autocrines et paracrines sur la stimulation ovarienne, qui en résulte en une augmentation du nombre des récepteurs à la FSH, du poids des ovaires et de l'utérus, de la synthèse de l'inhibine et de l'œstradiol par les ovaires (revue par Hasegawa et coll., 1994).

2.4.1.4 Les protéines de liaison des inhibines et des activines

2.4.1.4.1 L' α_2 macroglobuline

L' α_2 macroglobuline est une protéine présente à des taux importants dans la circulation sanguine (2.5mg/ml). L' α_2 macroglobuline est capable de lier le TGF- β , les inhibines et les activines sans que l'on sache actuellement si elle modifie d'une manière quelconque leur immuno- ou leur bio-activité (Halvorson et DeCherney, 1996). Mather et coll. (1992) suggèrent un rôle de protection de ces peptides contre une protéolyse et/ou un rôle de régulation de leur biodisponibilité tissulaire.

2.4.1.4.2 Les follistatines

Les follistatines sont des glycoprotéines monomère formées d'une seule chaîne polypeptidique. Comme l'inhibine, la follistatine agit comme inhibiteur de la relâche de la FSH de la glande pituitaire (Robertson et coll., 1987; Ueno et coll., 1987). Ueno et coll. (1987) ont isolé du liquide folliculaire porcin deux protéines de 32kDa et de 35kDa. L'ADNc et la séquences du gène codant pour la follistatine ont été décrit chez la truie (Shimasaki et coll., 1988), l'humain (Shimasaki et coll., 1988), la rate (Shimasaki et coll., 1989) et la vache (Houde et coll., 1994) et une partie de la séquence du gène codant a été décrite chez la brebis (Tisdall et coll., 1992). Les séquences de la follistatine montrent un degré d'homologie très élevé entre les espèces et une parenté plus ou moins grande de quelques séquences avec les séquences du facteur de croissance épidermique (Ling et coll., 1990). Chez la truie et l'humain, deux types d'ADNc de la follistatine ont été identifiés; la forme la plus longue contient 334 acides aminés dont on en croit en être le précurseur de la follistatine. Cependant, la forme courte qui contient 317 acides aminés est une molécule dépourvue de carboxyl terminal (Shimasaki et coll., 1988). Le site d'expression du gène codant pour l'ARNm de la follistatine se trouve dans les tissus gonadique et extragonadique tels que, les cellules de la granulosa, les cellules de Sertoli, le corps jaune, le placenta, la glande pituitaire et les reins (Kogawa et coll., 1991; De Paolo et coll., 1991 et 1993; Kaiser et coll., 1992; Roberts et coll., 1993; Tisdall et coll., 1992).

Initialement, la follistatine a été identifiée *in vitro* comme un inhibiteur de la sécrétion de la FSH par les cellules de la glande pituitaire avec un potentiel beaucoup moins faible que celui de l'inhibine (30-40%) (Ueno et coll., 1987; Robertson et coll., 1987; Kogawa et coll., 1991; Inouye et coll., 1991). La follistatine est une protéine de liaison qui se lie à l'inhibine et à l'activine (Robertson et coll., 1987; Inouye et coll., 1991; Nakamura et coll., 1990). *In vitro*, la follistatine a un effet inhibiteur plus prononcé sur l'action de l'activine que celle de l'inhibine (Davis et coll., 1986; Shimasaki et coll., 1989; Nakamura et coll., 1992). Cette action a été vérifiée récemment par Mathews (1994), en neutralisant l'activité biologique de l'activine, il a constaté que l'affinité de la follistatine pour l'activine est identique à celle de l'activine pour son récepteur. D'autres actions biologiques de la follistatine ont été rapportées par différents travaux, parmi les quelles on peut citer; l'induction de la différenciation des cellules leucémiques chez la souris (Shiozaki et coll., 1992), induction de la formation du tissu mésodermale chez les embryons de *Xénopus* (Asashima et coll., 1991).

2.5. Problématique, hypothèse, objectifs et cheminement du travail

2.5.1 Problématique

Le problème de la culture cellulaire est que les cellules de la granulosa bovine se lutéinisent spontanément en culture et commencent à produire de la progestérone au lieu de l'œstradiol qui indique le bon développement des cellules de la granulosa *in vivo* et *in vitro*. Cependant une synthèse et une libération accrue de la progestérone prouvent que les cellules de la granulosa seraient en voie de lutéinisation.

Chez la femme et la vache, les cellules de la granulosa synthétisent et libèrent *in vivo* une concentration élevée d'inhibine monomère biologiquement inactive aux dépens du dimère qui est biologiquement actif. Pour doser l'inhibine dimère par la technique d'ELISA dans le milieu de culture, on utilise deux types d'anticorps dont un reconnaît autant la sous-unité α libre que celle du dimère. Cependant, lors du dosage de l'inhibine dimère on ne sait pas exactement quelle sous-unité α notre anticorps s'est lié avec. Les résultats devraient donc être analysés sous certaines réserve.

2.5.2 Hypothèses et objectif

La première hypothèse de cette étude était d'étudier la sécrétion de l'inhibine dimère et monomère par les cellules de la granulosa bovine *in vitro* est que la sécrétion de l'inhibine dimère et monomère par les cellules de la granulosa est dépendante de la dose de FSH dans le milieu de culture.

La deuxième l'hypothèse est que les formes d'inhibine secrétées par les cellules de la granulosa en culture dépendent particulièrement de la dose de FSH dans le milieu de culture et de comparer ces formes d'inhibine dimère avec celles retrouvées dans le liquide folliculaire d'une vache normalement cyclée.

L'objectif général de ce travail était d'étudier la sécrétion de l'inhibine dimère par les cellules de la granulosa *in vitro* et la réponse des cellules de la granulosa suite à un traitement avec la FSH.

2.5.4 Cheminement du travail expérimental

L'ensemble des expériences incluses dans la section 3 ont été réalisées sur des échantillons provenant, dans la première expérience, des génisses (n=2 ou 3 par culture) traitées avec 1500 UI d'eCG. Après 96h du traitement à l'eCG, les ovaires

étaient récupérés par ovariectomie et les cellules antrales et murales de la granulosa (600 000 cellules par puits) ont été mis en culture dans un milieu de culture sans sérum. Le changement de milieu de culture se faisait chaque 24h pendant une période de 4jours. Les échantillons ont été dosés par la méthode de RIA pour l'inhibine monomère et par la technique d'ELISA pour l'inhibine dimère. Pour la deuxième expérience on a utilisé les cellules de la granulosa de petits et de gros follicules ont été récoltées d'ovaires de vaches normalement cyclées. Les cellules ont été mises en culture (10^6 cellules par puits) dans un milieu dépourvu de sérum. Le changement du milieu de culture se faisait chaque 48h pendant une durée de 8 jours. Les échantillons ont été dosés par la méthode d'ELISA pour l'inhibine dimère.

Pour vérifier l'effet de la FSH sur la sécrétion de l'inhibine, les cellules de la granulosa furent traitées avec différentes doses de FSH 0, 0.5, 2 ou 10ng/ml; première expérience et 0, 1, 10, 100ng/ml; deuxième expérience.

Des échantillons de milieu de culture récoltés à la fin de la deuxième expérience ont été utilisés dans la méthode de transfert de protéines par la technique de Western afin de comparer les formes d'inhibine dimère secrétées dans le milieu de culture avec celles du liquide folliculaire.

3. Article

Effect of FSH and cell localization on dimeric inhibin secretion from bovine granulosa cells in culture

**M L Boudjema¹, P Rouillier², B Bhatia¹, L A Guilbault^{2,3}
and C A Price¹**

¹Centre de recherche en reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000, St-Hyacinthe, Quebec J2S 7C6, and ²Centre de recherche en biologie de la reproduction, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval, Cité universitaire, Ste-Foy, Québec G1K 7P4, and ³Agriculture and Agrifood Canada research station, Lennoxville, Quebec J1M 1Z3
Canada

Soumis à la revue Journal of Endocrinology.

3.1. Abstract

We sought to determine if dimeric inhibin secretion from cultured bovine granulosa cells was affected by FSH or localization of cells within the follicle. We also determined the molecular mass forms of intracellular and secreted dimeric inhibin. Cells from the antral or mural compartment of follicles were cultured in defined medium in 2 culture systems, and dimeric inhibin was measured by 2-site ELISA and by Western immunoblotting. In the first culture system, dimeric inhibin (as well as total a-inhibin measured by RIA) secretion declined with time in culture, but was significantly ($p < 0.05$) higher from antral than from mural cells. Whereas a-inhibin secretion from antral cells was responsive to FSH, neither a- nor dimeric inhibin secretion from mural cells were affected by FSH. In the second culture system, dimeric inhibin secretion increased with time in culture, but was not responsive to FSH. The major forms of inhibin secreted had molecular masses of 48-58 and approximately 73 and 98 kDa; the 32 kDa form was barely detectable. We conclude that bovine granulosa cells secrete predominately 48 - 58 and 73kDa inhibin, and that there are differences between mural and antral granulosa cells in terms of dimeric inhibin secretion.

3.2. Introduction

Inhibins are glycoprotein hormones which selectively suppress follicle stimulating hormone (FSH) secretion by the pituitary gland without affecting the release of luteinizing hormone (reviewed by Findlay 1986, De Jong 1988, Ying 1988, Tilbrook *et al.* 1992, Knight 1996). Biologically active inhibin consists of two subunits, termed a and b. Bovine inhibin was initially isolated as a 58kDa form consisting of a 43kDa a-subunit and a 15kDa b-subunit. The introduction of a pH precipitation step during purification led to the isolation of the 31kDa form consisting of two subunits of 20kDa and 15kDa, suggesting that the 31kDa form results from the cleavage of the 43kDa a-subunit (Robertson *et al.* 1986). It is now generally recognized that the a-subunits are secreted in excess of the dimer (Knight 1991, Knight *et al.* 1989, 1991), such that there are large amounts of monomeric a subunit in biological fluids. The importance of this is that many assays utilize antibodies against the a-subunit, and thus recognize many forms of monomeric a-inhibin as well as the dimeric forms.

In ruminants, dimeric inhibins and immunoreactive a-inhibins are secreted by granulosa cells, and the follicular fluid content of inhibins has been studied during follicular development. Oestrogenic, non-atretic follicles and preovulatory follicles

contain less dimeric inhibin and more total α -inhibin immunoreactivity than do atretic follicles (Guilbault *et al.* 1993, Hopko-Ireland *et al.* 1994, Price *et al.* 1995a). Western immunoblot analysis of follicular fluid in cattle has shown up to 9 different inhibin dimer/ α -subunit forms, the main forms having molecular masses of approximately 29, 34, 49, 53, 58, 77, 110 and > 160kDa (Hopko-Ireland *et al.* 1994; Good *et al.* 1995; Sunderland *et al.* 1996). Of these forms, the 34, 58, 77 and >100 kDa forms are dimeric and biologically active. The relative amounts of most inhibin forms change differently during follicle growth, for example, abundance of the 32kDa form increased with follicle atresia whereas that of the 58 kDa form decreased (Sunderland *et al.* 1996, Mihm *et al.* 1997).

Little is known about the regulation of dimeric inhibin secretion in ruminants, partly owing to the paucity of assays specific for dimeric inhibin and the lack of a cell culture system that maintains oestradiol secretion from granulosa cells in culture. In rats, protein and mRNA for both α - and β -subunits, and dimeric inhibin secretion from granulosa cells are stimulated by FSH (Zhang *et al.* 1988, Turner *et al.* 1989, Michel *et al.* 1991, Aloï *et al.* 1995, Tate *et al.* 1996, Li *et al.* 1998). Western immunoblot analysis has shown that the predominant form of dimeric inhibin secreted from cultured rat granulosa cells is the 32kDa form (Bicsak *et al.* 1988, Imai *et al.* 1996). In ruminants, immunoreactive inhibin- α secretion declined rapidly with time in culture of spontaneously-luteinizing bovine granulosa cells, in parallel with that of oestradiol (Henderson & Franchimont 1981, 1983, Luck *et al.* 1990), whereas immunoreactive inhibin- α secretion from non-luteinized sheep granulosa cells increased with time in culture (Wrathall & Knight 1993, Campbell *et al.* 1996).

The objective of the present work was to study the secretion of dimeric inhibin from oestrogenic bovine granulosa cells in culture. In this study two types of cell culture models were used: in the first experiment we used the culture system developed by Saumande (1991) in which antral granulosa cells secrete more oestradiol than the mural cells (Roullier *et al.* 1996, 1998), to test the hypothesis that antral and mural cells also differ in their ability to secrete dimeric inhibin. In the second experiment we used the culture system developed by Campbell *et al.* (1996), in which oestradiol secretion is responsive to FSH, to test the hypothesis that dimeric secretion is also responsive to FSH *in vitro*.

3.3 Materials and Methods

Experiment 1

Granulosa cells were harvested from 3- to 4-month-old Holstein prepubertal female calves as described (Rouillier *et al.* 1996). Animals were injected with 1 500 IU equine chorionic gonadotrophin eCG, (Equinex; Ayrest, Montreal, Canada) and ovaries were recovered by ovariectomy 96h later. An antral granulosa cell suspension was prepared according to the method described by Saumande (1991) and modified by Rouillier *et al.* (1996); follicles ≥ 8 mm in diameter were punctured with a 18-gauge needle and rinsed 10 times with 0.5 ml Menezo B₂ medium supplemented with heparin (100 IU/ml; Organon Teknika, Toronto, Ontario). Following removal of the antral cell suspension, the collapsed follicles were dissected and the internal wall was scraped gently with a smooth inoculation loop to remove the adherent mural granulosa cells. Cell viability was determined by Trypan blue exclusion (0.13% final concentration) using a haemocytometer, and varied between 65% and 86% for antral cells and between 42% and 67% for mural cells. Cell suspensions were adjusted with Menezo B₂ medium to a final concentration of 6×10^5 viable cells/ml, and cultured for 4 days in Ham's F-12, pH 7.4 containing NaHCO₃ (1.176mg/ml), Hepes (2.62mg/ml), insulin (50ng/ml), androstenedione (10^{-7} M), human transferrin (10mg/ml), ascorbic acid (17.6mg/ml), gentamycin (20mg/ml) and nystatin (4mg/ml), and supplemented with 0, 0.5, 2 or 10ng/ml FSH (pFSH=41x NIH-FSH-P1, LH activity < 0.5%; gift from Dr. Combarrous, INRA, Nouzilly, France). Culture medium was replaced daily, and spent medium stored at -20°C until assayed for dimeric and total α -inhibin.

Experiment 2

Antral cells from small (3 - 4.5 mm diameter) and from large (8 - 10 mm) follicles were cultured in serum-free conditions as described by Gutiérrez *et al.* (1997). Follicles were dissected from the ovaries, and follicles with an obvious atretic appearance were discarded. Granulosa cells were isolated from small follicles by hemisectioning the follicles in Dulbeccos PBS (without calcium or magnesium; DPBS⁻) at 37°C and the follicle halves were flushed repeatedly up and down the barrel of 1ml syringe. The follicle halves were then allowed to settle and the resulting granulosa cell suspension was collected. Cells were resuspended in α -MEM with L-glutamine, containing sodium bicarbonate (10 mM), Hepes (20 mM), protease-free BSA (0.1 %),

selenium (4 ng/ml), transferrin (2.5 µg/ml), androstenedione (10^{-7} M), non-essential amino acid mix (1.1 mM), penicillin (100 iu/ml) and streptomycin (100 µg/ml).

Granulosa cells were isolated from large follicles (> 8mm) by aspirating antral fluid using a 1 ml syringe fitted with a 23 gauge needle; the follicles were hemisected in 5 ml of DPBS⁻ at 37°C and the granulosa cells were gently scraped from the theca. The resulting granulosa cells were isolated by centrifugation. Cell viability (40 - 50 %) was estimated using Trypan blue exclusion.

Cells were plated at a density of 10^6 viable cells from either small or large follicles into 24 well plates (Becton Dickinson, New Jersey USA) in culture medium (a-MEM described above) containing insulin (100ng/ml) and human recombinant IGF-I (10ng/ml; Gibco BRL), and 0, 1, 10 or 100ng oFSH (NIADDK-oFSH-17; biological potency 20 U/mg relative to oFSH-S1). Cells were cultured for 8 days for small follicles and 6 days for large follicles and the medium was changed at intervals of 48h. Disturbance of the cells was minimized by gently removing and replacing 700ml of media at each change. The spent medium was stored at -20°C before assay for dimeric inhibin. At the end of culture, granulosa cells were sonicated for 5 min and the lysate used for DNA measurement with calf thymus DNA as standard (Labarca & Paigen 1980).

In a subsequent culture, cells from small follicles were cultured as above and were exposed to 0.1, 1, 10 or 100 ng/ml FSH in the presence of 10ng/ml insulin. On the last day of culture (day 6), the cells were lysed and the lysate as well as spent culture medium were used to estimate inhibin content by immunoblot analysis.

Assays

Immunoreactive α -inhibin was measured using the RIA developed by Vaughan *et al* (1989). Briefly, the assay utilizes an antibody (#120; The Clayton Foundation Laboratories for Peptide Biology, The Salk Institute, La Jolla, CA) raised against porcine inhibin- α (1-26), which was used at a final dilution of 1:750,000. The tracer was [D-Ser¹,Nle⁵] human inhibin α (1-25)-Gly-Tyr-NH₂ that was iodinated with Iodogen (Pierce, Rockford, IL) and purified by HPLC (Vaughan *et al.* 1989), and ovine inhibin- α (1-25)-Gly-Tyr was used as the standard. Results of this assay are expressed as pmol, derived from the mass of the standard (1 pg standard is 0.22 fmol; J M Vaughan, personal communication). The sensitivity for the synthetic peptide standard was 0.05pmol/ml. Intra- and interassay coefficients of variation (CV) were respectively 9% and 19%.

The dimeric inhibin assay used (Price *et al.* 1995b) is a modification of the 2-site ELISA developed by Groome *et al.* (1994). Briefly, the capture antibody was a mouse monoclonal raised against the subunit-b of inhibin (E4; Groome & Lawrence 1991), and the detection antibody was a mouse monoclonal raised against the inhibin- α subunit (R1, Serotec, Oxford UK; Groome *et al.* 1990) and coupled to alkaline phosphatase. Samples and standard (32 kDa human recombinant inhibin; Genentech, S. San Francisco, CA) were diluted in assay diluent (0.1 M Tris HCl pH 7.5, containing 0.15 M sodium chloride, 5% Triton X-100, 10% BSA and 5% mouse serum) to a volume of 150 μ l, incubated with 15 μ l 10% hydrogen peroxide for 30 min at room temperature, then diluted to 300 μ l with assay diluent. Aliquots of 100 μ l of sample solutions were assayed in duplicate. Bound alkaline phosphatase was detected using ELISA Amplification System (Gibco BRL Inc) as described by the manufacturer. Intra- and interassay CV were 7% and 20%, and the sensitivity was equivalent to 0.1 fmol/ml. Results are expressed in fmol based on the 32kDa dimeric standard.

Immunoprecipitation and western blot

Dimeric inhibin forms in culture medium and cell extracts from experiment 2 were assessed by immunoprecipitating with anti-a subunit IgG followed by immunoblotting with anti-b subunit IgG. Samples of culture medium (0.7 - 2 ml), cell protein (100 μ g) and of follicular fluid (0.5 ml) recovered from ovaries of cyclic cattle were immunoprecipitated with 0.2 ml of a 1:5000 dilution of antibody directed against the a-subunit of ovine inhibin (#120, The Salk Institute). After an overnight incubation at 4°C on a rocking platform, 0.2 ml of 1:40 goat anti-rabbit serum was added, and the incubation continued for two hours at 4°C. The samples were then centrifuged at 1000 g at 4°C for 30 min, and the immunoprecipitate was washed twice with 1 ml of 25 mM Tris saline, pH 7.4 (TBS). The pellet was resuspended in 50 μ l sample buffer (0.1 M Tris HCl, pH 6.8, containing 10% SDS, 20% glycerol and 0.01% bromophenol blue) and heated in a boiling water bath for 10 min. Proteins were then separated on 12% polyacrylamide gels at 4°C under nonreducing conditions (Laemmli 1970) using a Bio-Rad Mini gel apparatus (Mini-Protean II, Vertical Electrophoresis Cell, Bio-Rad). Proteins on each gel were transferred from SDS-polyacrylamide gels to an Immobilon P membrane (Millipore, Bedford, MA) using a Bio-Rad Mini Trans-Blot Cell overnight at 4°C. Membranes were blocked in 5% dried skim milk, and then incubated for 2 h with 10 ml 5% H₂O₂, washed for 20 min with TBS and incubated in biotinylated monoclonal antibody reacting with the inhibin β subunit (E4, 10mg/10ml) for 6h at room temperature then at 4°C overnight. Bound antibody was detected by incubating

membranes with 1:1000 dilution of streptavidin-alkaline phosphatase (Sigma) for 6 h at room temperature, and bound antibody was detected either with 5-bromo-4-chloro-3-inodylphosphate (BCIP) and Nitro blue tetrazolium (NBT; Gibco BRL) or by chemiluminescence (ECL Western blotting system; Gibco BRL).

To verify the immunoprecipitation procedure, some aliquots of culture medium were pooled and concentrated by centrifugation against a 10kDa filter (Filtron Technology Corporation, Northborough, MA) and were electrophoresed alongside immunoprecipitated samples and samples of untreated follicular fluid.

Statistical analysis

Concentrations of hormone assayed in the culture medium were log transformed before analysis to obtain a normal distribution (Shapiro-Wilk test). The relative forms of inhibin detected by immunoblot were estimated by scanning each immunospecific band using a computer imaging system and software (Collage; Fotodyne Inc, New Berlin, WI, USA). Data derived from the last day of culture were expressed relative to total DNA to correct for cell number. Analysis of variance was used to evaluate effects of day of culture, cell type (experiment 1) and dose of FSH. Main effects were blocked within culture replicate. Means comparisons were performed using the Tukey-Kramer test. Data are presented as least squares means \pm SEM.

3.4 Results

Experiment 1

There were significant effects of time of culture ($P < 0.001$) and of cell type ($P < 0.05$) on the secretion of both inhibin- α and dimeric inhibin (Fig. 1). The release of inhibin- α into the culture medium from antral and from mural granulosa cells declined by over 90% (Fig. 1A; $P < 0.001$) between days 1 and 2 of culture, and did not decrease further between day 2 and day 3 of culture. Inhibin- α was not detectable on day 4 of culture, so concentrations could not be corrected for DNA content at the end of culture, however, cell number did not differ significantly between mural or antral cells (data not shown). On day 1 of culture, antral cells secreted significantly more inhibin- α than did mural cells ($P < 0.05$), and there was no difference between cell types on day 2 and 3 of culture (Fig 1A; $P > 0.05$).

Dimeric inhibin secretion by mural and by antral granulosa cells decreased by 70 to 80% ($P < 0.01$) between days 1 and 2 of culture, and was not detectable on days 3 or 4 of culture (Fig 1B). On day 1 of culture, antral cells secreted significantly more dimeric inhibin than did mural cells ($P < 0.05$), and there was no difference between cell types on day 2 of culture ($P > 0.05$).

On the first day of culture, there was no effect of FSH on dimeric or inhibin- α concentrations (data not shown). On day 2 of culture, FSH increased the secretion of inhibin- α by antral cells ($P < 0.05$) but not mural cells ($P > 0.05$; Fig 2). FSH did not significantly affect dimeric inhibin secretion from either cell type at any time of culture (data not shown).

Experiment 2

Dimeric inhibin secretion from granulosa cells recovered from small and large follicles increased with time in culture ($P > 0.001$; Fig. 3). When cells were cultured in the presence of 100 ng/ml insulin, there was no main effect of FSH on dimeric inhibin secretion by granulosa cells from small or large follicles (Fig. 4).

Western blot analysis of the different inhibin forms in immunoprecipitated culture medium indicated an abundance of immunoreactive protein in the 48-58 kDa range, with another major band at approximately 48, 58, 77 and 98kDa (Fig. 5A, lanes 3 & 5). Very weak staining was noted at 32 and 39 kDa. A similar pattern was observed in concentrated culture medium (Fig 5A, lanes 4 & 6), although the band at 58kDa was obscured by the large amount of albumin present in the concentrated medium. In the untreated follicular fluid, immunoblotting with the anti- β subunit IgG

revealed strong staining at 28, 32 and 48kDa, and weak staining at 98 kDa (Fig 5B, lanes 1-2), and immunoblotting with the anti- α subunit IgG recognised 25, 32 and 48 kDa forms, as well as 77 and > 100 forms (not shown); again, the presence of follicular proteins (probably albumin) obscured any bands present in the 50-80 kDa range.

3.5 Discussion

The results from these studies further our knowledge of the secretion of dimeric inhibin from bovine granulosa cells. The main findings of this work are that there is a spatial differentiation of granulosa cell function within the follicle, such that antral cells secreted more dimeric and α -inhibin than did mural cells, and that the major form of dimeric inhibin secreted was the 48,58,77 and 98 kDa form, with very little production of the 'mature' 32 kDa form.

Dimeric inhibin secretion by ruminant granulosa cells *in vitro* has not previously been reported. In the first experiment, we used a culture system in which granulosa cell estradiol secretion remains responsive to FSH stimulation, although estradiol secretion does decline sharply between days 1 and 2 of culture (Rouillier *et al.* 1996, 1998). Both inhibin- α and dimeric inhibin followed the same pattern as estradiol, as a sharp decline occurred between days 1 and 2 of culture. Whereas estradiol secretion remained detectable after 4 days of culture (Rouillier *et al.* 1996), neither inhibin- α nor dimeric inhibin were detected on day 4 of culture. While inhibin- α could still be detected on day 3, dimeric inhibin concentrations were undetectable after 2 days of culture. It is thus possible that monomeric inhibin- α secretion continues after that of dimeric inhibin ceases, although as different assays and standards were used to measure inhibin- α and dimeric inhibin, it is equally possible that differences in assay sensitivity account for the apparent earlier loss of dimeric inhibin secretion.

Antral cells secreted significantly more estradiol than did mural cells on day 2 but not on day 1 of culture in the present experiment, and cell number did not differ between cell types (Rouillier *et al.* 1996). The secretion of both inhibin- α and dimeric inhibin secretion was also higher in antral compared with mural cells, but on day 1 and not day 2 of culture. These data add to the literature by showing that protein as well as steroid (Roberts & Echternkamp 1994, Rouillier *et al.* 1998) hormones are affected by cellular localization within the follicle. One explanation for this difference is that the greater disruption of cell-to-cell contact that occurs when harvesting mural cells reduces the endocrine function of these cells (Rouillier *et al.* 1996).

Despite the loss of estradiol and inhibin secretion with time in this culture system, both estradiol (Rouillier *et al.* 1996) and inhibin- α (present report) remained responsive to FSH. Estradiol responsiveness was quadratic (Rouillier *et al.* 1996), whereas inhibin- α increased with increasing dose of FSH. This latter observation is consistent with previous data obtained from culture of rat (Bicsak *et al.* 1988, Zhang *et al.* 1988, LaPolt *et al.* 1990, Michel *et al.* 1991) and bovine (Wrathall & Knight 1993) granulosa cells. However, dimeric inhibin secretion was not affected by the addition of FSH, suggesting that the secretion of inhibin- α , compared to that of dimeric inhibin, is more sensitive to FSH. This is difficult to reconcile with the presumed feedback loop between FSH and dimeric inhibin, and with the observation that FSH (or eCG) stimulated inhibin- β mRNA levels (Turner *et al.* 1989; Michel *et al.* 1991, Aloï *et al.* 1995, Tate *et al.* 1996) and dimeric inhibin secretion (Bicsak *et al.* 1986, 1988, Imai *et al.* 1996) from rat granulosa cells. However, since ruminant follicles secrete inhibin- α monomer in excess of the inhibin (α and β) dimer (Knight 1991, Knight *et al.* 1989, 1991), there may be species differences in the control of dimeric inhibin secretion by FSH.

The second cell culture system used in this report differs in two fundamental aspects from the first system. In the second system, estradiol secretion increases (cells from small follicles) or is maintained (cells from large follicles) during 6 to 8 days of culture, and estradiol secretion is not responsive to FSH in the presence of IGF-1 (Gutiérrez *et al.* 1997). Following this pattern, dimeric inhibin secretion also increased with time in culture, although a significant increase did not occur until day 6 or 8 culture. This is at variance with the temporal pattern of estradiol secretion, as estradiol concentrations increased significantly between days 2 and 4, but did not increase further thereafter. This apparent dissociation between estradiol and dimeric inhibin is not unlike that observed in first-wave nonovulatory bovine follicles *in vivo*, where dimeric inhibin concentrations in follicular fluid increase once estradiol concentrations have declined (Guilbault *et al.* 1993, Hopko-Ireland *et al.* 1994, Price *et al.* 1995a).

As has been amply demonstrated (Hopko-Ireland *et al.* 1994, Good *et al.* 1995, Sunderland *et al.* 1996, Mihm *et al.* 1997), no analysis of inhibin is complete without an assessment of the different molecular forms present in the biological fluid studied. In the present study, the predominant forms of inhibin immunoprecipitated from culture medium had molecular masses of 48 to 58 kDa, which correspond to the 49 and 58 kDa forms consistently reported by Ireland *et al.* (Hopko-Ireland *et al.* 1994, Good *et al.* 1995, Sunderland *et al.* 1996, Mihm *et al.* 1997), and 88 to 98 kDa, which correspond to the 88 and 110kDa forms previously described (Hopko-Ireland *et al.* 1994, Good *et*

al. 1995, Sunderland *et al.* 1996, Mihm *et al.* 1997). The 'mature' 32 kDa form of dimeric inhibin was almost undetectable by Western blotting. These data support the conclusion of Hopko-Ireland *et al.* (1994), that in cattle, the larger forms of inhibin are secreted whereas the smaller 32 kDa form is a minor by-product of intra- or extra-cellular processing of these larger forms. This is, however, at variance with data from rat studies showing secretion of predominantly 32 kDa inhibin *in vitro* (Imai *et al.* 1996). The rarity of the 32 kDa form in culture medium in the present study suggests that precursor processing occurs in the extra-cellular compartment of the follicle, since protease activity is presumably higher in follicular fluid than in sterile, serum-free culture medium (Chandrasekher *et al.* 1995, Besnard *et al.* 1996,1997).

To determine if our immunoprecipitation procedure was selectively altering the pattern of inhibin forms detected, we directly compared immunoprecipitated and concentrated culture medium with follicular fluid. Immunoprecipitated and concentrated medium samples showed very similar inhibin forms, although the high concentration of non-inhibin proteins of 58 to 77 kDa (presumably albumin) obscured and displaced the expected 58 kDa inhibin band. In neither case was a 32 kDa form detected. In contrast, follicular fluid blotted with an inhibin- α antibody recognised 32 kDa, and the same fluid blotted with an inhibin- β antibody recognized 28 and 32 kDa as well as larger forms. The 28 kDa form probably represents dimeric activin. Thus we conclude that 32 kDa inhibin is secreted in very low amounts from bovine granulosa cells, and that most of the 32 kDa inhibin found *in vivo* is formed from cleavage of precursor by proteases in follicular fluid.

Acknowledgements

The authors thank N. P Groome (Oxford Brookes University, Oxford, UK) for the gift of inhibin antibody (E4), J Rivier (Salk Institute, La Jolla, CA) for gifts of synthetic human and ovine inhibin $\alpha(1-26)$ and inhibin antibody, J Mather (Genentech, San Francisco, CA) for gift of recombinant 32kDa inhibin. This work was supported by NSERC Canada, the Canadian Breeders Research Council and by Agriculture and Agrifood Canada.

3.6 References

Aloi JA, Dalkin AC, Schwartz NB, Yasin M, Mann B, Haisenleder DJ & Marshall JC (1995). Ovarian inhibin subunit gene expression: regulation by gonadotropins and estradiol. *Endocrinology* (136) 1227-1232.

Besnard N, Pisselet C, Monniaux D & Monget P (1997). Proteolytic activity degrading insulin-like growth factor-binding protein-2, -3, -4, and -5 in healthy growing and atretic follicles in the pig ovary. *Biology of Reproduction* (56) 1050-1058.

Besnard N, Pisselet C, Zapf J, Hornebeck W, Monniaux D & Monget P (1996). Proteolytic activity is involved in changes in intrafollicular insulin-like growth factor-binding protein levels during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Endocrinology* (137) 1599-1607.

Bicsak TA, Tucker EM, Cappel S, Vaughan J, Rivier J, Vale W, Hsueh AJ (1986). Hormonal regulation of granulosa cell inhibin biosynthesis. *Endocrinology* (119) 2711-2719.

Bicsak TA, Cajander SB, Vale W & Hsueh AJ (1988) Inhibin: studies of stored and secreted forms by biosynthetic labeling and immunodetection in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* (122) 741-748.

Campbell BK, Scaramuzzi RJ & Webb R (1996) Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. *Journal of Reproduction & Fertility* (106) 7-16.

Chandrasekher YA, Van Dessel HJ, Fauser BC & Giudice LC (1995) Estrogen- but not androgen-dominant human ovarian follicular fluid contains an insulin-like growth factor binding protein-4 protease. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (80) 2734-2739.

De Jong FH (1988) Inhibin. *Physiological Reviews* (68) 555-607.

Findlay J (1986) The nature of inhibin and its use in the regulation of fertility and diagnosis of infertility. *Fertility & Sterility* (46) 770-783.

Good TEM, Weber PSD, Ireland JLH, Pulaski J, Padmanabhan V, Schneyer AL, Lambert-Messerlian G, Ghosh BR, Miller WL, Groome N & Ireland JJ (1995) Isolation of nine different biologically and immunologically active molecular variants of bovine follicular inhibin. *Biology of Reproduction* (53) 1478-1488

Groome N (1991) Ultrasensitive two-site assays for inhibin-A and activin-A using monoclonal antibodies raised to synthetic peptides. *Journal of Immunological Methods* (145) 65-69.

Groome N, Hancock J, Betteridge A, Lawrence M & Craven R (1990) Monoclonal and polyclonal antibodies reactive with the 1-32 amino terminal sequence of the alpha subunit of human 32K inhibin. *Hybridoma* (9) 31-42.

Groome N & Lawrence M (1991) Preparation of monoclonal antibodies to the beta A subunit of ovarian inhibin using a synthetic peptide immunogen. *Hybridoma* (10) 309-316.

Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Cooke I, Ganesan TS, Baird DT & McNeilly AS (1994) Detection of dimeric inhibin throughout the human menstrual cycle by two-site enzyme immunoassay. *Clinical Endocrinology* (40) 717-723.

Guilbault LA, Rouillier P, Matton P, Glencross RG, Beard AJ & Knight PG (1993) Relationships between the level of atresia and inhibin contents (alpha subunit and alpha-beta dimer) in morphologically dominant follicles during their growing and regressing phases of development in cattle. *Biology of Reproduction* (48) 268-276.

Gutiérrez C, Campbell B & Webb R (1997) Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biology of Reproduction* (56) 608-616.

Henderson KM & Franchimont P (1981) Regulation of inhibin production by bovine ovarian cells *in vitro*. *Journal of Reproduction & Fertility* (63) 431-442.

Henderson KM & Franchimont P (1983) Inhibin production by bovine ovarian tissues *in vitro* and its regulation by androgens. *Journal of Reproduction & Fertility* (67) 291-298.

Imai M, Yamoto M, Otani H & Nakano R (1996) Cytokine modulation of inhibin secretion in cultured rat granulosa cells. *Journal of Endocrinology* (151) 449-457.

Hopko-Ireland JL, Good TE, Knight PG & Ireland JJ (1994) Alterations in amounts of different forms of inhibin during follicular atresia. *Biology of Reproduction* (50) 1265-1276.

Knight P (1991) Identification and purification of inhibin and inhibin-related proteins. *Journal of Reproduction & Fertility Supplement* (43) 111-123.

Knight PG (1996) Roles of inhibins, activins, and follistatin in the female reproductive system. *Frontiers in Neuroendocrinology* 17 476-509.

Knight PG, Beard AJ, Wrathall JH & Castillo RJ (1989) Evidence that the bovine ovary secretes large amounts of monomeric inhibin alpha subunit and its isolation from bovine follicular fluid. *Journal of Molecular Endocrinology* (2) 189-200.

Knight PG, Groome N & Beard AJ (1991) Development of a two-site immunoradiometric assay for dimeric inhibin using antibodies against chemically synthesized fragments of the alpha and beta subunit. *Journal of Endocrinology* (129) R9-12.

Labarca C & Paigen K (1980) A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Analytical Biochemistry* (102) 344-352.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (227) 680-685.

LaPolt PS, Piquette GN, Soto D, Sincich C & Hsueh AJ (1990) Regulation of inhibin subunit messenger ribonucleic acid levels by gonadotropins, growth factors, and gonadotropin-releasing hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* (127) 823-831.

Li D, Kubo T, Kim H, Shimasaki S & Erickson GF (1998) Endogenous insulin-like growth factor-I is obligatory for stimulation of rat inhibin alpha-subunit expression by follicle-stimulating hormone. *Biology of Reproduction* (58) 219-225.

Luck MR, Rodgers RJ & Findlay JK (1990) Secretion and gene expression of inhibin, oxytocin and steroid hormones during the *in vitro* differentiation of bovine granulosa cells. *Reproduction, Fertility, Development* (2) 11-25.

Michel U, Krozowski Z, McMaster J, Yu JH & Findlay JK (1991) The biphasic modulation of inhibin mRNA levels and secretion by PMSG in rat granulosa cells *in vitro*. *Reproduction, Fertility, Development* (3) 215-226.

Mihm M, Good TE, Ireland JL, Ireland JJ, Knight PG & Roche JF (1997) Decline in serum follicle-stimulating hormone concentrations alters key intrafollicular growth factors involved in selection of the dominant follicle in heifers. *Biology of Reproduction* (57) 1328-1337.

Price CA, Carriere PD, Bhatia B & Groome NP (1995a) Comparison of hormonal and histological changes during follicular growth, as measured by ultrasonography, in cattle. *Journal of Reproduction & Fertility* (103) 63-68.

Price CA, Salah N & Groome NP (1995b) Plasma concentrations of dimeric inhibin and oestradiol in heifers undergoing superovulation with eCG or FSH. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* (49) 507-510.

Roberts AJ & Echterkamp SE (1994) *In vitro* production of estradiol by bovine granulosa cells: evaluation of culture condition, stage of follicular development, and location of cells within follicles. *Biology of Reproduction* (51) 273-282.

Robertson D, de Vos F, Foulds L, McLachlan R, Burger H, Morgan F, Hearn M & de Kretser D (1986) Isolation of a 31 kDa form of inhibin from bovine follicular fluid. *Molecular & Cellular Endocrinology* (44) 271-277.

Rouillier P, Matton P, Sirard MA & Guilbault LA (1996) Follicle-stimulating hormone-induced estradiol and progesterone production by bovine antral and mural granulosa cells cultured *in vitro* in a completely defined medium. *Journal of Animal Science* (74) 3012-3019.

Rouillier P, Matton P, Dufour M, Sirard MA & Guilbault LA (1998) Steroid production, cell proliferation, and apoptosis in cultured bovine antral and mural granulosa cells: development of an *in vitro* model to study estradiol production. *Molecular Reproduction & Development* (50) 170-177.

Saumande J (1991) Culture of bovine granulosa cells in a chemically defined serum-free medium: the effect of insulin and fibronectin on the response to FSH. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* (38) 189-196.

Sunderland S, Knight P, Boland M, Roche J & Ireland J (1996) Alterations in intrafollicular levels of different molecular mass forms of inhibin during development of follicular- and luteal-phase dominant follicles in heifers. *Biology of Reproduction* (54) 453-462.

Tate S, Suganuma N, Furuhashi M, Ando T, Asada Y, Kondo I, Kikkawa F & Tomoda Y (1996) Direct effects of estradiol and tamoxifen on gene expressions of inhibin alpha- and beta A-subunits in rat granulosa cells *in vitro*. *Endocrine Journal* (43) 621-628.

Tilbrook AJ, de Kretser DM & Clarke IJ (1992) A role for inhibin in the regulation of the secretion of follicle stimulating hormone in male domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology* (9) 243-260.

Turner IM, Saunders PT, Shimasaki S & Hillier SG (1989) Regulation of inhibin subunit gene expression by FSH and estradiol in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* (125) 2790-2792.

Vaughan JM, Rivier J, Corrigan AZ, McClintock R, Campen CA, Jolley D, Voglmayr JK, Bardin CW, Rivier C & Vale W (1989) Detection and purification of inhibin using antisera generated against synthetic peptide fragments. *Methods in Enzymology* (168) 588-617.

Wrathall J & Knight P (1993) Production of immunoactive inhibin by bovine granulosa cells in serum-free culture: effects of exogenous steroids and FSH. *Domestic Animal Endocrinology* (10) 289-304.

Ying SY (1988) Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocrine Reviews* (9) 267-293.

Zhang Z, Lee VW, Carson RS & Burger HG (1988) Selective control of rat granulosa cell inhibin production by FSH and LH *in vitro*. *Molecular & Cellular Endocrinology* (56) 35-40.

Fig 1. Effect of time of culture on inhibin- α (A) and dimeric inhibin (B) secretion from bovine antral (■) and mural (□) granulosa cells in the presence of FSH (2 ng/ml). ND = not detectable.

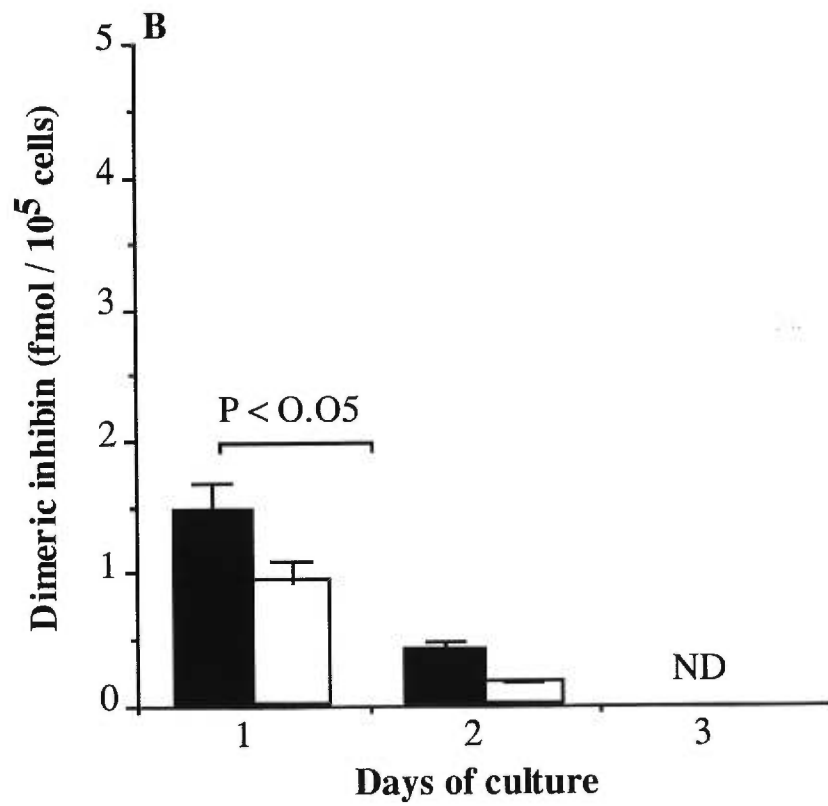
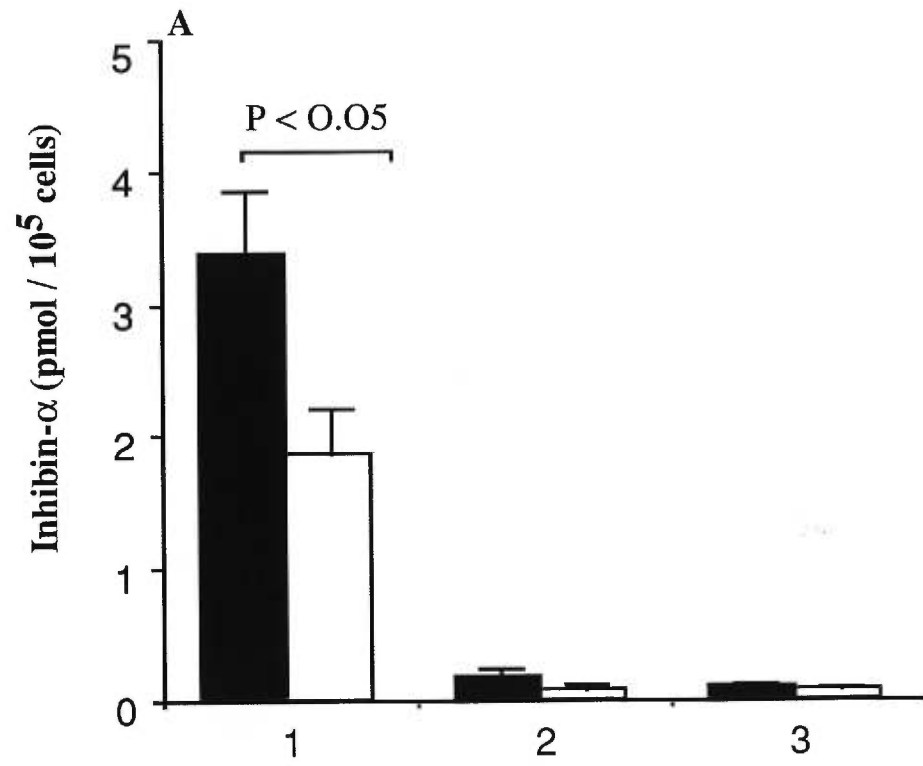


Fig 2. Effect of FSH on the secretion of inhibin- α from antral (A) and from mural (B) granulosa cells on day 2 of culture. * Significantly different ($P < 0.05$) from control culture (no FSH).

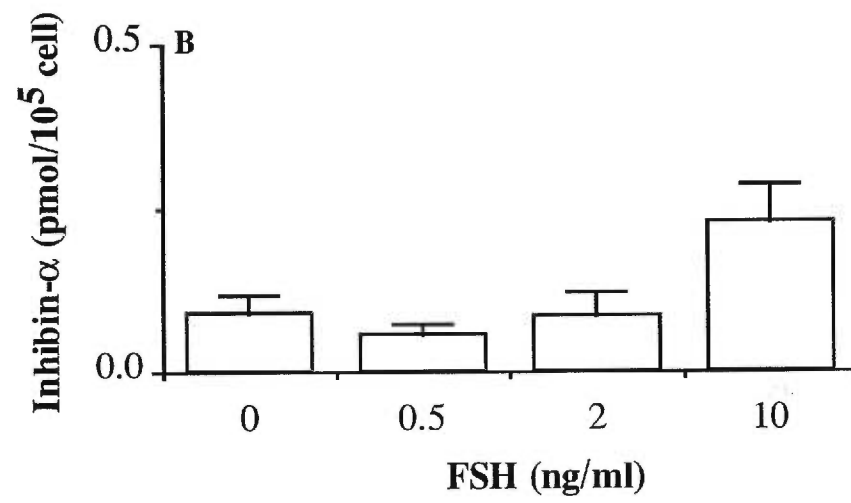
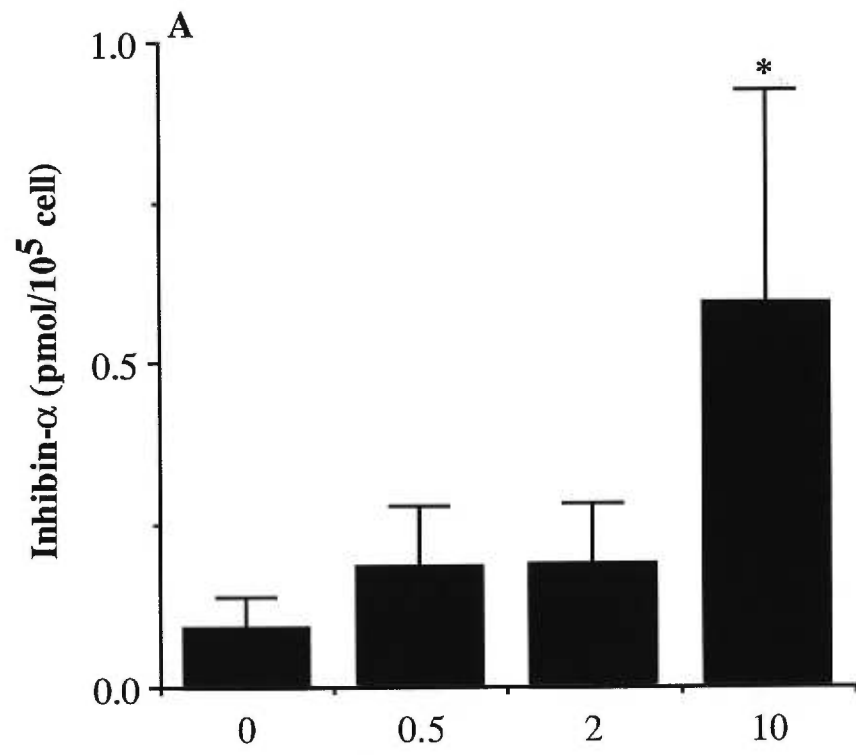


Fig 3. Effect of time of culture on the secretion of dimeric inhibin by granulosa cells from (A) small (3 -5 mm) and (B) large (>8 mm) bovine follicles. Cells were cultured for 2 (■), 4 (□), 6 (▣) and 8 days (▤) ; small follicles only) in the presence or absence of different doses of FSH. For cells from small follicles, superscripts denote significant effects of time within dose of FSH ($P<0.05$).

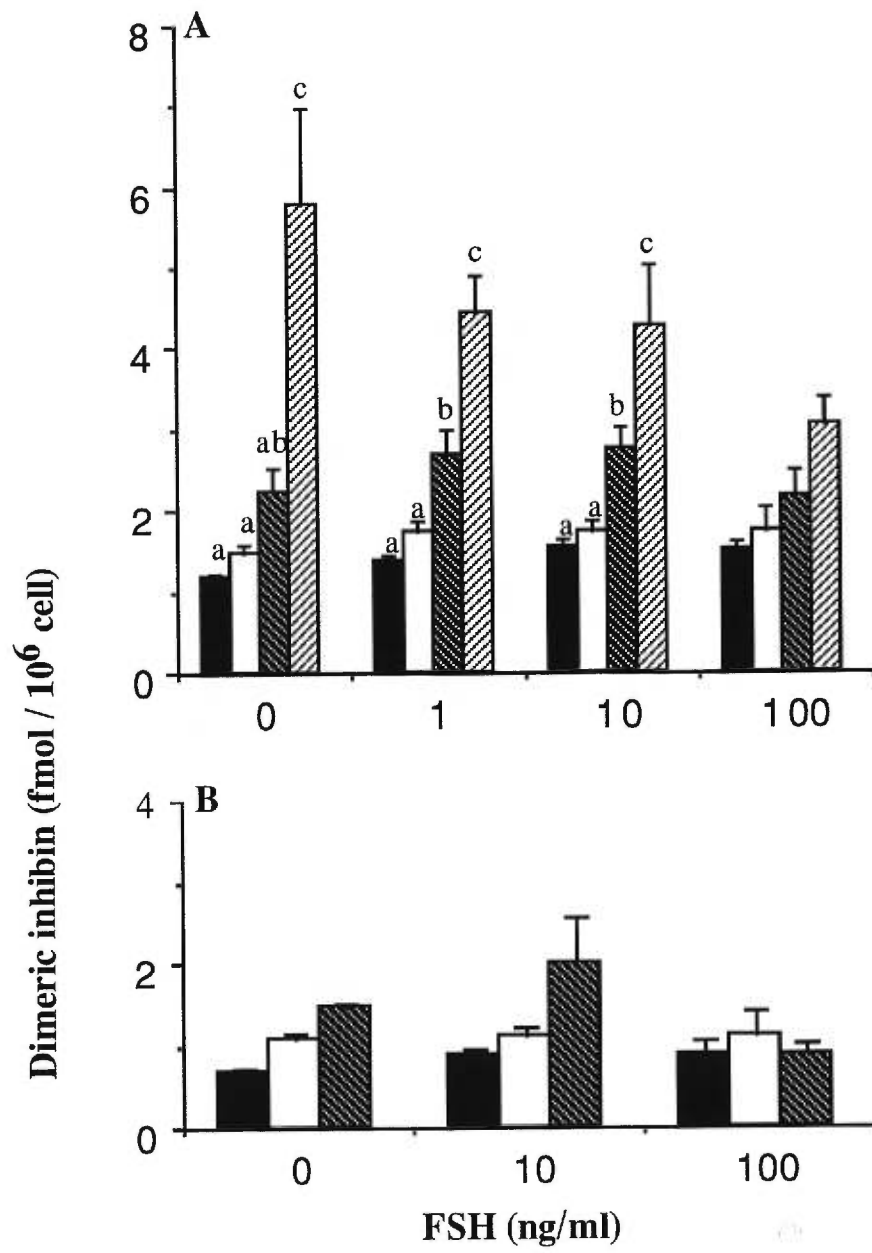


Fig 4. Effect of FSH on dimeric inhibin secretion from cells of (A) small (3 -5 mm) and (B) large (>8 mm) bovine granulosa cells after 6 (large follicles) or 8 days (small follicles) of culture. Data are expressed relative to cell number (total DNA content).

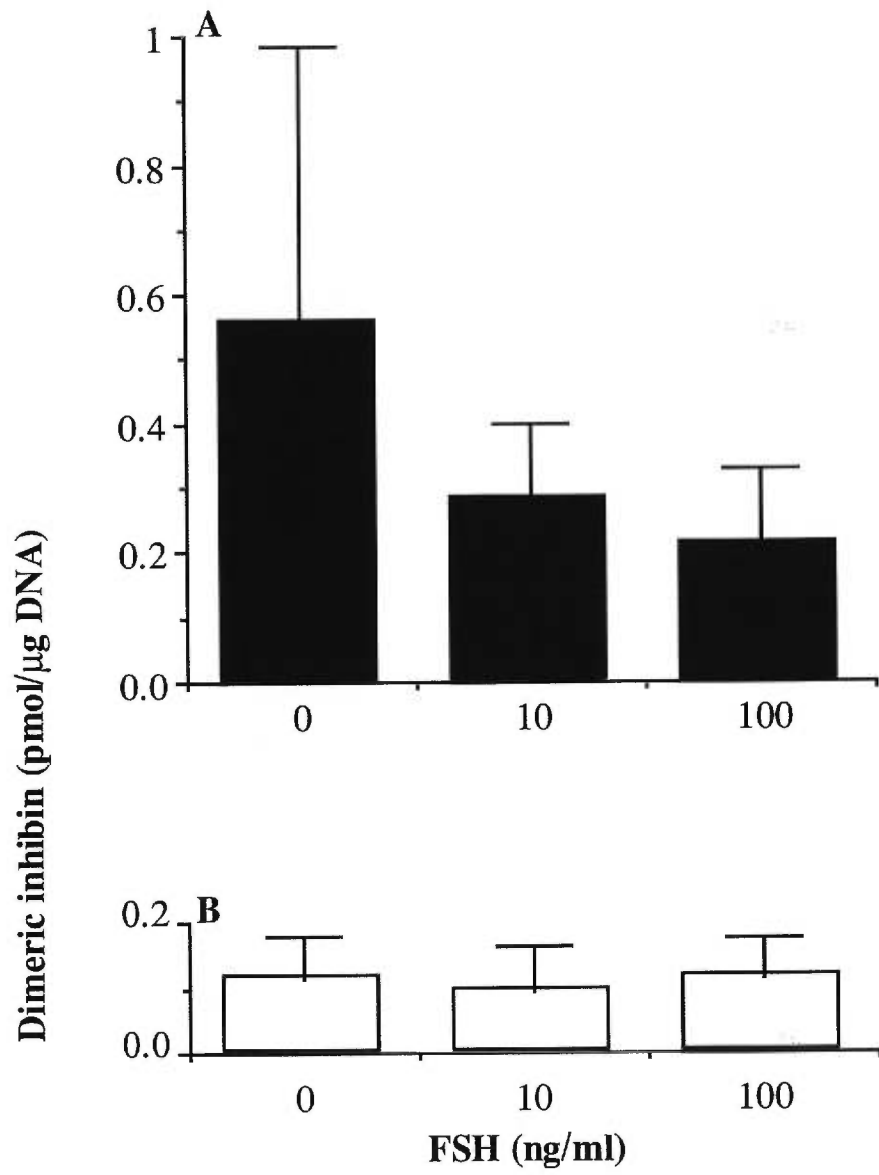
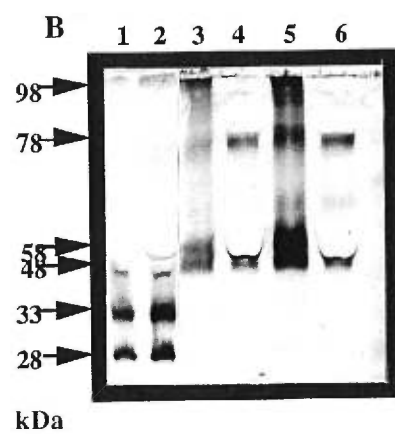
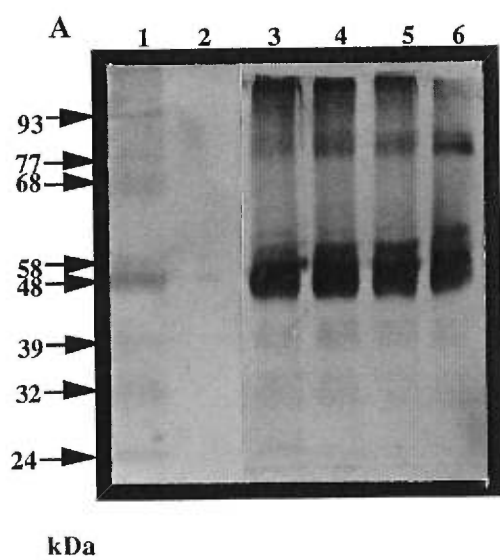


Fig 5. Representative Western immunoblots of inhibin forms secreted from cultured bovine granulosa cells. Panel **A** shows inhibin forms immunoprecipitated with α -subunit antibody (#120) and blotted with β -subunit antibody (E4; see Material and Methods). Samples are follicular fluid (lane 1), fresh culture medium (lane 2; negative control), and medium of cells from small follicles (3 -5 mm) cultured with (lanes 3 - 5) or without (lane 6) FSH. Panel **B** shows inhibin forms in follicular fluid reacting to β -subunit antibody (E4; lanes 1-2), and immunoprecipitated (lanes 3 & 5) or concentrated (lanes 4 & 6) culture medium of cells from small follicles (3 -5 mm) cultured for 6 (lanes 3 & 4) or 8 (lanes 5 & 6) days.



4. CONCLUSION GÉNÉRALE

La présente étude visait à déterminer la sécrétion de l'inhibine- α monomère et dimère par des cellules de la granulosa mises en milieu de culture dépourvu de sérum et à établir si la synthèse d'inhibine est modulé par la FSH, et finalement de déterminer les formes d'inhibine sécrétées par les cellules de granulosa en milieu de culture.

La première expérience consistait à mettre dans un milieu de culture dépourvue de sérum des cellules de granulosa antrales et murales. Les résultats de cette expérience démontrent que les cellules antrales sécrètent beaucoup plus des deux types d'inhibine que les cellules murales. Cette sécrétion est dépendante du temps de culture. Après les premières 24h, les concentrations de l'inhibine- α monomère et dimère sont beaucoup plus élevées dans le milieu de culture des cellules antrales que dans celui des cellules murales. Toutefois, cette concentration diminue entre 24 et 48h, stable entre 48 et 72h pour l'inhibine- α monomère. Pour l'inhibine dimère on a remarqué que les cellules antrales et murales ont libérées des concentrations élevées après 24h de culture. Toutefois, cette concentration à chuter entre 70 et 75% entre 24 et 48h et non détectable entre 48 et 72h. L'effet de la FSH sur la sécrétion de l'inhibine par les cellules de la granulosa est remarquable à 48h de culture sur les cellules antrales ce qui se traduit par une légère augmentation de l'inhibine- α par rapport au témoin. Cependant, cet effet n'est pas remarqué sur les cellules murales pendant toute la période expérimentale. Aucun effet n'a été remarqué sur la sécrétion de l'inhibine dimère suite au traitement des cellules par la FSH.

Dans la seconde expérience, les résultats de culture des cellules de granulosa récoltées de petits et gros follicules indiquent que la sécrétion de l'inhibine dimère par les deux types cellulaires dépend du temps en culture. On a remarqué que la sécrétion a augmenté significativement entre le 4^{ième} et le 6^{ième} jour en comparaison avec le 2^{ième} jour jusqu'à atteindre un maximum au 8^{ième} jour de culture. L'ajout de la FSH dans les milieux de culture n'affecte pas la sécrétion de l'inhibine dimère par les cellules de la granulosa.

Les résultats obtenus avec le transfert des protéines par la technique de Western démontrent que les cellules de la granulosa du milieu de culture de la deuxième expérience sécrètent plusieurs formes d'inhibine. Les formes trouvées dans le milieu de culture immunoprécipité de la deuxième expérience sont présentées par rapport à l'intensité de la bande suivant un ordre décroissant: 77, 68, 58, 48, et 32kDa. Dans le

liquide folliculaire immunoprécipité, on a identifié 8 formes d'inhibine: 32, 39, 48, 58, 68, 77, 93 et >100kDa.

On peut conclure que les deux modèles de cultures cellulaires sécrètent l'inhibine dimère différemment. Cette différence de sécrétion de l'inhibine dimère serait expliquée par l'origine des ovaires. Les cellules antrales et murales dans la première expérience proviennent de génisses traitées avec 1.500UI d'eCG. Par contre, les cellules de la deuxième expérience sont des cellules d'ovaires de vaches adultes et normalement cyclées. Donc, l'inhibine dimère libérée par les cellules de granulosa antrales et murales après 24h de culture a été synthétisée en réponse à une forte dose de FSH du traitement avec l'eCG. La deuxième explication possible à la différence entre ces deux modèles de culture est que dans la première expérience les puits de la plaque de culture ont été préincubés avec de la fibronectine afin de favoriser l'attachement des cellules au fonds des puits et absence d'IGF dans le milieu de culture. Par contre, dans la deuxième expérience de culture on a rajouté dans le milieu de culture de l'IGF qui est un facteur de croissance indispensable pour le développement des cellules de la granulosa *in vivo* et *in vitro* et les plaques n'ont pas été préincubé par la fibronectine. Ceci suggère que les cellules de la première expérience seraient luteïnisées après 24h de culture.

Le traitement des cellules avec la FSH n'a aucun effet sur la sécrétion de l'inhibine dimère par les cellules de la granulosa dans les deux types de culture. Cela suggère qu'un facteur d'origine de la thèque modulerait l'action de la FSH sur les cellules de la granulosa *in vivo*. Toutefois, on a remarqué une réponse à la FSH par les cellules antrales à 48h de culture qui se caractérisait par une libération de l'inhibine- α monomère par ces derniers. Cet effet n'a pas été observé avec les cellules murales ce qui suggère que les cellules murales perdent rapidement les récepteurs à la FSH.

Les cellules de la granulosa *in vitro* libèrent approximativement les mêmes formes retrouvées dans le liquide folliculaire. Les formes d'inhibine en grande concentration dans le milieu de culture étaient le 49, 58 et 77kDa. La forme d'inhibine 32kDa est présente dans le milieu de culture mais en faible concentration, cela suggère que les cellules libèrent dans le milieu de culture une faible concentration de protéase de coupure de la sous-unité α de 43kDa appartenant à la forme d'inhibine dimère 58kDa, pour donner une sous unité de 20kDa qui est une composante structurelle de l'inhibine dimère de 32kDa.

5. BIBLIOGRAPHIE

Abraham GE; Odell, W.D; Swerdloff, R.S. et Hopper, K. (1972). Simultaneous radioimmunoassay of plasma FSH, LH, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, and estradiol-17 beta during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* **34(2)**, 312-8.

Adams, G.P. et Pierson, R.A. (1995). Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans. *Theriogenology.* **43**, 113-120.

Adams, G.P, Evans, A.C.O. et Rawlings, N.C. (1994). Follicular waves and circulating gonadotropins in 8-months old prepubertal heifers. *Journal of reproduction and fertility.* **100 (1)**, 27-33.

Adams, G.P, Matteri, R.L, Kastelic, J.P; Ko, J.C.H. et Ginther, O.J. (1992). Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Repro & fertil.* **94**, 177-88

Adashi, E.Y; Resnick, C.E; Svoboda, M.E. et Van Wyk, J.J. (1985). Somatomedin-C mediated potentiation of follicle-stimulating hormone in the acquisition of progestin biosynthesis capacity by cultured rat granulosa cells. *Endocrinol.* **116**, 2135-42.

Adashi, E.Y; Resnick, C.E; D'ercole, A.J; Svoboda, M.E. et Van Wyk, J.J. (1985). Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr Rev.* **6**, 400-420.

Adashi, E.Y; Resnick, C.E; Hurwitz, A; Ricciarellie, E; Hernandez, E.R; Roberts, C.T; Leroith, D. et Rosenfeld, R. (1992). The intra-ovarian IGF system. *Growth Regul.* **2(1)**, 10-5.

Ahmad, N; Townesend, E.C; Dailey, R.A. et Inskeep, E.K. (1997). Relationships of hormonal patterns and fertility to occurrence of two or three waves of ovarian follicles, before and after breeding, in beef cows and heifers. *Anim Reprod Sci.* **49(1)**, 13-28.

Aloi, J; Dalkin, A; Schwartz, N; Yasin, M; Mann, B; Haisenleder, D. et Marshall, J. (1995). Ovarian inhibin subunit gene expression-regulation by gonadotropins and estradiol. *Endocrinol.* **136**, 1227-32.

Amsterdam, A. et Selvaraj, N. (1997). Control of differentiation, transformation, and apoptosis in granulosa cells by oncogenes, oncoviruses, and tumor suppressor genes. *Endo Rev.* **18(4)**, 435-61.

Amsterdam, A; Plehn-Dujowich, D. et Suh, B.S. (1992). Structure-function relationships during differentiation of normal and oncogene transformed granulosa cells. *Biol Reprod.* **46**, 513-22.

Amsterdam, A; Keren-Tal, I. et Aharoni, D. (1996). Cross-talk between cAMP and p53-generated signals in induction of differentiation and apoptosis in steroidogenic granulosa cells. *Steroids.* **61**, 252-56.

Anderson, E. (1979). Follicular morphology. In: Midgley, A.R; Sadler, W.A. (eds.), *Ovarian Follicular Development and Function*. New York: Raven Press. 91-105.

Arizumi, T; Yashiro, T; Sugino, K. et Titani, K. (1992). Isolation and characterization of native activin B. *Journal of Biological Chemistry.* **267(23)**, 16385-9.

Armstrong, D.T. et Papkoff, H. (1976). Stimulation of aromatization of exogenous and endogenous in ovaries of hypophysectomized rats in vivo by follicle stimulating hormone. *Endocrinol.* **99**, 1144-51.

Armstrong, D.G. et Webb, R. (1997). Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factor and novel proteins. *Rev Reprod.* **2(3)**, 139-46.

Armstrong, D.G; Baxter, G; Hogg, C.O. et Webb, R. (1996a). Insulin-like growth factor binding protein-2 and -4 mRNA expression in bovine ovarian follicles *in vivo* : the effect of follicle size and atresia. *J Repro & Fertil. Abstract series 18.* Abstract. 72.

Armstrong, D.G; Gutierrez, C.G; Hogg, C.O; Campbell, B.K. et Webb, R. (1996b). Expression of insulin-like growth factor binding proteins in primary cultures of bovine granulosa and theca cells. *T Repro Fertil. Abstract series 17* Abstract 30

Asashima, M; Nakano, H; Uchiyama, H; Sugino, H; Nakamura, T; Eto, Y; Ejima, D; Nishimatsu, S; Ueno, N et Kinoshita, K. (1991). Presence

of activin (erythroid differentiation factor) in unfertilized eggs and blastulae of *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **88**, 6511-14.

Attardi, B. et Miklos, J. (1990). Rapid stimulatory effect of activin-A on messenger RNA encoding the follicle-stimulating hormone beta-subunit in rat pituitary cell cultures. *Mol Endocrinol.* **4(5)**, 721-6.

Attisano, L; Wrana, J; Cheifetz, S. et Massague, J. (1992). Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptor. *Cell.* **68**, 97-108.

Attisano, L; Carcamo, J; Ventura, F; Weis, J.M.B; Massagué, J. et Wrana, J.L. (1993). Identification of human activin and TGF- β types I receptors that form heteromeric kinase complexes with types II receptors. *Cell.* **75**, 671-80.

Badinga, L.M; Driancourt, M.A; Savio, J.D; Wolfenson, D. et Thatcher, W.W. (1991). Changes in follicular development, aromatase activity, and follicular steroids in dominant and subordinate follicles at days 5, 8, and 12 of the estrous cycle in cattle. *Biol Reprod.* 157-63.

Badinga, L; Driancourt, M.A; Savio, J.D; Wolfenson, D; Drost, M; de la Sota, R.L. et Thatcher, W.W. (1992). An ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. *Bio Repro.* **47**, 871-83.

Badinga, L; Driancourt, M.A; Savio, J.D; Wolfenson, D; Drost, M; De La Sota, R.L. et Thatcher, W.W. (1993). Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. *Biol Reprod.* **47(5)**, 871-83.

Baird, D.T. (1987). A model for follicular selection and ovulation: Lessons for superovulation. *J. Steroid. Biochem.* **27**, 15-23.

Baird, D.T. et Smith, K.B. (1993). Inhibin and related peptide in the regulation of reproduction. *Oxf Rev Reprod Biol.* **15**, 191-232.

Baker, H.W; Bremner, W.J; Burger, H.G; de Kretser, D.M; Dulmanis, A; Eddie, L.W; Hudson, B; Keogh, E.J; Lee, V.W. et Rennie, G.C. (1976). Testicular control of follicle-stimulating hormone secretion. *Recent Prog Horm Res.* **32**, 429-476.

Barton, D.E; Yang-Feng, T.L; Mason, A.J; Seeburg, P.H. et Francke, U. (1989). Mapping of genes for inhibin subunits alpha, beta A, and beta B on human and mouse chromosomes and studies of jsd mice. *Genomics*. **5(1)**, 91-99.

Beard, A.J; Castillo, R.J; McLeod, B.J; Glencross, R.G. et Knight, P.G. (1990). Comparison of the effects of crude highly purified bovine inhibin (Mr 32000) on plasma concentrations of FSH and LH in chronically ovariectomized prepubertal heifers. *J Endocrinol*. **119**, 2711-19.

Bendell, J.J. et Dorrington, J. (1991). Estradiol-17 beta stimulates DNA synthesis in rat granulosa cells: action mediated by transforming growth factor-beta. *Endocrinology*. **128(5)**, 2663-5.

Bergh, C; Carlsson, B; Olsson, J.H; Selleskog, U. et Hillensjo, T. (1993). Regulation of androgen production in cultured human thecal cells by insulin-like growth factor I and insulin. *Fertil Steril*. **59(2)**, 323-31.

Bernard, J.A; Lyons, R.M. et Moses, H.L. (1990). The cell biology of transforming growth factor β . *Bioch Biophys Acta*. **1032**, 79-87.

Besnard, N; Pisselet, C; Monniaux, D; Locatelli, A; Benne, F; Gasser, F; Hatey, F. et Monget, P. (1996a). Expression of messenger ribonucleic acids of insulin-like growth factor binding protein-2, -4, and -5 in the ovine ovary: localization and changes during growth and atresia of antral follicles. *Biol Reprod*. **55(6)**, 1356-67.

Besnard, N; Pisselet, C; Zapf, J; Hornebeck, W; Monniaux D. et Monget, P. (1996b). Proteolytic activity is involved in changes in intrafollicular insulin-like growth factor-binding protein levels during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Endocrinology*. **137(5)**, 1599-607.

Bicsak, T.A; Cajander, S.B; Vale, W. et Hsueh, A.J.W. (1988). Inhibins: Studies of stored and secreted forms by biosynthetic labeling and immuno-detection in cultured rat granulosa cells. *Endocrinol*. **122**, 741-48.

Bicsak, T.A; Tucker, E.M; Cappel, S; Vaughan, J; Rivier, J; Vale, W. et Hsueh, A.J. (1986). Hormonal regulation of granulosa cell inhibin. *Endocrinol*. **119**, 2711-19.

- Billig, H; Furuta, I. et Hsueh, A.J. (1993).** Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*. **133(5)**, 2204-12.
- Billig, H; Chun, S.Y; Eisnhauer, K. et Hsueh, A.J. (1996).** Gonadal cell apoptosis: Hormone regulated cell demise. *Hum Reprod Update*. **2(2)**, 103-17.
- Block, E. (1951).** Quantitative morphological investigation of the follicular system in the women. *Acta Endocrinol (Copenh)*. **8**, 33-54.
- Bodensteiner, K.J; Wiltbank, M.C; Bergfelt, D.R. et Ginther, O.J. (1996).** Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. *Theriogenology*. **45**, 499-512.
- Bomsel-Helmreich, O; Gougeon, A; Thibault, A; Saltarelli, D; Milgrom, E; Frydman, R. et Papiernik, E.(1979).** Healthy and atretic human follicles in the preovulatory phase: differences in evolution of follicular morphology and steroid content of follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab*.**48(4)**, 686- 694.
- Braden, T.D. et Conn, P.M. (1992).** Activin-A stimulates the synthesis of gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrinology*. **130(4)**, 2101-5.
- Brown, R.W; Hungerford, J.W; Greenwood, P.E; Bloor, R.J; Evans, D.F; Tsonis, C.G. et Forage, R.G.(1990).** Immunisation against recombinant bovine inhibin α subunit causes increased ovulation rates in gilts. *J Reprod Fertil*. **90**, 199-205.
- Butler, W.R; Katz L.S; Arriola, J; Milvae, R.A. et Foote, R.H. (1983).** On the negative feedback regulation of gonadotropins in castrate and intact cattle with comparison of two FSH radioimmunoassays. *J. Anim. Sci*. **56**. 919-29.
- Buttke, T.M. et Sandstorm, P.A. (1994).** Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today*. **15**, 7-10.
- Campbell, B.K. (1989).** Inhibin oestradiol and progesterone production by ovine granulosa cells in vitro. *J Reprod Fertil. Abstract Series 3* Abstract 37.
- Campbell, B.K; Gordon, B.M. et Scaramuzzi, R.J. (1994).** The effect of ovarian arterial infusion of transforming growth factor- α on ovarian follicle population

and ovarian hormone secretion in ewes with autotransplant ovary. *J Endocrinol.* **143**, 13-24.

Campbell, B.K; Scaramuzzi, R.J. et Webb, R. (1995). Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J. Reprod. Fert. Suppl.* **49**, 335-50.

Campbell, B; Scaramuzzi, R.J. et Webb, R. (1996). Induction and maintenance of estradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free. *J Repro Fertil.* **106**, 7-16.

Campbell, B.K; Picton, H, McNeilly, A. et Baird, D. (1991). Effect of FSH on ovarian inhibin secretion in anoestrus ewes. *J Repro Fertil.* **91**, 501-09.

Carriere, P.D; Harvey, D. et Cooke, G.M. (1996). The role of pregnenolone-metabolizing enzymes in the regulation of oestradiol biosynthesis during development of the first wave dominant follicle in the cow. *J Endocrinol.* **149**, 233-42.

Carroll, R.S; Kowash, P.M; Lofgren, J.A; Schwall, R.H. et Chin, W. W. (1991). In vivo regulation of FSH synthesis by inhibin and activin. *Endocrinology.* **129(6)**, 3299-304.

Carson, R.S; Findlay, J.K; Burger, H.G. et Trounson, A.O. (1979). Gonadotrophin receptors of the ovine ovarian follicle during follicular growth and atresia. *Biol Reprod.* **21**, 75-87.

Carson, R; Zhang, Z; Hutchinson, L; Herington, A. et Findlay, J. (1989). Growth factors in ovarian function. *J Reprod & Fertil.* **85**, 735-46.

Cate, R.L; Mattaliano, R.J; Hession, C; Tizard, R; Farber, N.M; Cheung, A; Ninfa, E.G; Frey, A.Z; Gash, D.J; Chow, E.P. et al. (1986). Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell.* **45(5)**, 685-98.

Catt, K.J. (1987). Molecular mechanisms of hormone action: control of target cell function by peptide, steroid, and thyroid hormones. In: Felig, P; Baxter, J.D; Broadus, A.E. et Frohman, L.A. (eds), *Endocr & Metabol. (eds-2.)* McGraw Hill, New York, pp 82-165.

Caubo, B; DeVinna, R.S. et Tonetta, S.A. (1989). Regulation of steroidogenesis in cultured porcine theca cells by growth factors. *Endocrinol.* **125(1)**, 321-6.

Channing, C.P; Tanabe, K; Turner, C.K. et Hodgen, G.D. (1982). Antisera to porcine follicular fluid in monkeys: neutralization of human and pig inhibin activity in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* **55(3)**, 481-486.

Channing, C.P, Chacom, M, Tanabe, K, Gagliano, P. et Tildon, T. (1984). Follicular fluid inhibin activity and steroid levels in ovarian tissue obtained at autopsy from human infants from 18 to 200 days of age. *Fert Steril.* **42**, 861- 69.

Channing C.P; Anderson, L.D; Hoover, D.G; Kolena, J.Osteen, K.G; Pomerantz, S.H. et Tanabe, K. (1982). The role of nonsteroidal regulators in control oocyte and follicular maturation. *Recent Prog Horm Res.* **38**, 331-40.

Charbonneau, G; et Sirard, M.A. (1994). Influence of follicular wall on meiotic resumption of bovine oocytes when cultured inside or outside hemi-sections. *J of Repro Develop.* **40**, 125-132.

Chegini, N. et Williams, R.S. (1992). Immunocytochemical localization of transforming growth factor (TGFs) TGF- α and TGF- β in human ovarian tissues. *J Clin Endocrinol & Meta.* **74**, 973-80.

Choudary, J.B; Gier, J.T. et Marion, G.B. (1968). Cyclic changes in bovine vesicular follicle. *J. Anim. Sci.* **27**, 468-71.

Chun, S.Y; Billig, H; Tilly, J.L; Furuta, I; Tsafiriri, A. et Hsueh, A.J. (1993). Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. **135(5)**, 1845-53.

Chun, S.Y; Eisenhauer, K.M; Minami, S; Billig, H; Perlas, E. et Hsueh, A.J. (1996). Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. **137(4)**, 1447-56.

Couet, J; Martel, C; Dupont, E; Luu-The, V; Sirard, M.A; Zhao, H. F; Pelletier, G.E. et Labrie, F. (1990). Changes in 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase messenger ribonucleic acid, activity and

protein levels during the estrous cycle in the bovine ovary. *Endocrinology*. **127** (5), 2141-8.

Crawford, R.J; Hammond, V.E; Evans, B.A; Coghlan, J.P; Haralambidis, J; Hudson, B; Penschow, J.D; Richards, R.I. et Tergear, G.W. (1987). Alpha-inhibin gene expression occurs in ovine adrenal cortex and is regulated by adrenocorticotropin. *Mol Endocrinol*. **1**, 699-706.

Croze, F. et Franchimont, P. (1984a). Biological determination of inhibin in rat ovarian cell culture medium. *J Repro & Fertil*. **72**, 237-48.

Croze, F; Franchimont, P. (1984b). An in-vitro model for the study of inhibin production by rat ovarian cells. *J Reprod Fertil*. **72(1)**, 249-260.

Davis, S.R; Krozowski, Z; McLachlan, R.I. et Burger, H.G. (1987). Inhibin gene expression in the human corpus luteum. *J Endocrinol*. **115**, R21-23.

Davis, S.R; Dench, F; Nikolaidis, I; Clements, J.A; Forage, R.G; Korozowski, Z. et Burger, H.G. (1986). Inhibin A-subunit gene expression in the ovaries of immature female rats stimulated by pregnant mare serum gonadotropin. *Bioch Bioph Res Com*. **138**, 1191-95.

de Jong, F.H. et Sharpe, R.M. (1976). Evidence for inhibin-like activity in bovine follicular fluid. *Nature (Lond)* **263**, 71-72.

de Jong, F.H; Smith, S.D. et van der Molen, H.J. (1979). Bioassay of inhibin-like activity using pituitary cells *in vitro* . *J Endocrinol*. **80**, 91-102.

de Kretser, D.M. et Robertson, D.M. (1989). The isolation and physiology of inhibin and related proteins. *Biol Reprod*. **40(1)**, 33-47.

de Kretser, D.M; Foulds, L; Hancock, M. et Robertson, D. (1994a). Partial characterisation of inhibin, activin and follistatin in the term human placenta. *J Clin Endocrino Metab*. **79**, 502-507.

de Kretser, D.M; Foulds, L; Hancock, M; McFarlane, J; Goss, N et Jenkin, G. (1994b). The isolation of activin from ovine amniotic fluid. *Endocrinol*. **134**, 1231-37.

- de la Sota, R.L; Simmen, F.A; Diaz, T et Thatcher, W.W. (1996).** Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. *Biol Reprod.* **55(4)**. 803-812.
- De Paolo, L.V; Mercado, M; Guo, Y. et Ling, N. (1993).** Increased follistatin (activin binding protein) gene expression in rat anterior pituitary tissue after ovariectomy may be mediated by pituitary activin. *Endocrino.* **132**, 2221-28.
- De Paolo, L.V; Bicsak, T.A; Erickson, G.F; Shimasaki, G.F. et Ling, N. (1991).** Follistatin and activin: A potential intrinsic regulatory system within diverse tissues. *J Exp Bio Med.* 500-512.
- De Paolo, L.V; Hield, A.N; Anderson, L.D; Barraclough, C.A. and Channing, C.P. (1976).** Suppression of pituitary secretion from follicle-stimulating hormone by porcine follicular fluid during pro-oestrus and oestrus in the rat: effects on gonadotropins and steroid secretion, follicular development and ovulation during the following cycle. *J Endocrinol.* **83**, 355-68.
- de Winter, J; Vanderstichele, H; Timmerman, M; Blok, L; Themmen, A. et de Jong, F. (1993).** Activin is produced by rat sertoli cells in vivo and can act as autocrine regulator of sertoli cell function. *Endocrinol.* **132**, 975-82.
- Dharmarajan, A.M; Goodman, S.B; Tilly, K.I. et Tilly, J.L.(1994).** Apoptosis during functional corpus luteum regression: evidence of a role for chorionic gonadotropin in promoting luteal cell survival. *Endo Jour. (Endocrine).* **2**, 295-303.
- Dieleman, S.J; Bevers M.M; Poortman, J. et van Tol H.T.M. (1983).** Steroid and pituitary hormone concentrations in the fluid of preovulatory bovine follicles relative to the peak of LH in the peripheral blood. *J Repro Fertil.* **69**, 641-49.
- Dimattina, M; Albertson, B; Seyler, D.E; Loviaux, D.L. et Falx, R.J. (1986).** Effect of the antiprogestin RU486 on progesterone production by cultured human granulosa cells: Inhibition of the ovarian 3β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Contraception.* **34**, 199-
- Dobos, M; Burger, H.G; Hearn, M.T. et Morgan, F.J. (1983).** Isolation of inhibin from ovine follicular fluid using reversed-phase liquid chromatography. *Mol Cell Endocrinol.* **31(2-3)**, 187-198.

- Dobson, H. (1978).** Plasma gonadotrophins and oestradiol during the estrus in the cow. *J Reprod Fertil.* **52**, 51-53.
- Dorrington, J.H. et Armstrong, D.T. (1979).** Effects of FSH on gonadal functions. *Recent Prog Horm Res.* **35**, 301-42.
- Dorrington, J.H; Chuma, A.V. et Bendell, J.J. (1988).** Transforming growth factor- β and follicle-stimulating hormone promote rat granulosa cell proliferation. *Endocrinol.* **123**, 353-59.
- Dorrington, J.H; Moon, Y.S. et Armstrong, D.T. (1975).** Estradiol-17 β biosynthesis in cultured rat granulosa cells from hypophysectomised immature rats: stimulation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinol.* **97**, 1328-31.
- Draper, L.B; Matzuk, M.M; Roberts, V.J; Cox, E; Weiss, J; Mather, J.P. et Woodruff, T.K. (1998).** Identification of an inhibin receptor in gonadal tumors from inhibin alpha-subunit knockout mice. *J Biol Chem.* **273(1)**, 398-403.
- Driancourt, M.A. (1991).** Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology.* **35**, 55-79.
- Driancourt, M.A; Gougeon, A; Royère, D et Thibault, C. (1991).** La fonction ovarienne. In: Thibault C, Levasseur, M.C (eds). *La reproduction chez les mammifères et l'homme.* Paris, France: Edition Marketing: 273-298.
- Dufour, J; Cahill, L.P. Mauleon, P. (1979).** Short- and long-term effects of hypophysectomy and unilateral ovariectomy on ovarian follicular populations in sheep. *J Reprod Fertil.* **57(2)**, 301-309.
- Dufour, J; Whitmore, J.L; Ginther, O.J. et Casida, L.E. (1972).** Identification of the ovulating follicle by its size in different days of the estrous cycle in heifers. *J. Anim. Sci.* **34**, 85-87.
- Dunkel, L; Tilly, J.L; Shikone, T; Nishimori, K. et Hsueh, A.J.W. (1994).** Follicle stimulating hormone receptors expression in the rat ovary: increases during prepubertal development and regulation by the opposing actions of transforming growth factor β and α . *Biol Reprod.* **50**, 940-48.

Echternkamp, S.E; Howard, H.J; Roberts, A.J; Grizzle, J. et Wise, T. (1994). Relationships among concentrations of steroids, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding proteins in ovarian follicular fluid of beef cattle. *Biol Reprod.* **51(5)**, 971-981.

Echternkamp, S.E; Spicer, L.J; Gregory, K.E; Canning, S.F. et Hammond, J.M. (1990). Concentrations of insulin-like growth factor-I in blood et ovarian follicular fluid of cattle selected for twins. *Biol Reprod.* **43(1)**, 8-14.

Echternkamp, S.E; Spicer, L.J; Klindt, J; Vernon, R.K; Yen, J.T. et Buonomo, F.C. (1994). Administration of porcine somatotropin by a sustained-release implant: effect on follicular growth, concentrations of steroids and insulin-like growth factor I, and insulin-like growth factor binding protein activity in follicular fluid of control, lean, and obese gilts. *J Anim Sci.* **72(9)**, 2431-40.

Eddie, L.W; Baker, H.W.G; Higginson, R.E. et Hudson, B. (1979). A bioassay for inhibin using pituitary cells in culture. *J Endocrinol.* **31**, 187-98.

Erickson, B.H. (1966). Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci.* **25(3)**, 800-805.

Erickson, G.F. et Hsueh, A.J.W. (1978a). Secretion of inhibin by rat granulosa cells in vitro. *Endocrinology.* **103(5)**, 1960-61.

Erickson, G.F. et Hsueh, A.J.W. (1978b). Stimulation of aromatase activity by follicle stimulating hormone in rat granulosa cells in vivo and in vitro. *Endocrinology.* **102(4)**, 1275-82.

Erickson, G.F; Magoffin, D.A; Dyer, C.A. et Hofeditz, C. (1985). The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocr Rev.* **6(3)**, 371-399.

Ethier, J.F; Lussier, JG. et Silverside, D.W. (1997). Bovine activin receptor type IIB messenger ribonucleic acid displays alternative splicing involving a sequence homologous to Src -homology 3 domain binding site. *Endocrinol.* **138(6)**, 2425-34.

Evans, A.C. et Fortune, J.E. (1997). Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology*. **138(7)**, 2963-71.

Fahy, P.A; Wilson, C.A; Beard, A.J; Groome, N.P. et Knight, P.G. (1995). Changes in inhibin-A (α - β A dimer) and total α inhibin in the peripheral circulation and ovaries of a rats after gonadotropins-induced follicular development and during the normal oestrus cycle. *J Endocrinol*. **147**, 271-283.

Fang, J; Yin, W; Smiley, E; Wang S.Q. et Bonadio J. (1996). Molecular cloning of the mouse activin beta E subunit gene. *Bioch Biophy Res Comm*. **228(3)**, 669-74.

Feng, P; Catt, K.J. et Knetcht, M. (1988). Transforming growth factor- β stimulates meiotic maturation of the rat oocyte. *Endocrinol*. **122**, 181-86.

Ferning D.G et Galagher, J.T. (1994). Fibroblast growth factors and their receptors: an information network controlling tissue growth morphogenesis and repair. *Pro Grow Fac Res*. **5**, 353-77.

Fevold, H.R; Lorence, M.C; McCarthy, J.L; Trant, J.M; Kagimoto, M; Waterman, M.R.E. et Mason, J.I. (1989). Rat P450(17 α) from testis: characterization of a full-length cDNA encoding a unique steroid hydroxylase capable of catalyzing both delta 4- and delta 5-steroid-17,20-lyase reactions. *Mol Endocrinol*. **3(6)**, 968-75.

Findlay, J.K. (1993). An update of the roles of inhibin, avtivin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol Reprod*. **48**, 15-23.

Findlay, J; Robertson, D. et Clarke, I. (1987). Influence of dose and route of administration of bovine follicular fluid and suppressive effect of purified inhibin (Mr 31,000) on plasma FSH concentrations in ovariectomized ewes. *J Repro Fertil*. **80**, 455-61.

Findlay, J.K; Doughton, B; Robertson, D.M. et Forage, R.G. (1989). Effects of immunization against recombinant bovine inhibin alpha subunit on circulating concentrations of gonadotrophins in ewes. *J Endocrinol*. **120**, 59-65.

Findlay, J. K; Tsonis, C.G; Doughton, B; Brown, R.W; Bertram, R.C; Braid, G.H; Hudson, G.C; Tierney, M.L; Goss, N.H. Forage, R.G. (1989). Immunisation against the amino-terminal peptide (α N) of the α_{43} subunit impairs fertility in sheep. *Endocrinol.* **123**, 3122-24.

Flack, B. (1959). Site of reproduction of oestrogen in rat ovary as studied in micro-transplants. *Acta physiology scand.* **47**, (suppl. 163): 1.

Flaumenhaft, R; Moscatelli, D. et Fifkin, D.B. (1990). Heparin and heparin-sulfate increase the radius of diffusion and action of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol.* **111**, 1651-59.

Forage, R.G; Brown, R.W; Oliver, K.J; Atache, B.T; Devine, P.KL; Hudson, G.C; Goss, N.H; Bertram, K.C; Tolstoshen, P; Robertson, D.M; de Krester, D.M; Doughton, B; Burger, H.G. et Findlay, J.K. (1987). Immunization against an inhibin subunit produced by recombinant DNA techniques results in an increased ovulation rate in sheep. *J Endocrinol.* **114**, R1-R4.

Forage, R.G, Ring, J.M; Brown, R.W; McInerney, B.V; Cobson, G.S; Gregson, R.P; Robertson, D.M; Morgan, F.J; Hearn, M.T; Findlay, J.K; Wettenhall, R.EH; Burger, H.G. et. de Krester, D.M. (1986). Cloning and sequence analysis of cDNA species coding for the two subunits of ovarian inhibin from bovin follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **83**, 3091-95.

Fortune, J.E. (1986). Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. *Biol Reprod.* **35(2)**, 292-9.

Fortune, J.E. (1986). Effects of LH and FSH on steroidogenesis by bovine granulosa cells from proestrous follicles cultured with and without serum. In: Eshkol, A; Ecktein, B; Dekel, N; Peters, H. et Tsafiriri, A. (eds), *Development and fonction of the reproductive organs. Sero Symposium Review N° 11; Italy, New York, Ares-Serono Symposia*; 331-332.

Fortune, J.E. (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod.* **50**, 225-32.

Fortune, J.E. et Armstrong, D.T. (1977). Androgen production by theca and granulosa isolated from proestrous rat follicles. *Endocrinology.* **100(5)**, 1341-1347.

Fortune J.E. et Armstrong, D.T. (1978). Hormonal control of 17β -estradiol biosynthesis in proestrus rat follicles estradiol production by isolated theca versus granulosa. *Endocrinology*. **102(1)**, 227-35.

Fortune, J.E. et Hansel, W. (1979). Concentration of steroids and gonadotropins in follicular fluid from normal heifers and heifers primed for superovulation. *Biol Reprod*. **32**, 1069-79.

Fortune, J.E. et Hansel, W. (1979). The effects of 17 beta-estradiol on progesterone secretion by bovine theca and granulosa cells. *Endocrinology*. **104(6)**, 1834-8.

Fortune, J.E. et Hansel, W. (1985). Concentrations of steroids and gonadotropins in follicular fluid from normal heifers and heifers primed for superovulation. *Biol Reprod*. **32(5)**, 1069-79.

Fortune, J.E. et Quirk, S.M. (1988). Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *J Anim Sci*. **66**, (suppl 2). 1-8.

Fortune, J.E; Sirois, J; Turzillo, A.M. et Lavoit, M. (1991). Follicle selection in domestic species. *J Repro & Fertil*. **43**, 187-98.

Franchimont, P. (1972). Human gonadotrophin secretion. *J. R. Coll Physicians London*. **6**, 283-98.

Franchimont, P. (1987). L'inhibin. *Ann Endocrinol*. **48**, 441-51.

Fraser, H; Lunn, S; Whitelaw, P. et Hillier, S. (1995). Induced luteal regression: differential effects on follicular and luteal inhibin/activin subunit mRNAs in the marmoset monekey. *J Emdocrinol* **144**, 201-08.

Fraser, H.M; Lunn, S.F; Cowen, G.M. et Illingworth, P.J. (1995). Induced luteal regression in the primate: evidence for apoptosis and changes in c-myc protein. *J Endocrinol*. **147**, 131-37.

Fraser, H.M; Smith, K.B; Lunn, S.F; Cowen G.M; Morris, K. et McNeilly, A.S. (1992). Immunoneutralisation and immunocytochemical localisation of inhibin a subunit during the mid-luteal phase in the stump-tailed macaque. *J Endocrinol*. **133**, 341-47.

Fray, M.D; Wrathall, J.H; Knight, P.G. (1994). Active immunisation against inhibin promotes a recurrent increase in litter size in sheep. *Vet Rec.* **134(1)**, 19-20.

Fukuda, M; Miyamoto, K; Hasegawa, Y; Nomura, M; Igarashi, M; Kangawa, K.et Matsuo, H. (1986). Isolation of bovine follicular fluid inhibin of about 32 kDa. *Mol Cell Endocrinol.* **44(1)**, 55-60.

Funston, R.N; Moss, G.E. et Roberts, A.J. (1995). Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins in bovine sera and pituitaries at different stages of the estrous cycle. *Endocrinol.***136(1)**, 62-68.

Gaido, M.L. et Cidlowski, J.A. (1991). Identification, purification, and characterization of a calcium-dependent endonuclease (NUC18) from apoptotic rat thymocytes. NUC18 is not histone H2B. *J Biol Chem.* **266(28)**, 18580-5.

Garren, L.D; Gill, G.N; Masui, H. et Walton, G.M. (1971). On the mechanism of action of ACTH. *Recent Prog Horm Res.* **27**, 433-78.

Getzenberg, R.H; Pienta, K.J. et Coffey, D.S. (1990). The tissue matrix: cell dynamics and hormone action. *Endocr Rev.* **11(3)**, 399-417.

Ginther, O.J; Kastelik, J.P. et Knopf, M.L. (1989). Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim Reprod Sci.***20**, 187-200.

Ginther, O.J; Knopf, L. et Kastelic, J.P. (1989a). Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod & Fertil.* **87(1)**, 223-230.

Ginther, O.J; Knopf, L. et Kastelic, J.P. (1989b). Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biol Reprod.* **41(2)**, 247-254.

Ginther, O.J; Kot, K; Kulick, L.J. et Wiltbank, M.C. (1997). Sampling follicular fluid altering follicular status in cattle: Oestradiol concentration early in a follicular wave. *Journal of reproduction and fertility.* **109**, 181-186

Ginther, O.J; Kot, K; Kulick, L.J; Martin, S. et Wiltbank, M.C. (1996). Relationships between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. *J Reprod Fertil.* **108(2)**, 271-9.

Gitay-Goren, H; Kim, I; Miggan, S.T. et Schomberg, D.W. (1993). Transforming growth factor beta modulate gonadotropin receptor expression in porcine and rat granulosa cells differently. *Bio Reprod.* **48**, 1284-89.

Giudice, L.C. (1992). Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocr Rev.* **13(4)**, 641-69.

Glencross, R.G; Bleach, E.C.L; McLeod, B.J; Beard, A.J. et Knight, P.G. (1992). Effect of active immunization of heifers against inhibin on plasma FSH concentrations, ovarian follicular development and ovulation rate. *J Endocrinol.* **134**, 11-18.

Glencross, R.G; Bleach, E.C.L; Wood, S.C. et Knight, P.G. (1994). Active immunization of heifers against inhibin: effects on plasma concentrations of gonadotrophins, steroids and ovarian follicular dynamics during prostaglandin-synchronized cycles. *J Reprod Fert.* **100**, 599-605.

Goddard, I. et Benahmed, M. (1994). TGF- β (Transforming Growth Factor β) et ses peptides apparentés dans le contrôle local du testicule. *Contr Fert Sex.* **22(9)**, 567-70.

Gong, J.G; Brameley, T.A; Gutierrez, C.G; Peters, A.R. et Webb, R. (1995). Effects of chronic treatment with a gonadotrophin-releasing hormone agonist on peripheral concentration of FSH and LH, and ovarian function in heifers. *J Repro Fertil.* **105**, 263-70.

Gong, J.G; McBride, D; Bramley, T.A. et Webb, R. (1994). Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor- I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis in vitro. *J Endocrinol.* **143(1)**, 157-64.

Good, T.E; Weber, P.S.D; Ireland, J.L.H; Pulaski, J; Padmanabhan, V; Schneyer, A.L; Lambert-Messerlian, G; Ghosh, B.R; Miller, W.L; Groome, N. et Ireland, J.J. (1995). Isolation of nine different biologically and immunologically active molecular variants of bovine follicular inhibin. *Biol Reprod.* **53(6)**, 1478-1488.

- Goodman, A.L; Nixon, W.E; Johnson, D.K. et Hodgen, G.D. (1977).** Regulation of folliculogenesis in the cycling rhesus monkey: selection of the dominant follicle. *Endocrinology*. **100**(1), 155-61.
- Gore-Langton, R.E. et Armstrong, D.T. (1994).** Follicular steroidogenesis and its control. In: *The Physiol of Reprod.* vol 1. Knobil, E; Neill, J.D. eds. New York: Ravens Press, pp: 571-628.
- Gosden, R.G; Hunter, R.H.F; Telfer, E; Torrance, C et Rrown, N. (1988).** Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.* **82**, 813-25.
- Greenberg, L.H; Stouffer, R.L; Brenner, R.M; Molskness, T.A; Hild-Petito, S.A. et Qing, Yu. (1990).** Are human luteinizing granulosa cells a site of action for progesterone and relaxin? *Ferti Steril.* **53**(3), 446-53.
- Grimes, R.W; Matton, P et Ireland, J.J. (1987).** A comparison of histological and non-histological indices of atresia and follicular function. *Biol. Reprod.* **37**, 82-88.
- Grimes, R.W; Barber; J.A; Shimasaki, S; Ling, N. et Hammond, J.M. (1994).** Porcine ovarian granulosa cells secrete insulin-like growth factor-binding proteins-4 and -5 and express ribonucleic acids: Regulation by follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I. *Biol Reprod.* **50**, 695-701.
- Groome, N. et Lawrence, M. (1991).** Preparation of monoclonal antibodies to the beta A subunit of ovarian inhibin using a synthetic peptide immunogen. *Hybridoma.* **10** (2), 309-16.
- Groome, N. et O'Brien, M. (1993).** Immunoassays for inhibin and its subunits. Further applications of the synthetic peptide approach. *J Immunol Methods.* **165**(2), 167-176.
- Guilbault, L.A; Rouiller, P; Matton, P; Glencross, R.G; Beard, A.J. et Knight, P.G. (1993).** Relationships between the level of atresia and inhibin contents (α subunit and α - β dimer) in morphologically dominant follicles during their growing and regressing phases of development in cattle. *Biol Reprod.* **48**, 268-76.

- Guthrie, H.D; Grimes, R.W.; Cooper, B.S. et Hammond, J.M. (1995).** Follicular atresia in pigs: measurement and physiology. *J Animal Sci.* **73(9)**, 2834-44.
- Guthrie, H.D; Ireland, J.L; Good, T.E. et Ireland, J.J. (1997).** Expression of different molecular mass forms of inhibin in atretic and nonatretic follicles during the early luteal phase and alternogest-synchronized follicular phase in pigs. *Biol Repro.* **56**, 870-7.
- Gutierrez, C.G; Campell, B.K; Armstrong, D,G. et Webb, R. (1997).** Insulin-like growth factor-I (IGF-I) production by bovine granulosa cells in vitro and peripheral (IGF) measurement in cattle serum an evaluation of IGFBP extraction protocols. *J Endocrinol.* **153**, 231-40.
- Gwynne, J.T. et Strauss, J.F 3d. (1982).** The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr Rev.* **3(3)**, 299-329
- Hall, P.F. (1984).** Cellular organization for steroidogenesis. *Inter Rev Cytol.* **86**, 53-95.
- Halvorson, L.M. et DeCherney, A.H. (1996).** Inhibin, activin, and follistatin in reproductive medicine. *Fertil Steril.* **65(3)**, 459-69.
- Hamilton, S.A; Garverick, H.A; Keisler, D.H; Xu, Z.Z; Loos, K; Youngquist, R.S.et Salfen, B.E.(1995).** Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows. *Biol Reprod.* **53(4)**, 890-898.
- Hammond, J.M; Hsu, C.J; Klindt, J; Tsang, B.K. et Downey, B.R. (1988).** Gonadotropins increase concentrations of immunoreactive insulin-like growth factor-I in porcine follicular fluid in vivo. *Biol Reprod.* **38(2)**, 304-8.
- Hammond, J.M; Samaras, S.E; Grimes, R; Leighton, J; Barber, J; Canning, S.F. et Guthrie, H.D. (1993).** The role of insulin-like growth factors and epidermal growth factor- related peptides in intraovarian regulation in the pig ovary. *J Reprod Fertil Suppl.* **48**, 117-25.
- Hasegawa, Y; Inoue, M. et Kobayashi, M. (1991).** Purification and immunological properties of human inhibin and its related peptides in follicular fluid. (abstract 335). *Proc Endocr Soc.* **73**.

Hasegawa, Y; Eto, Y; Ibuki, Y. et Sugino, H. (1994). Activin as autocrine and paracrine factor in the ovary. *Horm Res.* **41 (Suppl 1)**, 55-62.

Hasegawa, Y; Miyamoto, K; Abe, Y; Nakamura, T; Sugino, H; Eto, Y Shibai, H. et Igarashi, M. (1988). Induction of follicle stimulating hormone receptor by erythroid differentiation factor on rat granulosa cell. *Biochem Biophys Res Commun.* **156(2)**, 668-674.

Henderson, K.M et Franchiment, P. (1981). Regulation of inhibin production by bovine ovarian cell in vitro. *J Repro & Fert.* **63**, 431-42.

Henderson, K.M et Franchiment, P. (1983). Inhibin production by bovine ovarian tissues in vitro and its regulation by androgens. *J Repro & Fert.* **67**, 291-98.

Henderson, K.M; Franchimont, P; Charlet-Renard, C. et McNatty, K.P. (1984). Effect of follicular atresia in inhibin production by bovine granulosa cells in vitro and inhibin concentration in the follicular fluid. *J Repro & Fert.* **72(1)**, 1-8.

Hermans, W.P; van Leeuwen, E.C; Debets, M.H; Sander, H.J. et de Jong, F.H. (1982). Estimation of inhibin-like activity in spent medium from rat ovarian granulosa cells during long-term culture. *Mol Cell Endocrinol.* **27(3)**, 277-290.

Hernandez, E.R; Resnick, C.E; Holtzclaw, W.D; Payne, D.W. et Adashi, E.Y. (1988). Insulin as a regulator of androgen biosynthesis by cultured rat ovarian cells: cellular mechanism(s) underlying physiological and pharmacological hormonal actions. *Endocrinology.* **122(5)**, 2034-43.

Hernandez, E.R; Hurwitz, A; Payne, D.W; Dharmarajan, A.M; Purchio, A.F. et Adashi, E.Y. (1990). Transforming growth factor-beta 1 inhibits ovarian androgen production: gene expression, cellular localization, mechanisms(s), and site(s) of action. *Endocrinology.* **127(6)**, 2804-11.

Hillier, S.G. (1991). Regulatory functions for inhibin and activin in human ovaries. *J Endocrinol.* **131(2)**, 171-175.

Hillier, S.G. et Miro, F. (1993). Inhibin, activin, and follistatin. Potential roles in ovarian physiology. *Ann N Y Acad Sci.* **687**, 29-38.

Hillier, S.G; Yong, E.L; Illingworth, P.J; Baird, D.T; Schwall, R.H. et Mason, A.J. (1991). Effect of recombinant activin on androgen synthesis in cultured human thecal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* **72(6)**, 1206-11.

Hillier, S; Yong, E.L; Illingworth, P.J; Baird, D.T; Schwall, R.H. et Mason, A. (1991). Effect of recombinant inhibin on androgen synthesis in cultured human thecal cells. *Mol Cell Endocrinol.* **75**, R1-R6.

Hillier, S; Wicking, E; Saunders, P; Dixon, A; Shimasaki, S; Swantson, I; Reicher, Jr L. et McNeilly, A. (1989). Control of inhibin production by primate granulosa cells. *J Endocrinol.* **121**, 91-100.

Hopko-Ireland, J.L; Good, T.E.M; Knight, P.G. et Ireland, J.J. (1994). Alteration in amounts of different forms of inhibin during follicular atresia. *Biol Reprod.* **50**, 1365-76.

Houde, A; Lussier, J.G; Ethier, J.F; Gagnon, C. et Silversides, D.W. (1994). Cloning and tissue expression of bovine follistatin cDNA. *Mol Repro & Dev.* **37**, 391-97.

Howard, H.J et Ford, J.J. (1994). Differential steroidogenic response of subpopulations of porcine granulosa cells to insulin-like growth factor-1 (IGF-1) or IGF-1 analogs. *Biol Reprod.* **51(1)**, 108-15.

Hsueh, A.J.W; Dahl, K.D; Vaughan, J; Tucker, E. et Rivier, J. (1987). Heterodimers of inhibin subunits have different paracrine actions in the modulation of LH-modulated androgen production. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **84**, 5082-64.

Hubbard, C.J. et Greenwald, G.S. (1985). Morphological changes in atretic Graafian follicles during induced atresia in the hamster. *Anat Rec.* **212(4)**, 353-357

Huet, C; Monget, P; Pisselet, C; Monniaux, D. (1997). Changes in extracellular matrix components and steroidogenic enzymes during growth and atresia of antral ovarian follicles in the sheep. *Biol Reprod.* **56(4)**, 1025-1034.

Huet, C; Monget, P; Pisselet, C; Hennequet, C; Locatelli, A. et Monniaux, D. (1998). Chronology of events accompanying follicular atresia in hypophysectomized ewes. changes in levels of steroidogenic enzymes, connexin 43,

insulin-like growth factor II/mannose 6 phosphate receptor, extracellulaire matrix components, and matrix metalloproteinases. *Biol Repro.* **58**, 175-85.

Hutchinson, L.A; Findlay, J.K; de Vos, F.L. et Robertson, D.M. (1987). Effects of bovine inhibin, transforming growth factor-beta and bovine Activin-A on granulosa cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* **146(3)**, 1405-12.

Igarashi, M. et Sugino, H. (1989). Inhibin alpha-subunit monomer is present in bovine follicular fluid. **159.** 1323-29.

Illingworth. P.J, Reddi, K, Smith, K.B. et Braid, D.T. (1991). The source of inhibin secretion during the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol & Met.* **73(3)**, 667-73.

Inouye, S; Guo, Y; de Paolo, L; Shimonaca, M; Ling, N. et Shimasaki, S. (1991). Recombinant expression of human follistatin with 315 and 288 amino acids: chemical and biological comparison with native porcine follistatin. *Endocrinol.* **129**, 815-22.

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

Ireland, J.J. et Roche, J.F. (1982). Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid and gonadotropins receptors. *Endocrinology.* **111**, 2077-86.

Ireland, J.J. et Roche, J.F. (1983a). Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology.* **112(1)**, 150-56.

Ireland, J.J. et Roche, J.F. (1983b). Growth and differentiation of large follicles after spontaneous luteolysis in heifers: change in concentration of hormones in follicular fluid and specific binding of gonadotropins to follicles. *J. Anim. Sci.* **57**, 157-67.

Ireland, J.J. et Roche, J.F. (1987). Hypothesis regarding development of dominant follicles during the bovine estrous cycle. In: *Follicular growth and ovulation*

rate in farm animals. Roche J.F; O'Callaghan, D. eds. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, pp: 1-18

Ireland, J.J; Coulson, P.B. et Muphree, R.L. (1979). Follicular developement during four stages of the estrous cycle of beef cattle. *L. Anim. Sci.* **49**, 1261-69.

Ireland, J.L.H. et Ireland, J.J. (1994). Changes in expression of inhibin/activin α , β A and β B subunit messenger ribonucleic acids following increases in size and during different stage of differentiation or atresia of non-ovulatory follicles in cows. *Biol Repro.* **50**, 492-501.

Ireland, J.L.H; Good, T.E.M; Knight, P.G. et Ireland, J.J. (1994). Alterations in amounts of differents forms of inhibin during follicular atresia. *Biol Reprod.* **50**, 1265-76.

Jesionowska, H; Hemmings, R; Guyda, H.J. et Posner, B.I. (1990). Determination of insulin and insulin-like growth factors in the ovarian circulation. *Fertil Steril.* **53(1)**, 88-91.

Jih, M; Lu, J; Wan, T.C. et Wu, C. (1993). Inhibin subunit gene expression and distribution in the ovaries of immature, young, adult, middle aged and old female rats. *Endocrinol.* **132**, 319-26.

Jolly, P.D; Tisdall, D.J; De'ath, G; Heath, D.A; Lun, S; Hudson, N.L. et McNatty, K.P. (1997). Granulosa cell apoptosis, aromatase activity, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response togonadotropins, and follicular fluid steroid levels during spontaneous and induced follicular atresia in ewes. *Biol Repro.* **56**, 830-36.

Josso, N. (1986). Antimullerian hormone: new perspectives for a sexist molecule. *Endocr Rev.* **7(4)**, 421-33.

Juneja, S.C; Chegini, N; Williams, R.S. et Ksander, G.A. (1996). Ovarian intrabursal administration of transforming growth factor beta 1 inhibits follicle rapture in gonadotropin-primed mice. *Biol Reprod.* **55(6)**, 1444-51.

- Kaiser, U; Lee, B; Carrol, R; Umabia, G; Chin, W. et Childs, G. (1992).** Follistatin gene expression in the pituitary: Localisation in gonadotrops and folliculostellate cells in diestrous rats. *Endocrinol.* **136**, 35-41.
- Kamada, S; Kubota, T; Taguchi, M; Ho, W. R; Sakamoto, S. et Aso, T. (1992).** Effects of insulin-like growth factor-II on proliferation and differentiation of ovarian granulosa cells. *Horm Res.* **37(4-5)**, 141-9.
- Kastelic, J.P; Knopf, L. and Ginther, O.J. (1990).** Effect of day of prostaglandine F_{2α} treatment on selection and developement of the ovulatory follicule in heifers. *Anim Repro Sci.* **23**, 169-
- Keogh, E.J; Lee, V.W; Rennie, G.C; Burger, H.G; Hudson, B. et De Kretser, D.M. (1976).** Selective suppression of FSH by testicular extracts. *Endocrinol.* **98(4)**, 997-1004.
- Kingsley, D.M. (1994).** The TGF-β superfamily: new members, new receptors, and a new genetic tests of function in differents organisms. *Genes Dev.* **8**, 133-46.
- Knecht, M; Feng, P. et Catt, K. (1987).** Bifunctional role of transforming growth factor-β during granulosa cekk developement. *Endocrinol.* **120**, 1243-49.
- Knight, P.G. et Muttukrishna, S. (1994).** Measurement of dimeric inhibin using a modified two-site immunoradiometric assay specific for oxidized (Met o) inhibin. *J Endocrinol.* **114**, 417-25.
- Knight, P.G; Groome, N et Beard, A.J. (1991).** Developement of a two-site immunoradiometric assay for dimeric inhibin using antibodies against chemically synthesized fragments of the α and β subunit. *J. Endocrinol.* **129**. R9-R12.
- Knight, P.G; Beard, A.J; Wrathall, J.H.M et Castillo, R.J. (1989).** Evidence that the bovine ovary secretes large amounts of monomeric inhibin α-subunit and its isolation from bovine follicular fluid. *J Mol Endocrino.* **2**, 189-200.
- Knopf, L; Kastelic, J.P; Schallenberger, E. et Ginther, O.J. (1989).** Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Domest Anim Endocrinol.* **6(2)**, 111-119.

- Koering, M.J. (1969).** Cyclic changes in ovarian morphology during the menstrual cycle in *Mecaca Mulatta*. *Am J Anat.* **126**, 73-101.
- Kogawa, K; Nakamura, T; Sugino, K; Takio, K; Titani, K. Sugino, H. (1991).** Activin-binding protein is present in pituitary. *Endocrinol.* **128**, 1434-40.
- Kubo, T; Shimasaki, S; Kim, H; Li, D. et Erickson, G.F. (1998).** Activin-induced inhibin alpha-subunit production by rat granulosa cells requires endogenous insulin-like growth factor-I. *Biol Reprod.* **58(3)**, 712-8.
- Lacroix, E; Eechaute, W. E. et Leusen, I. (1974).** The biosynthesis of estrogens by cow follicles. *Steroids.* **23(3)**, 337-56.
- LaPolt, P; Soto, D; Su, J.G; Campen, C; Vaughan, J. Vale, W. et Hsueh, A. (1989).** Activin stimulation of inhibin secretion and messenger RNA levels in cultured granulosa cells. *Mol Endocrinol.* **3**, 1666-73.
- LaPolt, P; Piquette, G; Soto, D; Sinich, C. et Hsueh, A. (1990).** Regulation of inhibin subunit messenger ribonucleic acid levels by gonadotropins, growth factors and gonadotropins releasing hormone in cultured rat granulosa. *Endocrinol.* **127**, 823-31.
- Le Goascogne, C; Sananes, N; Eychenne, B; Gouezou, M; Baulieu, E. E. E. et Robel, P. (1995).** Androgen biosynthesis in the stomach: expression of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase messenger ribonucleic acid and protein, and metabolism of pregnenolone and progesterone by parietal cells of the rat gastric mucosa. *Endocrinology.* **136(4)**, 1744-52.
- Lee, V.W.K, McMaster, J.W; Quigg, H. et Leversha, L. (1982).** Ovarian and circulating inhibin levels in immature female rats treated with gonadotrophin and after castration. *Endocrinol.* **111**, 1849-54.
- Leeuwenberg, B.B; Hurst, P.R. et McNatty, K.P. (1995).** Expression of IGF-I mRNA in the ovine ovary. *J Mol Endocrinol.* **15**, 251-58.
- Leversha, L.J; Robertson, D.M; de Vos, F.L; Morgan, F.J; Hearn, M.T; Wettenhall, R.E; Findlay, J.K; Burger, H.G et de Krester, D.M. (1987).** Isolation of inhibin from ovine follicular fluid. *J Endocrinol.* **113**, 213-221.

- Li, C.H; et Ramasharma, K. (1987).** Inhibin. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* **27**, 1-21.
- Li, D; Kubo, T; Kim, H; Shimasaki, S. et Erickson, G.F. (1998).** Endogenous insulin-like growth factor-I is obligatory for stimulation of rat inhibin alpha-subunit expression by follicle-stimulating hormone. *Biol Repro* (**58**), 219-225.
- Li, R; Phillips, D.M. et Mather, J.P. (1995).** Activin promotes ovarian follicle development in vitro. *Endocrinology.* **136**(3), 849-56.
- Lindsell, C.E; Misra, V. et Murphy, B.D. (1994).** Regulation of follistatin gene expression in the ovary and in primary cultures of porcine granulosa cells. **100**, 591-97.
- Ling, N; de Paolo, L; Bicsak, T.A et Shamasaki, S. (1990).** Novel ovarian regulatory peptides: inhibin, activin, and follistatin. *Clin Obstet Gynecol* **33**(3), 690-702.
- Ling, N; Ying, S.Y; Ueno, N; Esch, F; Denoroy, L. et Guillemin, R. (1985).** Isolation and partial characterisation of Mr 32,000 protein with inhibin activity from porcine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci USA.* **82**, 7271-21.
- Ling, N; Ying, S.Y; Ueno, N; Shimasaki, S; Esch, F; Hotta, M. et Guillemin, R. (1986a).** Pituitary FSH is realised by a heterodimer of the α subunit from the two forms of inhibin. *Nature.* **321**, 779-782.
- Ling, N; Ying, S.Y; Ueno, N; Shimasaki, S; Esch, F; Hotta, M. et Guillemin, R. (1986b).** A homodimer of the β -subunits of inhibin A stimulates the secretion of pituitary follicle stimulating hormone. *Biochem Biophys Com.* **138**, 1129-1137.
- Liu, X.J, Malkowski, M; Guo, Y; Erickson, G.F; Shimasaki, S. et Ling, N. (1993).** Development of specific antibodies to rat insulin-like growth factor-binding protein IGFBP-2 and -6): analysis of IGFBP production by rat granulosa cells. *Endocrinol.* **132**, 1176-83.
- Logan, A. (1990).** Commentary: Intracrine regulation at the nucleus-a further mechanism of growth factor activity ? *J Endocrinol.* **125**(3), 339-43.

- Lucy, M.C; Savio, J.D; Badinga, L; De La Sota, R.L. et Thatcher, W.W. (1992).** Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci.* **70**, 3615-26.
- Lussier, J.G; Matton, P. et Duffour, J.J. (1987).** Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J. Reprod. Fert.* **81**, 301-07.
- Lussier, J.G; Matton, P; Guilbault, L.A; Grasso, F; Mapleloft, R.J. et Carruthers, T.D. (1994).** Ovarien follicular developement and endocrine responses in follicular-fluid-treated and hemi-ovariectomized heifers. *J. Reprod. Fert.* **102**, 95-105.
- MaCullagh, D.R. (1932).** Dual endocrine activity of the testes. *Science.* **76**, 19-20.
- Magoffin, D.A. et Weitsman, S.R. (1993).** Effect of insulin-like growth factor-I on cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 messenger ribonucleic acid expression in ovarian theca-interstitial cells stimulated to differentiate in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* **96(1-2)**, 45-51.
- Magoffin, D.A. et Weitsman, S.R. (1993).** Insulin-like growth factor-I stimulates the expression of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acid in ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod.* **48(5)**, 1166-73.
- Magoffin, D.A; Gancedo, B. Erickson, G.F. (1989).** Transforming growth factor- β promotes differentiation of ovarian theca-interstitial cells but inhibits androgen production. *Endocrinol.* **125**, 1951-58.
- Magoffin, D.A; Kurtz, K.M. et Erickson, G.F. (1990).** Insulin-like growth factor-I selectively stimulates cholesterol side- chain cleavage expression in ovarian theca-interstitial cells. *Mol Endocrinol.* **4(3)**, 489-96.
- Mandel, G.E. et Zuckerman, S. (1950).** The number of normal and atretic ova in the mature rat. *J Endo.* **6**, 426-435.
- Manikkam, M. et Rajamahendran, R. (1997).** Progesterone-induced atresia of the proestrous dominant follicle in the bovine ovary: changes in diameter, insulin-like growth factor system, aromatase activity, steroid hormones, and apoptotic index. *Biol Reprod.* **57(3)**, 580-587.

- Mann, G.E; Campbell, B.K; McNeilly, A.S. et Baird, D.T. (1989).** Passively immunizing ewes against inhibin during the luteal phase of the oestrus cycle raises plasma concentrations of FSH. *J Endocrinol.* **123**, 383-91.
- Mann, G.E; Campbell, B.K; McNeilly, A.S. et Baird, D.T. (1990).** Effects of passively immunizing ewes against inhibin and oestradiol during the follicular phase of the oestrus cycle. *J Endocrinol.* **125**, 417-24.
- Martin, T.L; Fogwell, R.L. et Ireland, J.J. (1991).** Concentration of inhibins and steroids in follicular fluid during development of dominant follicles in heifers. *Biol. Reprod.* **44**, 693-700.
- Martucci, C.P. et Fishman, J. (1993).** P450 enzymes of estrogen metabolism. *Pharmacotherapy.* **57**, 237-257.
- Mason, A.J; Niall, H.D; et Seeburg, P.H. (1986).** Structure of human ovarian inhibin. *Biochem Biophys Res Comm.* **135**, 957-64.
- Mason, A.J; Berkemeier, L.M; Schmelzer, C.H. et Schwall, R.H. (1989).** Activin B: precursor sequences, genomic structure and in vitro activities. *Mol Endocrinol.* **3(9)**, 1352-1358.
- Mason, A.J; Hayflick, J. S; Ling, N; Esch, F; Ueno, N; Ying, S.Y; Guillemin, R; Niall, H. et Seeburg, P.H. (1985).** Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor-beta. *Nature.* **318(6047)**, 659-63.
- Mason, A.J; Hayflicks, J,S; Ling, N; Esch, F; Ueno, N; Ying, S.Y; Guillemin, R; Niall, H. et Seeburg, P.H. (1987).** Complementary DNA sequence of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor- β . *Nature* **318**, 659-63
- Mason, H.D; Margara, R; Winston, R.M; Beard, R.W; Reed, M.J. Franks, S. (1990).** Inhibition of oestradiol production by epidermal growth factor in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *Clin Endocrinol (Oxf).* **33**, 511-17.
- Massagué, J. (1990).** The transforming growth factor- β family. *Ann Rev Cell Biol.* **6**, 597-41.

- Mather, J.P; Woodruff, T.K. et Krummen, L.A. (1992).** Paracrine regulation of reproductive function by inhibin and activin. *Proc Soc Exp Biol Med.* **201(1)**, 1-15.
- Mathews, L. (1994).** Activin receptors and cellular signaling by the receptor serine kinase family. *Endocrine Rev.* **15**, 310-25.
- Mathews, L. et Vale, W. (1991).** Expression cloning of a activin receptors, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell.* **65**, 973-82.
- Mathews, L. et Vale, W. (1993).** Characterisation of typeII activin receptors J *Biol Chem.* **268**, 19013-18.
- Mathews, L; Vale, W. et Kintner, C. (1992).** Cloning of a second activin receptor and fonctionnel characterisation in *Xenopus* embryos. *Science.* **255**, 1702-1705.
- Matrisian, L.M. (1990).** Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet.* **6**, 121-25.
- Matton, P; Adalakoun, V; Couture, Y. et Dufour, J.J. (1981).** Growth and replacement of the bovine ovarien follicule during the oestrus cycle. *J. Anim. Sci.* **52**, 813-20.
- Matzuk, M.M; Kumar, T.R. et Bradley, A. (1995a).** Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. *Nature.* **374**, 356-60.
- Matzuk, M.M; Kumar, T.R; Vassalli, A; Bickenbach, J.R; Roop, D.R; Jaenisch, R. et Bradely, A. (1995b).** Fonctionnal analysis of activins during mammalian developement. *Nature.* **374**, 354-56.
- May, J.V. et Schomberg, D.W. (1989).** The potential relevance of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha to ovarian physiology. *Semin Repro Endocrino.* **7**, 1-11.
- Mayo, K. (1994).** Inhibin and activin: Molecular aspects of regulation and function. *Trends Endocrino Meta.* **5**, 407-415.

- McLachlan, R; Robertson, D; Healy, D; de Krester, D. et Burger. H. (1986).** Plasma inhibin levels during gonadotropin-induced ovarian hyperstimulation for IVF: A new index of follicular function? *Lancet*. **1(8492)**, 1233-34.
- McLachlan, R.I; Robertson, D.M; Healy, D.L; Burger, H.G; de Kretser, D.M. (1987).** Circulating immunoreactive inhibin levels during the normal human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* **65(5)**, 954-961.
- McLachlan, R; Healy, D; Robertson, D.M; Burger. H. et de Krester, D.M. (1987).** Circulating immunoreactive inhibin in the luteal phase and early gestation in women undergoing ovulation induction. *Fert Steril.* **48**, 1011-15.
- McLeod, B.J; Hunter, M.G; Bleach, E.C.L; Glencross, R.G. et Wrathall, J.H. (1992).** Preovulatory follicle development and luteal function in ewes immunized against a synthetic peptide sequence of the α subunit of bovine inhibin. *J Endocrinol.* **133**, 413-19.
- McNatty, K.P; Hunter, W.M; McNeilly A.S. et Sawers, R.S. (1975).** Changes in concentrations of pituitary and steroid hormones in follicular fluid of human graafian follicles throughout the menstrual cycle. *J Endocrinol.* **64**, 555-71.
- McNatty, K.P; Heath, D.A; Henderson, K.M; Lun, S; Hurst, P.R; Ellis, L.M; Montgomery, G.W; Morrison, L. et Thurley, D.C. (1984).** Some aspects of thecal and granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary. *J Reprod Fertil.* **72(1)**, 39-53.
- McNatty, K.P; Heath, D.A; Lun, S; Fannin, J.M; McDiarmid, J.M. et Henderson, K.M. (1984).** Steroidogenesis by bovine theca interna in an in vitro perfusion system. *Biol Reprod.* **30(1)**, 159-70.
- McNeilly, A.S. et Baird, D.T. (1989).** Episodic secretion of inhibin into the ovarian vein during the follicular phase of the oestrous cycle in the ewe. *J Endocrinol* **122**, 287-92.
- McNeilly, A.S; Picton, H.M; Campbell, B.K. et Baird, D.T. (1991).** Gonadotrophic control of follicle growth in the ewe. *J Reprod Fertil. Suppl* **43**, 177-86.

- Meunier, H; Rivier, C; Evans, R.M. et Vale, W. (1988).** Gonadal and extragonadal expression of inhibin α - and β - subunit in various tissues predicts diverse functions. *Proc Natl Acad Sci USA.* **85**, 247-51.
- Michel, U; Jarry, H; Metten, M; Wuttke, W. (1989).** Inhibin production by porcine granulosa and luteal cells: development and biological validation of a RIA. *Acta Endocrinol (Copenh).* **120(4)**, 511-518.
- Michel, U; Lüdemann, S; Jarry, H. et Wuttke, W. (1991).** Effects of growth factors and hormones on basal and FSH-stimulated inhibin production by porcine granulosa cells in vitro. *Reprod Fert & Dev.* **3(2)**, 201-13.
- Miller, W.L. (1988).** Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev.* **9(3)**, 295-316.
- Miller, W.L. et Levine, L.S. (1987).** Molecular and clinical advances in congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr.* **111(1)**, 1-17.
- Miro, F; Smyth, C.D. et Hillier, S.G (1991).** Development-related effects of recombinant activin on steroid synthesis in rat granulosa cells. *Endocrino.* **129(6)**, 3388-94.
- Miyamoto, K; Hasegawa, Y; Fukuda, M; Nomura, M; Igarashi, M; Kangawa, K; et Matsuo, H. (1985).** Isolation of porcine follicular fluid inhibin of 32K daltons. *Biochem Biophys Res Commun.* **129(2)**, 396-403.
- Miyamoto, K; Hasegawa, Y; Fukuda, M. et Igarashi, M. (1986).** Demonstration of high molecular weight forms of inhibin in bovine follicular fluid (bFF) by using monoclonal antibodies to bFF 32k inhibin. *Biochem Biophys Res Commun.* **136**, 1103-09.
- Monget, P. et Monniaux, D. (1995).** Growth factors and the control of folliculogenesis. *J Reprod & Fertil. Suppl* **49**, 321-33.
- Monget, P; Monniaux, D; Pisselet, C. et 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(4)**, 1438-1446.

- Monget, P; Besnard, N; Huet, C; Pisselet, C. et Monniaux, D. (1996).** Insulin-like growth factor-binding proteins and ovarian folliculogenesis. *Horm Res.* **45(3-5)**, 211-7.
- Monniaux, D; Huet, C; Besnard, N; Clément, F; Bosc, M; Pisselet, C Monget, P. et Mariana, J.C. (1997).** Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J Reprod Fertil suppl.* **51**, 3-23.
- Monniaux, D. et Pisselet, C. (1992).** Control of proliferation and differentiation of ovine granulosa cells by insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone in vitro. *Biol Reprod.* **46(1)**, 109-19.
- Monniaux, D; Pisselet, C. et Fontaine, J. (1994).** Uncoupling between proliferation and differentiation of ovine granulosa cells in vitro. *J Endocrinol.* **142(3)**, 497-510.
- Morley, P; Calaresu, F.R; Barbe, G.J. et Armstrong, D.T. (1989).** Insulin enhances luteinizing hormone-stimulated steroidogenesis by porcine theca cells. *Biol Reprod.* **40(4)**, 735-43.
- Mulheron, G.W; Bossert, N.L; Lapp, J.A; Walmer, D.K. et Schomberg, D.W. (1992).** Human granulosa-luteal and cumulus cells express transforming growth factor-beta type I and type II mRNA. *J Clin Endocrinol Metab.* **74**, 458-60.
- Murphy, L.J; Bell, G.I. et Friesen, H.G. (1987).** Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinol.* **120(4)**, 1279-82.
- Murray, J.F; Downing, J.A; Evans, G; Findlay, J.K. et Scaramuzzi, R.J. (1993).** Epidermal growth factor acts directly on the sheep ovary in vivo to inhibit oestradiol-17 beta and inhibin secretion and enhance progesterone secretion. *J Endocrinol.* **137(2)**, 253-264.
- Muttukrishna, S; George, L; Fowler, P.A; Groome, N.P. et Knight, P.G. (1995).** Measurement of serum concentration of inhibin-A (α - β A dimer) during human pregnancy. *Clin Endocrinol.* **42**, 391-97.
- Muttukrishna, S; Fowler, P.A; Groome, N.P; Mitchel, G.G; Robertson, W.R. et Knight, P.G. (1994).** Serum concentration of dimeric inhibin during the

spontaneous human menstrual cycle and after treatment with exogenous gonadotrophin. *Human Repro.* **9**, 1634-42.

Nakamura, Y; Otsuka, H. et Tamaoki, B. (1966). Requirement of a new flavoprotein and a non-heme iron-containing protein in the steroid 11-beta- and 18-hydroxylase system. *Biochem Biophys Acta.* **122(1)**, 34-42.

Nakamura, T; Asashima, M; Eto, Y; Takio, K; Uchiyama, H; Moriya, N; Noguchi, K; Keeping, H.S; Winters, S.J, Sarto, H. et Troen, P. (1987). Identification of inhibin secreted by cynomolgus monkey sertoli cell cultures. *J Clin Endocrinol Metab.* **64**, 783-88.

Nakamura, T; Takio, K; Eto, Y; Shibai, H; Titani, K. et Sugino, H. (1990). Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science.* **247(4944)**, 836-8.

Nakamura, Y; Hesagawa, Y; Sugino, K; Kogawa, K; Titani, K. et Sugino, H. (1992). Follistatin inhibits activin-induced differentiation of rat follicular granulosa cells in vitro. *Biochem Biophys Acta* **1135 (1)**, 103-09.

Nebert, D.W. et Gonzales, F.J. (1987). P450 gene: structure, evolution and regulation. *Annu Rev Biochem.* **56**, 945-

Nebert, D.W. et McKinnon, R.A. (1994). Cytochrome P450: evolution and functional diversity. *Progress in liver diseases.* **12**, 63-67.

Neufield, G; Ferrara, N; Schweigere, L; Mitchell, R. et Gospodarowics, D. (1987). Bovine granulosa cells produce basic fibroblast growth factor. *Endocrinol.* **121**, 597-03.

Nissely, S.P. et Kiess, W. (1991). Binding of insulin-like growth factor-II and lysosomal enzymes to the IGF-II/mannose phosphate receptor. In modern concepts of insulin-like growth factors pp 419-30 Ed Spencer, E.M. Elsevier Science Publishers. New York.

Noguchi, K; Keeping, H.S; Winters, S.J; Saito, H; Oshima, H. et Troen, P. (1987). Identification of inhibin secreted by cynomolgus monkey Sertoli cell cultures. *J Clin Endocrinol Metab.* **64(4)**, 783-788.

- Oliver, J.E; Aitman, J.R; Powell, J.F; Wilson, C.A. et Clayton, R.N. (1989).** IGF-I gene expression in the rat ovary is confined to granulosa cells of developing follicles. *Endocrinol.* **124**, 2671-79.
- Omura, T. et Morohashi, K. (1995).** Gene regulation of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **53(1-6)**, 19-25.
- Onagbesan, O.M; Woolveridge, I. et Peddie, M.J. (1996).** Characterization of transforming growth factor-alpha receptors in the avian ovary: alterations in ligand binding to granulosa cells during follicular maturation. *J Endocrinol.* **149(1)**, 171-9.
- Oshimi, Y; Oshimi, K. et Miyazaki, S. (1996).** Necrosis and apoptosis associated with distinct Ca²⁺ response patterns in target cells attacked by human natural killer cells. *J Physiol (Lond).* **495 (Pt 2)**, 319-329.
- O'Shaughnessy, P.J. et Wathes, D.C. (1985).** Characteristics of bovine luteal cells in culture: morphology, proliferation and progesterone secretion in different media and effects of LH, dibutyryl cyclic AMP, antioxidants and insulin. *J Endocrinol.* **104(3)**, 355-61.
- Otsuka, M; Kishi, H; Arai, K; Watanabe, G; Taya, K. et Greenwald, G.S. (1997).** Temporal changes in inhibin, steroid hormones, and steroidogenic enzymes during induced follicular atresia in the hypophysectomized cyclic hamster. *Biol Reprod.* **56(2)**, 423-429.
- Payne, A.H. (1990).** Hormonal regulation of cytochrome P450 enzymes, cholesterol side-chain cleavage and 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase in Leydig cells. *Biol Reprod.* **42(3)**, 399-404.
- Pazdrak, K; Justement, L. et Alam, R. (1995).** Mechanism of inhibition of eosinophil activation by transforming growth factor-beta. Inhibition of Lyn, MAP, Jak2 kinases and STAT1 nuclear factor. *J Immunol.* **155(9)**, 4454-4458.
- Pedersen, T. (1970).** Determination of follicle growth rate in the ovary of the immature mouse. *J Reprod Fertil.* **21(1)**, 81-93.
- Peeters, R; Vanmontfort, D; Van Isterdael, J; Verhoeven, G; Rombauts, L. et Decuypere, E. (1997).** Evidence for the presence of immunoreactive inhibin in extragonadal tissues of ovariectomized ewes. *Anim Reprod Sci.* **48(2-4)**, 257-268.
-

- Peluso, J.J.; Luciano, A.M; Pappalardo, A. et White, B.A. (1995).** Cellular and molecular mechanisms that mediate insulin-dependent rat granulosa cell mitosis. *Biol Reprod.* **52(1)**, 124-130.
- Perks, C.M; Denning-Kendall, P.A; Gilmour, R.S. et Wathes, D.C. (1995).** Localization of messenger ribonucleic acids for insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, and the type 1 IGF receptor in the ovine ovary throughout the estrous cycle. *Endocrinol.* **136(12)**, 5266-5273.
- Petraglia, F; Sawchenko, P; Lim, A.T; Rivier, J. et Vale, W. (1987).** Localization, secretion, and action of inhibin in human placenta. *Science.* **237**, 187-189.
- Petraglia, F; Calza, L; Garuti, G.C; Abrate, M; Giardino, L; Genazzani, A.R; Vale, W. et Meunier, H. (1990).** Presence and synthesis of inhibin subunits in human decidua. *J Clin Endocrinol Metab.* **71(2)**, 487-492.
- Picton, H.M; Tsonis, C.G. et McNeilly, A.S. (1990).** FSH causes a time-dependant stimulation of preovulatory follicle growth in the absence of pulsatile LH secretion in ewes chronically treated with gonadotropin-releasing hormone agonist. *J. Endocr.* **126**, 297-448.
- Pierson, R.A. et Ginther, O.J. (1984).** Ultrasonographie of bovine ovary, *Theriogenology.* **21**, 495-504.
- Pierson, R.A. et Ginther, O.J. (1987).** Follicular population during estrous cycle in heifers: I. Influence of the day. *Anim. Repro. Sci.* **124**, 165-76.
- Poncelet, E; Eliard, P; Fauchet, F; Dehart, I; Jaboul, M. et Wansart, V. (1990).** Serum levels of immunoreactive inhibin throughout the human menstrual cycle. In proceeding of Inhibin Symposium Clinical Investigations, Medgenix Diagnostics.
- Prevarskaya, N.B; Skryma, R.N; Vacher, P; Daniel, N; Djiane, J. et Dufy, B. (1995).** Role of tyrosine phosphorylation in potassium channel activation. Functional association with prolactin receptor and JAK2 tyrosine kinase. *J Biol Chem.* **270(41)**, 24292-9.

- Price, C.A. (1991).** The control of FSH secretion in the larger domestic species. *J. Endocrinol.* **131**, 177-184.
- Price, C.A. et Webb, R. (1988).** Steroid control of gonadotropin secretion and ovarian function in heifers. *Endocrinol.* **122**, 2222-31.
- Price, C.A; Salah, N. et Groome, N.P. (1995).** Plasma concentrations of dimeric inhibin and oestradiol in heifers undergoing superovulation with eCG or FSH. *J Reprod Fertil Suppl.* **49**, 507-10.
- Price, C.A; Carriere, P.D; Bhatia, B.et Groome, N.P. (1995).** Comparison of hormonal and histological changes during follicular growth, as measured by ultrasonography, in cattle. *J Reprod Fertil.* **103(1)**, 63-68.
- Prigent, S.A. et Lemoine, N.R. (1992).** The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Prog Growth Factor Res.* **4(1)**, 1-24.
- Quirk, S.M. et Fortune, J.E. (1986).** Plasma concentrations of gonadotrophins, preovulatory follicular development and luteal function associated with bovine follicular fluid-induced delay of oestrus in heifers. *J Reprod Fertil.* **76(2)** 609-621.
- Rabinovici, J; Spencer, S.J. et Jaffe R.B. (1990).** Recombinant human activin-A promotes proliferation of human luteinized preovulatory granulosa cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* **71(5)**, 1396-98.
- Rabinovici, J; Spencer, S; Doldi, N. et Jaffe, R. (1991).** Localization and actions of activins in the human ovary and adrenal gland. In: Burger, H; Findlay, J; Robertson, D.M, de Krester, D.M. et Petraglia, F. Eds. *Frontiers in Endocrinology: volume 3, Inhibin and Inhibin-Related Proteins.* Rome: Ares-Sereno Symposia. 191-98.
- Rabinovici, J; Goldsmith, P.C; Roberts, V.J; Vaughan, J; Vale, W. et Jaffe, R.B. (1991).** Localization and secretion of inhibin/activin subunits in the human and subhuman primate fetal gonads. *J Clin Endocrinol Metab.* **73(5)**, 1141-49.
- Rajakoski, E. (1960).** The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal cyclical, and left-right variation. *Acta Endocrin. (Suppl, 68).* **52**, 1-68.

- Readhead, C; Lobo, R.A.E. et Kletzky, O.A. (1983).** The activity of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and delta 4-5 isomerase in human follicular tissue. *Am J Obstet Gynecol.* **145(4)**, 491-5.
- Rechler, M.M. (1993).** Insulin-like growth factor binding proteins. *Vitam & Horm.* **47**, 1-114.
- Reddi, K; Wickings, E.J; McNeilly, A.S; Baird, D.T. et Hillier, S.G. (1990).** Circulating bioactive follicle stimulating hormone and immunoreactive inhibin levels during the normal human menstrual cycle. *Clin Endocrinol (Oxf).* **33(4)**, 547-557.
- Redmer, D.A. et Reynolds, L.P. (1996).** Angiogenesis in the ovary. *Rev Repro.* **1**, 1-24.
- Richard, F.J. et Sirard, M.A. (1996a).** Effects of follicular cells on oocyte maturation. I: Effects of follicular hemisections on bovine oocyte maturation in vitro. *Biol Repro.* **54(1)**, 16-21.
- Richard, F.J. et Sirard, M.A. (1996b).** Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. *Biol Reprod.* **54(1)**, 22-8.
- Richards, J.S. (1980).** Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev.* **60(1)**, 51-89.
- Risbridger, G.P; Robertson, D.M.et de Kretser, D.M. (1990).** Current perspectives of inhibin biology. *Acta Endocrinol (Copenh).* **122(6)**, 673-682.
- Rivier, C; Rivier, J. et Vale, W. (1986).** Inhibin-mediated feedback control of follicle stimulating hormone secretion in female rats. *Science.* **234(4738)**, 205-8.
- Rivier, C; Schwall, R; Mason, A; Burton, L. et Vale, W. (1991).** Effect of recombinant inhibin on gonadotropin secretion during proestrus and estrus in the rat. *Endocrinol.* **128(5)**, 2223-28.

- Rivier, J; Spiess, J; McClintock, R; Vaughan, J. et Vale, W. (1985).** Purification and partial characterisation of inhibin from porcine follicular fluid. *Biochem Biophys Res Com.* **133**, 120-27.
- Robel, P. (1991).** La stéroïdogénèse: les enzymes et la régulation de leur expression génomique. Dans *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Edition Ellips, France, pp:127-34.
- Roberts, A.J. et Skinner, M.K. (1990a).** Hormonal regulation of thecal cell function during antral follicle development in bovine ovaries. *Endocrinol.* **127(6)**, 2907-17.
- Roberts, A.J. et Skinner, M.K. (1990b).** Estrogen regulation of thecal cell steroidogenesis and differentiation: thecal cell-granulosa cell interactions. *Endocrinol.* **127(6)**, 2918-29.
- Roberts, A.J. et Skinner, M.K. (1991).** Transforming growth factor-alpha and -beta differentially regulate growth and steroidogenesis of bovine thecal cells during antral follicle development. *Endocrinol.* **129(4)**, 2041-8.
- Roberts, A.B et Sporn, M.B. (1991).** The transforming growth factor- β . In: *Peptide Growth Factor and their Receptors*. part 1 (ed) Sporn, M.B; Roberts, A.B pp 419-73. Springer-Verlag. New York.
- Roberts, V.J; Barth, S; el-Roeiy, A. et Yen, S.S. (1993).** Expression of inhibin/activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* **77(5)**, 1402-1410.
- Roberts, V; Meunier, H; Sawchenko, P.E. et Vale, W. (1989).** Differential production and regulation of inhibin subunits in rat testicular cell types. *Endocrinol.* **125(5)**, 2350-59.
- Roberts, V; Meunier, H; Vaughan, J; Rivier, J; Vale, W. et Sawchenko, P. (1989).** Production and regulation of inhibin subunits in pituitary gonadotrops. *Endocrinol.* **124**, 552-4.

Robertson, D.M; Giacometti, M.S. et de Kretser, D.M. (1986). The effects of inhibin purified from bovine follicular fluid in several in vitro pituitary cell culture systems. *Mol Cell Endocrinol.* **46(1)**, 29-36.

Robertson, D.M; Foulds, L.M; Leversha, L; Morgan, F.J; Hearn, M.T; Burger, H.G; Wettenhall, R.E. et de Kretser, D.M. (1985). Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. *Biochem Biophys Res Commun.* **126(1)**, 220-226.

Robertson, D.M; de Vos, F.L; Foulds, L.M; McLachlan, R.I; Burger, H.G; Morgan, F.J; Hearn, M.T. et de Kretser, D.M. (1986). Isolation of a 31 kDa form of inhibin from bovine follicular fluid. *Mol Cell Endocrinol.* **44(3)**, 271-277.

Robertson, D.M; Klein, R; de Vos, F.L; McLachlan, R.I; Wettenhall, R.E; Hearn, M.T; Burger, H.G. et de Kretser, D.M. (1987). The isolation of polypeptides with FSH suppressing activity from bovine follicular fluid which are structurally different to inhibin. *Biochem Biophys Res Commun.* **149(2)**, 744-9.

Robertson, D.M; Hayward, S; Irby, D; Jacobsen, J; Clarke, L; McLachlan, R.I; et de Kretser, D.M. (1988). Radioimmunoassay of rat serum inhibin: changes after PMSG stimulation and gonadectomy. *Mol Cell Endocrinol.* **58(1)**, 1-8.

Robertson, D.M; Giacometti, M; Foulds, L.M; Lahenstein, A.J; Goss, N.H; Hearn, M.T.W. et de Kretser, D.M. (1989). Isolation of inhibin α -subunit precursor proteins from bovine follicular fluid. *Endocrinol.* **125**, 2141-49.

Robertson, D.M; Foulds, L.M; de Vos, F; Leversha, L. et de Kretser, D.M. (1990). Identification of inhibin and inhibin-related proteins in human follicular fluid. *Reprod Fertil Dev.* **2(4)**, 327-35.

Rodgers, R.J. (1990). Steroidogenic cytochrome P450 enzymes and ovarian steroidogenesis. *Reprod Fertil Dev.* **2**, 153-63.

Roth, R.A. et Kiess, W. (1994). Insulin-like growth factor receptors: recent developments and new methodologies. *Growth Regul.* **4 (Suppl 1)**, 31-8.

- Rouillier, P; Matton, P; Dufour, M; Sirard, M.A. et Guilbault, L.A. (1996).** Follicle-stimulating hormone-induced estradiol and progesterone production by bovine antral and mural granulosa cells cultured in vitro in a completely defined medium. *J Anim Sci.* **74**, 3012-19.
- Roy, S.K; Ogren, C; Roy, C. et Lu, B. (1992).** Cell specific localization of transforming growth factor β_2 and transforming growth factor β_1 in the hamster ovary: differential regulation by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Bio Reprod.* **46**, 595-06.
- Russe, I. (1983).** Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl Anat.* **24**, 77-92.
- Samaras, S.E; Hagen, D.R; Bryan, K.A; Mondschein, J.S; Canning, S.F. et Hammond, J.M. (1994).** Effects of growth hormone and gonadotropin on the insulin-like growth factor system in the porcine ovary. *Biol Reprod.* **50(1)**, 178-86.
- Sander, H.J; van Leeuwen, E.C. et de Jong, F.H. (1984).** Inhibin-like activity in media from cultured rat granulosa cells collected throughout the oestrous cycle. *J Endocrinol.* **103(1)**, 77-84.
- Sato, Y; Tsuboi, R; Lyons, R; Moses, H. et Rifkin, D.B. (1990).** Characterisation of the activation and latent TGF- β by co-culture of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells: a self-regulation system. *J Cell Biol.* **111**, 757-63.
- Saumande, J. (1991).** Culture of bovine granulosa cells in a chemically defined serum-free medium: the effect of insulin and fibronectin on the response to FSH. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **38(2)**, 189-96.
- Savio, J.D; Keenan, M; Boland, P. et Roche, J.F. (1988).** Pattern of growth of dominant follicles during the estrous cycle of heifers. *J Repro Fertil.* **83**, 633-671.
- Savio, J.D; Boland, M.P; Hynes, N; Mattiacci, M.R. et Roche, J.F. (1990).** Will the first dominant follicle of the oestrous cycle of heifers ovulate following luteolysis on d 7? *Theriogenology.* **33**, 677-

Savio, J.D; Thatcher, W.W; Badinga, L; de la Sota, R.L. et Wolfenson D. (1993). Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *J Reprod Fertil.* **97(1)**, 197-203.

Savio, J.D; Thatcher, W.W; Badinga, L; de la Sota, R.L. et Wolfenson, D. (1995). Regulation of dominant follicle turnover during the oestrus cycle in cows. *J Repro & Fertil.* **97**, 197-203.

Sawchenko, P.E; Plotsky, P.M; Pfeiffer, S.W; Cunningham E.T.Jr; Vaughan, J; Rivier, J. et Vale, W. (1988). Inhibin beta in central neural pathways involved in the control of oxytocin secretion. *Nature.* **334(6183)**, 615-617.

Schanbacher, B. (1988). Radioimmunoassay of inhibin. Serum responses to unilateral and bilateral orchidectomy. *Endocrinol.* **123**, 2323-30.

Schmitt, J; Hotten, G; Jenkins, N.A; Gilbert, D.J; Copeland, N.G; Pohl, J. et Schrewe, H. (1996). Structure, chromosomal localization, and expression analysis of the mouse inhibin/activin beta C (Inhbc) gene. *Genomics.* **32(3)**, 358-66.

Schneyer, A.L; Mason, A.J; Burton, L.E; Ziegner, J.R; Crowley W.F.Jr (1990). Immunoreactive inhibin alpha-subunit in human serum: implications for radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab.* **70(4)**, 1208-1212.

Schneyer, A.L; Sluss, P.M; Whitcomb, R.W.; Martin, K.A; Sprengel, R. et Crowley, W.F. (1991). Precursors of α -inhibin modulate follicle-stimulating hormone receptor binding and biological activity. *Endocrinol.* **129**. 1987-99.

Schuller A.G; Lindenbergh-Kortleve D.J; Pache T.D; Zwarthoff E.C; Fauser B.C. et Drop S.L. (1993). Insulin-like growth factor binding protein-2, 28 kDa and 24 kDa insulin-like growth factor binding protein levels are decreased in fluid of dominant follicles, obtained from normal and polycystic ovaries. *Regul Pept.* **48(1-2)**, 157-63.

Schwall, R.H; Mason, A.J; Wilcox, J.N; Bassett, S.G. et Zeleznik, A.J. (1990). Localization of inhibin/activin subunit mRNAs within the primate ovary. *Mol Endocrinol.* **4(1)**, 75-79

- Schwartzman, R.A. et Cidlowski, J.A. (1993).** Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev.* **14(2)**, 133-51.
- Scott, R.S. et Burger, H.G. (1981).** Mechanism of action of inhibin. *Biol Repro.* **24**, 541-50.
- Scott, R.S; Burger, H.G. et Quigg, H. (1980).** A simple and rapid in vitro bioassay for inhibin. *Endocrinol.* **107**, 1536-42.
- Setchell, B.P. et Jacks, F. (1974).** Inhibin like activity in rete testis fluid. *J Endocrinol.* **62**, 675-76.
- Sharpe, R.M; Swanston, I.A; Cooper, I; Tsonis, C.G. et McNeilly, A.S. (1988).** Factors affecting the secretion of immunoactive inhibin into testicular interstitial fluid in rats. *J Endocrinol.* **119(2)**, 315-326.
- Shaw, H.J; Boddy, S.E. et Hodges, J.K. (1993).** Developmental changes in marmoset granulosa cell responsiveness to insulin-like growth factor-I: interactions with follicle-stimulating hormone and estradiol. *Biol Reprod.* **49(3)**, 568-76.
- Shimasaki, S; Koga, M; Esch, F; Mercado, M; Cooksey, K; Koba, A. et Ling, N. (1988).** Porcine follistatin gene structure supports two forms of mature follistatin produced by alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun.* **152**, 717-723.
- Shimasaki, S; Koga, M; Esch, F; Mercado, M; Cooksey, K; Koba, A; Ueno, N; Ling, N. et Guillemin, R. (1988).** Primary structure of the human follistatin precursor and its genomic organization. *PNAS USA.* **85**, 4218-22.
- Shimasaki, S; Koga, M; Buscaglia, M.L; Simmons, D.L; Bicsak, T. et Ling, N. (1989).** Follistatin gene expression in the ovary and extragonadal tissues. *Mol Cell Endocrinol.* **3**, 651-59.
- Shiozaki, M; Saki, R; Tabuchi, M; Nakamura, T; Sugino, K; Sugino, H; et Eto, Y. (1992).** The existence of activin A/erythroid differentiation factor and its inhibitor in human serum: comparison of normal and chronic renal failure sera. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **89**, 1553-56.

- Singh, J; Pierson, R.A. et Adams, G.P. (1998).** Ultrasound image attributes of bovine ovarian follicles and endocrine and functional correlates. *J Reprod Fertil.* **112(1)**, 19-29.
- Sinosich, M.J; Sieg, S; Zakher, A; Ling, N; Saunders, D.M; Rosenwaks, Z. et Hodgen, G.D. (1991).** Radioimmunoassay of inhibin based on synthetic human inhibin α chain peptide. *Clin Chem.* **37/1**, 40-6.
- Sirard, M.A; Bilodeau, S; Fortier, M.A. et Bélanger, A. (1991).** Bovine granulosa cells steroidogenesis in vitro, I: response to androgens and estrogens. In: Gibori, G (ed), *Signaling Mechanisms and Gene Expression in the ovary*. New York. Spring-Verlag. 428-32.
- Sirois, J. et Fortune, J.E. (1988).** Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod.***39(2)**,308-317.
- Spears, N; de Bruin, J.P. et Gosden, R.G. (1996).** The establishment of follicular dominance in co-cultured mouse ovarian follicles. *J. Reprod. fert.* **106**, 1-6.
- Spicer, L.J. et Echternkamp, S.E. (1986).** Ovarian follicular growth, function and turnover in cattle. *J Anim Sci.* **62(1)**, 482-451.
- Spicer, L.J. et Enright, W.J. (1991).** Concentrations of insulin-like growth factor I and steroids in follicular fluid of preovulatory bovine ovarian follicles: effect of daily injections of a growth hormone-releasing factor analog and(or) thyrotropin-releasing hormone. *J Anim Sci.* **69(3)**, 1133-9.
- Spicer, L.J. et Echanternkamp, S.E. (1995).** The ovarian insulin and insulin like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest Anim Endocrino.* **12**, 223-245.
- Spicer, L.J. et Stewart, R.E. (1996).** Interaction among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: role of IGF-I receptors. *Biol Reprod.* **54**, 255-263.
- Spicer, L.J; Alpizar, E. et Echternkamp, S.E. (1993).** Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation,

progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. *J Anim Sci.* **71(5)**, 1232-41.

Spicer, L.J; Echterkamp, S.E; Canning, S.F. et Hammond, J.M. (1988). Relationship between concentrations of immunoreactive insulin-like growth factor-I in follicular fluid and various biochemical markers of differentiation in bovine antral follicles. *Biol Reprod.* **39(3)**, 573-80.

Spicer, L.J; Klindt, J; Buonomo, F.C; Maurer, R; Yen, J.T. et Echterkamp, S.E. (1992). Effect of porcine somatotropin on number of granulosa cell luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors, oocyte viability, and concentrations of steroids and insulin-like growth factors I and II in follicular fluid of lean and obese gilts. *J Anim Sci.* **70(10)**, 3149-57.

Spicer, L.J; Echterkamp, S.E; Wong, E.A; Hamilton, D.T. et Vernon, R. K. (1995). Serum hormones, follicular fluid steroids, insulin-like growth factors and their binding proteins, and ovarian IGF mRNA in sheep with different ovulation rates. *J Anim Sci.* **73(4)**, 1152-63.

Sporn, M.B; Roberts, A.B; Wakefield, L.M. et Assoian, R.K. (1986). Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. *Science.* **233(4763)**, 532-4.

Steinberger, A. et Steinberger, E. (1976). Secretion of an FSH-inhibiting factor by cultured sertoli cell. *Endocrinol.* **99**, 918-21.

Stewart, A.G; Milborrow, H.M; Ring, J.M; Crowther, C.E. et Forage, R.G. (1986). Humain inhibin genes: genomic characterisation and sequence. *FEBS Lett.* **206**, 329-33.

Stewart, R.E; Spicer, L.J; Hamilton, T.D; Keefer, B.E; Dawson, L.J; Morgan, G.L. et Echterkamp, S.E. (1996). Levels of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins, luteinizing hormone and IGF-I receptors, and steroids in dominant follicles during the first follicular wave in cattle exhibiting regular estrous cycles. *Endocrinol.* **137(7)**, 2842-50.

Stocco, D.M. et Clark, B.J. (1996). Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev.* **3(17)**, 221-44.

- Stock, A.E et Fortune, J.E. (1993).** Ovarien follicular dominance in cattle: Relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinol.* **132**, 1108-14.
- Stone, D. et Hechter, O. (1954).** Studies of ACTH action in perfused bovine adrenals : site of action of ACTH in corticosteroidogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **51**, 457-69.
- Strauss III, J.F; Schuler, L.A; Rosenblum, M.F. et Tanka, T. (1981).** Cholesterol metabolism by ovarian tissue. *Adv Lipid Res.* **18**, 99-157.
- Sugino, H; Sugino, K et Nakamura, T. (1994).** The activin binding protein. In: Burger, H Findlay, J; Robertson, D; de Krester, D.M; Petraglia, F. Eds, *Frontiers in Endocrinology: Volume 3, Inhibin and inhibin related proteins.* 69-80.
- Sugino, H; Nakamura, T; Hasegawa, Y; Miyamoto, K. et Abe, Y. (1988).** Erythroid differentiation factor can modulate follicular granulosa cell functions. *Biochem Biophys Res Commun.* **153**, 281-88.
- Sugino, K; Nakamura T; Takio, K; Titani, K; Miyamoto, K; Hasegawa, Y; Igarashi, M et Sugino, H. (1989).** Inhibin alpha-subunit monomer is present in bovine follicular fluid. *Biochem Biophys Res Commun.* **159(3)**, 1323-9.
- Sunderland S.J; Knight P.G; Boland M.P; Roche J.F. et Ireland J.J. (1996).** Alterations in intrafollicular levels of different molecular mass forms of inhibin during development of follicular- and luteal-phase dominant follicles in heifers. *Biol Reprod.* **54(2)**, 453-62.
- Szöllösi, D. (1991).** Maturation de l'ovocyte, In: Thibault, C; Levasseur, M.C. (eds). *La reproduction chez les mammifères et l'homme.* Paris, France: Edition Marketing; 299-314.
- Takumi, T; Moustakas, A; Lin, H.Y. et Lodish, H.F. (1995).** Molecular characterisation of type I serine-threonine kinase receptor for TGF- β and activin in the rat pituitary tumor cell line GH3. *Exp Cel Res.* **216**, 208-214.
- Tapanainen, J.S; Tilly, J.L; Vihko, K.K. et Hsueh, A.J. (1993).** Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol.* **7(5)**, 643-50.

- Taya, K; Kaneko, H; Watanabe, G. et Sasamoto, S. (1991).** Inhibin and secretion of FSH in oestrus cycles of cows and pigs. *J Repro Fertil (suppl)*. **43**, 151-162.
- Taylor, C. et Rajamahendran, R. (1991).** Follicular dynamics, corpus luteum growth and regression in lactating dairy cattle. *Can J Animal Sci*. **71**, 61-
- The, V.L; Lachance, Y; Labrie, C; Leblanc, G; Thomas, J.L; Strickler, R.C. E. et Labrie, F. (1989).** Full length cDNA structure and deduced amino acid sequence of human 3 beta-hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase. *Mol Endocrinol*. **3(8)**, 1310-2.
- Thibault, C. et Levasseur, M.C. (1979).** La fonction ovarienne chez les mammifères. *Actualités scientifiques et agronomiques*. 7-101.
- Thompson, E.A; Jr. et Siiteri, P.K. (1974).** Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. *J Biol Chem*. **249(17)**, 5364-72.
- Thorton, S.C; Mueller, S.N. et Levine, E.M. (1983).** Human endothelial cells. Use of purified heparin in cloning and long-term serial cultivation. *Science*. **222**, 623-25.
- Tierney, M.L; Goss, N.H; Tomkins, S.M; Kerr, D.B; Pitt, D.E; Forage, R.G; Robertson, D.M; Hearn, M.T. et de Kretser, D.M. (1990).** Physicochemical and biological characterization of recombinant human inhibin A. *Endocrinol*. **126(6)**, 3268-3270.
- Tilbrook, A; de Krestler, D. et Clarke, I. (1993).** Human recombinant inhibin A and testosterone act directly at the pituitary to suppress plasma concentration of FSH in castrated rams. *J Endocrinol*. **138**, 181-89.
- Tilly, J.L. (1994).** Use of terminal transferase DNA labeling reaction for the biochemical and *in situ* analysis of apoptosis. In *Cell Biology. A Laboratory Handbook* pp 330-37. Ed. Celis, J.D. Academic Press, San Diego.
- Tilly, J.L. (1996).** Apoptosis and ovarian function. *Rev Repro*. **1**, 162-72.

- Tilly, J.L; Billig, H; Kowalski, K.I. et Hsueh, A.J.W. (1992a).** Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultures rat ovarian granulosa cells and follicles by tyrosine kinase-dependant mechanism. *Mol Endo.* **6**, 1942-50.
- Tilly, J.L; Kowalski, K.I; Schomberg, D.W. et Hsueh, A.J.W. (1992b).** Apoptosis in atretic ovarien follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts from gonadotropin receptors and cytochrme P450 aromatase. *Endocrinol.* **131**, 1670-76.
- Tisdall, D.J; Hill, D; Peterson, G.B. et Fleming, J.S. (1992).** Ovine follistatatin†: Characterization of cDNA and expression in sheep ovary during the luteal phase of the oestrous cycle. *J Mol Endocrinol.* **8**, 259-64.
- Toebosch, A.M; Robertson, D.M; Trapman, J; Klaassen, P; de Paus, R.A; de Jong, F.H. et Grootegoed, J.A. (1988).** Effects of FSH and IGF-I on immature rat Sertoli cells: inhibin alpha- and beta-subunit mRNA levels and inhibin secretion. *Mol Cell Endocrinol.* **55(1)**, 101-105.
- Toreny, A.H; Robertson, D.M. et de Krester, D.M. (1992).** Characterisation of inhibin and related proteins in bovine fetal testicular and ovarien extracts: evidence for the presence of inhibin subunit products and FSH-suppressing protein. *J Endocrinol.* **133**. 111-20.
- Torney, A.H; Hodgson, Y.M; Forage, R. et de Krester, D.M. (1992).** Cellular localisation of inhibin mRNA in the bivun ovary by *in situ* hybridization. *J Repro & Fertil.* **86**, 391-99.
- Torney, A.H; Hodgson, Y.M, Forage, R. et de Krester, D.M. (1989).** Cellular localisation of inhibin mRNA in the bovine ovary by *in situ* hybridization. *J Repro Fert.* **86**, 391-399.
- Trump, B.F; Berezsky, I.K. et Cowley, R.A. (1982).** The cellulair and the subcellulair characteristic of acute and chronic injury with emphasis on the role of calcium. In: Cowley, R.A; Trump, B.F. (eds) *Ptho-Physiol of Shock, Annoxia, and Ischemia.* Williams &Wilkins, Baltimore, M.D, pp 6-46.

- Trump, B.F; Berezeskey, I.K; Sato, T; Laiho, K.U; Phelps, P.C, De Claris, N. (1984).** Cell calcium, cell injury and cell death. *Environ Health Perspect.* **57**, 281-87.
- Tsafiriri, A; Vale, W. et Hsueh, A.J.W. (1988).** Effect of the transforming growth factors and inhibin-related proteins on rat preovulatory graafian follicles in vitro. *Endocrinol.* **125**, 1857-62.
- Tsonis, C.G; McNeilly, A.S. et Braid, D.T. (1986).** Measurement of exogenous and endogenous inhibin in sheep serum using a new and extremely sensitive bioassay for inhibin based on inhibition of ovine pituitary FSH secretion in vitro. *J Endocrinol* **110**, 341-52.
- Tsonis, C.G; Hillier, S.G. et Baird, D.T. (1987).** Production of inhibin bioactivity by human granulosa-lutein cells: stimulation by LH and testosterone in vitro. *J Endocrinol.* **112(3)**, R11-4.
- Turner, I.M; Sanders, P.T.K; Shimasaki, S. et Hillier, S.G. (1989).** Regulation of subunit gene expression by FSH and estradiol in cultured rat granulosa cells. *Endocrinol.* **125(5)**, 2790-92.
- Ueno, N; Ling, N; Ying, S.Y, Esch, F; Shimasaki, S. et Guillemin, R. (1987).** Isolation and partial characterization of follistatin: A single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. *PNAS USA.* **84**, 8282-86.
- Vale, W; Hsueh, A; Rivier, C. et Yu, J. (1990).** The inhibin/activin family of hormones and growth factors. In *Handbook of Experimental Pharmacology.* ed Sporn, M.B; Roberts, A.B. **95**, 211-48.
- Vale, W; Rivier, J; Vaughan, J; McClintock, R; Corrigan, A; Woo, W; Karr, D. et Spiess, J. (1986).** Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature.* **321(6072)**, 776-9.
- van Dijk, S; Steenbergen, C; de Jong, F.H. et van der Molen, H.J. (1985).** Comparison between inhibin from human and bovine ovarian follicular fluid using fast protein liquid chromatography. *Mol Cell Endocrinol.* **42(3)**, 245-251.

- Vassalli, A; Matzuk, M.M; Gardner, H.A.R; Lee, K.F. et Jaenisch, R. (1994).** Activin/inhibinBB subunit gene disruption leads to defects in eyelid development and female reproduction. *Genes Dev.* **8**, 414-27.
- Veldhuis, J.D. et Hammond, J.M. (1980).** Oestrogens regulate divergent effects of prolactin in the ovary. *Nature.* **284**, 262-64.
- Voutilainen, R. et Miller, W.L. (1987).** Coordinate tropic hormone regulation of mRNAs for insulin-like growth factor II and the cholesterol side-chain-cleavage enzyme, P450scc [corrected], in human steroidogenic tissues [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 Sep; 84(17),6194]. *Proc Natl Acad Sci USA.* **84(6)**, 1590-4.
- Walker, P.R. et Sikorska, M. (1994).** Endonuclease activities, chromatin structure, and DNA degradation in apoptosis. *Biochem & Cell Biol.* **72**, 615-23.
- Walker, N.I; Harmon, B.V; Gobé, G.C. et Kerr, J.F.R. (1988).** Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol.* **131**, 18-54.
- Walters, D.L. et Schallenberg, E. (1984).** Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the periovulatory phase of the oestrous cycle in the cow. *J Reprod Fertil.* **89**, 643-53.
- Waring, P; Kos F.J et Mullbacher, A. (1991).** Apoptosis or programmed cell death. *Med Res Rev.* **11(2)**, 219-36.
- Webley, G.E; Marsden, P.L. et Knight, P.G. (1994).** Differential control of immunoreactive α inhibin and progesterone production by marmoset luteal cell *in vitro* : Evidence for a paracrine action of α inhibin on basal and gonadotropin-stimulated progesterone production. *Biol Repro.* **50**, 1394-02.
- Webley, G.E; Knight, P.G; Given, A. et Hodges, J.K. (1991).** Increased concentration of immunoreactive inhibin during concentration cycles in the marmoset monkey: Suppression with an LHRH antagonist and cloprostenol. *J Endocrinol.* **128**, 465-73.
- Webley, G.E; Muttukrishna, S; Groome, N. et Knight, P. (1994).** Evidence that endogenous dimeric inhibin enhances progesterone production by human granulosa-lutein cells. *J Repro Fertil Abst Ser* **13**. (Abstract 85).

- Weiss, J; Guendner, M.J; Halvorson, L.M. et Jameson, J.L. (1995).** Transcriptional activation of the follicle-stimulating hormone beta- subunit gene by activin. *Endocrinol.* **136(5)**, 1885-91.
- Willis, D; Mason, H; Gilling-Smith, C. et Franks, S. (1996).** Modulation by insulin of follicles-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol.* **81**, 301-9.
- Wise, T. (1987).** Biochemical analysis of bovine follicular fluid: albumin, total protein, lysosomal enzymes, ions, steroids and ascorbic acid content in relation to follicular size, rank, atresia classification and day of estrous cycle. *J Anim Sci.* **64(4)**, 1153-1169.
- Wise, T. et Maurer, R.R. (1994a).** Follicular development, oocyte viability and recovery in relation to follicular steroids, prolactin and glycosaminoglycans throughout the estrous period in superovulated heifers with a normal LH surge, no detectable LH surge, and progestin inhibition of LH surge. *Domest Anim Endocrinol.* **11(1)**, 35-58.
- Wise, T; Suss, U; Stranzinger, G; Wuthrich, K. et Maurer, R.R. (1994b).** Cumulus and oocyte maturation and in vitro and in vivo fertilization of oocytes in relation to follicular steroids, prolactin, and glycosaminoglycans throughout the estrous period in superovulated heifers with a normal LH surge, no detectable LH surge, and progestin inhibition of LH surge. *Domest Anim Endocrinol.* **11(1)**, 59-86.
- Wong, S.T; Winchell, L.F; McCune, B.K; Earp, H.S; Teixido, J; Massagué, J; Herman, B. et Lee.D.C. (1989).** The TGF- α precursor expressed on the cell surface binds to the EGF receptor on adjacent cells leading to signal transduction. *Cell.* **56**, 841-48.
- Woodruff, T.K; Meunier, H; Jones, P.B; Hsueh, A.J. et Mayo, K.E. (1987).** Rat inhibin: molecular cloning of alpha- and beta-subunit complementary deoxyribonucleic acids and expression in the ovary. *Mol Endocrinol.* **1(8)**, 561-568.
- Woodruff, T.K; Lyons, R.J; Hansen, S.E; Rice, G.C. Mather, J.P. (1990).** Inhibin and activin regulate rat ovarien folliculogenesis. *Endocrinol.* **127**, 3196-205.

Wordinger, R.J; Brun-Zinkernagel, A.M. et Chang, I.F.G. (1993). Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor (bFGF) within growing and atretic mouse follicles. *Grow Fact.* **9**, 279-89.

Wrathall, J.H. et Knight, P.G. (1993). Production of immunoactive inhibin by bovine granulosa cells in serum-free culture: Effects of exogenous steroids and FSH. *Domestic Animal Endocrinol.* **10(4)**, 289-304.

Wrathall, J.H. et Knight, P.G. (1995). Effects of inhibin-related peptides and oestradiol on androstenedione and progesterone secretion by bovine theca cells in vitro. *J Endocrinol.* **145(3)**, 491-500.

Wrathall, J.H; McLeod, B.J; Glencross, R.G. et Knight, P.G. (1992). Effects of active inhibin immunisation against a synthetic peptide sequence of the inhibin α -subunit on plasma gonadotrophin concentrations, ovulation rate and lambing rate in ewes. *J Repro & Fertil.* **95**, 175-82.

Wrathall, J.H; McLeod, B.J; Glencross, R.G; Beard, A.J. et Knight, P.G. (1990). Inhibin immunoneutralization by antibodies raised against synthetic peptide sequences of inhibin alpha subunit: effects on gonadotrophin concentrations and ovulation rate in sheep. *J Endocrinol.* **124(1)**, 167-176.

Wyllie, A.H. (1981). Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. In: Bowen, I.D; Lockshin, R.A.(eds) *Cell Death in Biology & pathology.* Chapman & Hall, London pp 9-34.

Wyllie, A.H; Kerr, J.F.R. et Currie, A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* **68**, 251-306.

Xiao, S. et Findlay, J. (1991). Interactions between activin and FSH suppressing protein and their mechanisms of action on cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol.* **79**, 99-107.

Xiao, S; Findlay; J. et Robertson, D.M. (1990). The effect of bovin activin and follicle-stimulating hormone (FSH) suppressing protein/follistatin on FSH-induced differentiation of rat granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* **69**, 1-8.

- Xiao, S; Robertson, D.M. et Findlay, J.K. (1992).** Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinol.* **131(3)**, 1009-1016.
- Yamamoto, K.R. (1985).** Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks, *Annul Rev Genet.* **19**, 209-
- Yamoto, M; Minami, S. et Nakano, R. (1991).** Immunohistochemical localization of inhibin subunits in human corpora lutea during menstrual cycle and pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* **73(3)**, 470-7.
- Yamoto, M; Shikone, T. et Nakano, R. (1993).** Opposite effects of basic fibroblast growth factor on gonadotropins-stimulated steroidogenesis in rat granulosa cells. *Endocrinol Jour.* **40**, 691-97.
- Yayon, A; Klagsbrun, M; Esko, J.D; Leder, P. et Ornitz, D.M. (1991).** Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell.* **64(4)**, 841-8.
- Ying, S.Y. (1987).** Inhibins and activins: chemical properties and biological activity. *Proc Natn Acad Sci. USA.* **186**, 253-65.
- Ying, S.Y. (1988).** Inhibines, activines and follistatin: Gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocrinol Rev.* **9**, 267-293.
- Youngblood, G.L; Sartorius, C; Taylor, B.A. et Payne, A.H. (1991).** Isolation, characterization, and chromosomal mapping of mouse P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase. *Genomics.* **10(1)**, 270-5.
- Zelzenik, A.J; et Hillier, S.G. (1984).** The role of gonadotropin in the selection of the preovulatory follicle. *Clin. Obstetrics and gynecology.* **27**, 927-40.
- Zhang, Z; Lee, V.W; Carson, R.S. et Burger, H.G. (1987a).** Selective control of rat granulosa cell inhibin production by FSH and LH in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* **56(1-2)**, 35-40.
- Zhang, Carson R.S, Herrington A.C, Lee, V.W.K et Burger, H.G. (1987b).** Follicle stimulating hormone and somatomedin C stimulate inhibin production by rat granulosa cells in vitro. *Endocrinol.* **120(4)**, 1633-38.

Zhiwen, Z; Herington, A; Carson, R, Findlay, J. et Burger, H. (1987). Direct inhibition of rat granulosa cell inhibin production by epidermal growth factor. *Mol Cell Endocrinol.* **54**, 213-20.

Zhou, J. et Bondy, C.A. (1993). Anatomy of the human ovarian IGF system. *Bio Repro.* **48**, 356-61.

Zhou, J; Adesanya, O.O; Hammond, J.M. et Bondy, C.A. (1996). Selective expression of insulin-like growth factor system components during porcine ovary follicular selection. *Endocrinol.* **137**, 4893-4901.

Zuber, M.X; John, M.E; Okamura, T; Simpson, E.R.E. et Waterman, M.R. (1986). Bovine adrenocortical cytochrome P-450(17 alpha). Regulation of gene expression by ACTH and elucidation of primary sequence. *J Biol Chem.* **261(5)**, 2475-82.