

L'atrésie folliculaire, un gaspillage programmé

Danielle Monniaux
Béatrice Mandon-Pépin
Philippe Monget

Une gigantesque perte de cellules germinales se produit dans les ovaires des mammifères, tout au long de leur vie, par atrésie folliculaire, c'est-à-dire dégénérescence du follicule empêchant l'expulsion de l'ovule. Quarante-vingt-dix-neuf pour cent des follicules qui entrent en croissance dégèrent. L'étape déterminant la survie est l'expression de récepteurs de la LH par les cellules de la granulosa. Des facteurs de croissance tels que IGF-I amplifient l'action des gonadotrophines. Si l'environnement endocrine ou paracrine est insuffisant, l'apoptose se déclenche dans les cellules de la granulosa : activation de Fas et du récepteur du $TNF\alpha$, déséquilibre en faveur des facteurs pro-apoptotiques (Bax) au détriment des facteurs anti-apoptotiques (Bcl-2), activation de p53 et des caspases. Le choix du follicule qui va se développer alors que les autres subissent l'atrésie semble stochastique mais le processus n'est pas d'emblée irréversible.

Le stock d'ovocytes utilisables par une femelle est définitivement constitué pendant la vie fœtale ou très peu de temps après la naissance chez une immense majorité de mammifères. Dès la constitution de cette réserve et jusqu'à son épuisement chez la femelle âgée, l'ovaire est le siège d'un processus de développement très particulier appelé folliculogénèse. Les follicules primordiaux qui forment la réserve sont constitués chacun d'un ovocyte primaire entouré d'une couche de cellules somatiques. La folliculogénèse se définit comme l'ensemble des processus de croissance et de maturation des follicules ovariens entre le stade de follicule primordial et l'ovulation

(figure 1). Sa finalité biologique est la production, lors de chaque cycle menstruel ou œstrien, d'un (pour les espèces mono-ovulantes) ou plusieurs (pour les espèces poly-ovulantes) ovocytes aptes à la fécondation et au développement.

Un gaspillage phénoménal de cellules germinales s'effectue au sein de l'ovaire. Ainsi, chez la femme, parmi les 6 à 7 millions de cellules germinales présentes dans l'ovaire du fœtus à 5 mois de gestation, seuls environ 500 ovocytes sont destinés à ovuler. Cette perte de cellules germinales s'effectue massivement pendant la vie fœtale, à la fin de l'ovogénèse, mais se poursuit également pendant toute la vie postnatale au cours de la folliculogénèse [1] (figure 2). On

ADRESSES

D. Monniaux : directeur de recherche à l'Inra.
B. Mandon-Pépin : chargée de recherche à l'Inra.
P. Monget : chargé de recherche à l'Inra.
Inra, Station de physiologie de la reproduction des mammifères domestiques, Ura Cnrs 1291, 37380 Nouzilly, France.

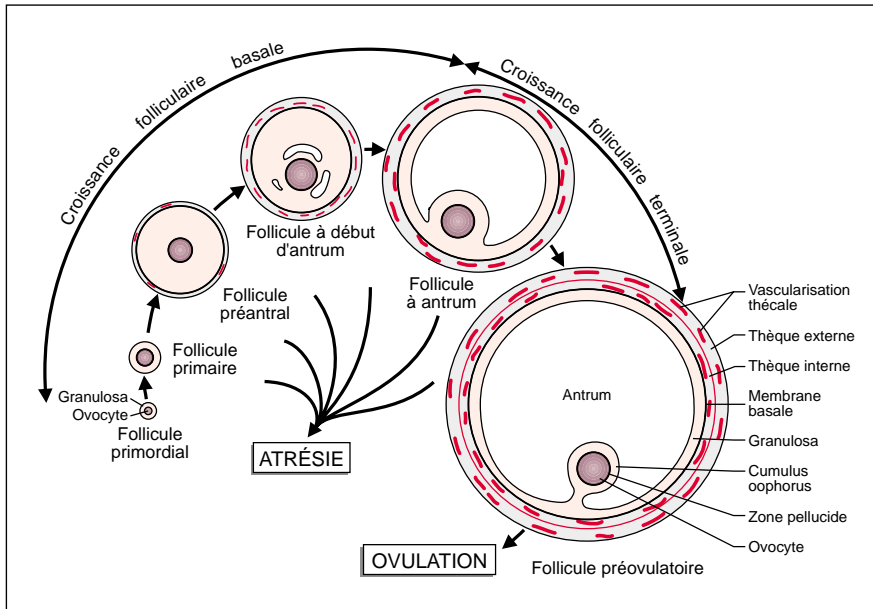


Figure 1. Principales étapes du développement d'un follicule ovarien.

estime que plus de 99 % des follicules qui entrent en croissance dégèrent au cours de leur développement. Le follicule préovulatoire constitue une structure d'exception, sélectionnée par un ensemble de régulations endocrines et paracrines très strictes, et les mécanismes qui contribuent à cette sélection ne sont pas encore tous compris. Notre objectif est de présenter nos connaissances actuelles

du processus d'atrésie, ainsi que les hypothèses qui peuvent être formulées à propos de questions essentielles, à savoir comment, de quoi et pourquoi un follicule ovarien dégère, puis meurt.

Comment meurt un follicule ?

Classiquement, les histologistes effectuent le diagnostic d'atrésie folliculaire par la présence d'anomalies morphologiques de l'ovocyte dans les follicules préantraux (ou secondaires) et de pycnoses dans le mur de granulosa des follicules à antrum (ou tertiaires). Les modalités de l'atrésie des follicules préantraux restent peu connues actuellement; en revanche les « symptômes » de l'atrésie des follicules à antrum sont nombreux et ont été rapportés dans des espèces animales variées. Cette forme d'atrésie est caractérisée en particulier par l'arrêt de la prolifération et la mort par apoptose des cellules de la granulosa, la fragmentation de la membrane basale qui sépare la granulosa des thèques folliculaires, la perte des jonctions perméables entre les cellules de la granulosa, et la réduction de la vascularisation thécale (figure 3). Dans les follicules en croissance terminale, elle s'accompagne également de la perte de l'expression et de l'activité de l'enzyme P450 aromatasase et de la

sensibilité aux gonadotrophines FSH et LH des cellules de la granulosa, conduisant à la chute du rapport œstrogènes/androgènes dans le liquide folliculaire. Parmi les autres changements fonctionnels rapportés, dont une liste est donnée dans le Tableau I, un fait marquant est l'importante augmentation des concentrations en protéines de liaison des *insulin-like growth factors*, IGFBP-2 et -4 (et IGFBP-5 chez les ruminants) observée dans le liquide folliculaire des follicules atériques [2]. En fait un double mécanisme, d'augmentation de synthèse de ces IGFBP par les cellules folliculaires (particulièrement pour IGFBP-2 et, chez les ruminants, IGFBP-5) et de diminution de leur dégradation par protéolyse (particulièrement pour IGFBP-4 et, chez les ruminants, IGFBP-5) est à l'origine de cette évolution [3].

Ces descriptions des changements fonctionnels des cellules somatiques des follicules à antrum, aussi fines soient-elles, ne peuvent à elles seules nous éclairer sur les mécanismes de l'atrésie. La connaissance de la chronologie de ces changements peut cependant nous aider à distinguer les événements précoces, potentiellement « causaux », des événements tardifs de la dégénérescence folliculaire. Ainsi ont été mis au point différents modèles expérimentaux visant à induire l'atrésie folliculaire *in vivo*, tels que l'hypophysectomie, ou l'injection d'anticorps dirigés contre la gonadotrophine chorionique équine (eCG) à des animaux prétraités avec eCG, ou encore l'administration de liquide folliculaire déstéroïdé. Avec ces modèles, l'atrésie des follicules en croissance terminale est déclenchée artificiellement par la diminution brutale des concentrations plasmatiques d'hormones gonadotropes. Par exemple chez la brebis, les follicules préovulatoires atteignent un stade avancé d'atrésie en moins de 72 heures après hypophysectomie. Dans les 24 heures qui suivent l'opération, on observe dans ces follicules une forte diminution des teneurs des cellules de thèque en fibronectine et en récepteurs de l'IGF-II/mannose 6 phosphate, ainsi qu'une augmentation de l'expression de l'IGFBP-2 dans les cellules de la granulosa et de thèque [3, 4]. Ces changements précèdent ou accompa-

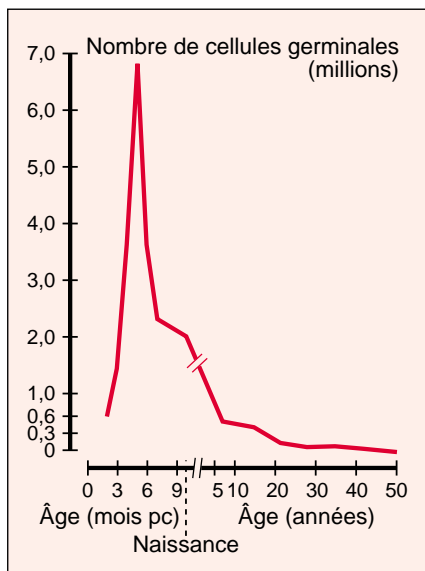


Figure 2. Évolution du nombre de cellules germinales dans l'ovaire au cours de la vie chez la femme. pc: après la conception.

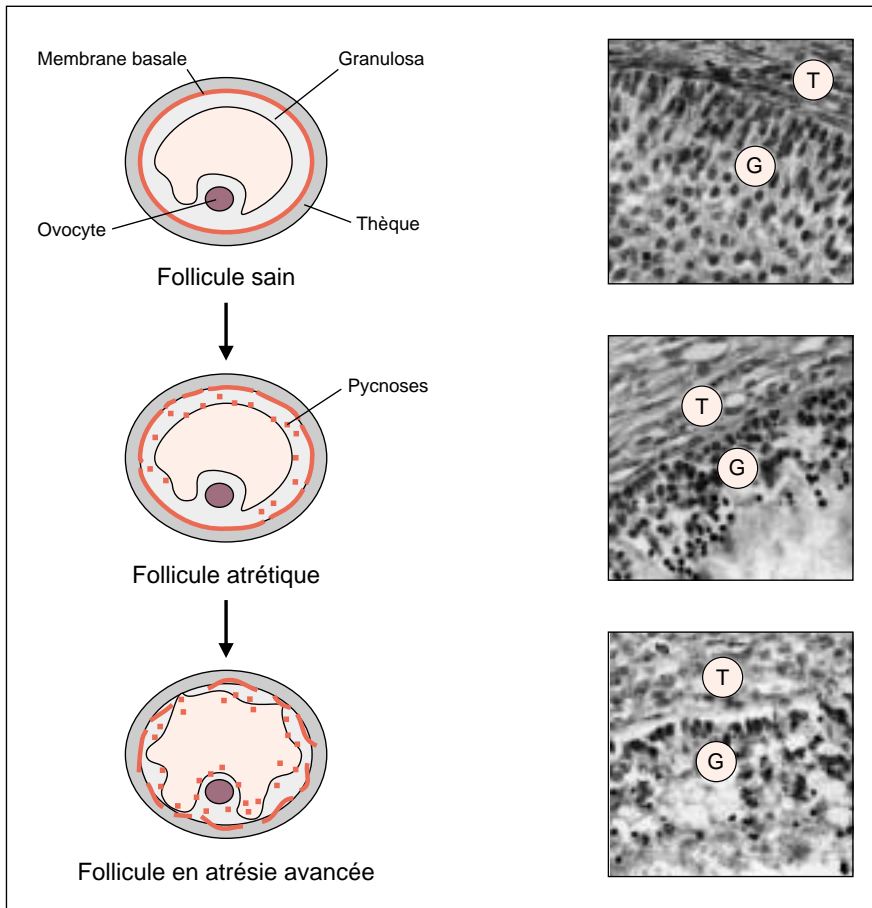


Figure 3. **Changements morphologiques caractéristiques de l'atrésie des follicules à antrum.** Les premiers signes de l'atrésie sont l'apparition de cellules pycnotiques et de pycnoses dans la zone interne du mur de granulosa du follicule. La zone externe du mur de granulosa et la zone du cumulus autour de l'ovocyte sont atteintes plus tardivement. En microscopie optique, l'atrésie se caractérise également par la fragmentation de la membrane basale qui sépare la granulosa de la thèque et la réduction de la vascularisation thécale (non représentée sur le schéma). Les photos illustrent l'état histologique de la paroi de follicules à différents stades d'atrésie chez la vache. G : granulosa, T : thèque.

gnent la disparition de l'aromatase dans les cellules de la granulosa, considérée jusqu'alors comme le marqueur fonctionnel le plus précoce de l'atrésie. Il reste à savoir si la fibronectine, le récepteur de l'IGF-II/mannose 6 phosphate ou l'IGFBP-2 sont causalement impliqués dans la perte de l'aromatase par les cellules de la granulosa et, s'ils le sont, par quels mécanismes. Si de telles études phénoménologiques ne nous permettent pas de conclure, elles sont néanmoins nécessaires pour poser correctement la question des causes et des conséquences dans le processus d'atrésie. Elles ont permis par exemple d'établir que la perte des

récepteurs des hormones gonadotropes et la perte de réponse cellulaire à l'action de ces hormones [5] sont des phénomènes relativement tardifs de l'atrésie et ne pourraient donc être en cause dans son déclenchement.

L'apoptose massive des cellules de la granulosa « signe » à coup sûr l'atrésie des follicules à antrum. Cependant la présence de quelques cellules apoptotiques (à un taux inférieur à 0,2 %) dans le mur de granulosa est observée dans la quasi-totalité des follicules en croissance [6] et n'est pas rare dans les follicules préovulatoires. Un faible taux d'apoptose est donc un processus physiologique normal

du développement folliculaire et c'est quand ce taux dépasse un seuil critique que le follicule entre réellement en atrésie. A ce titre, le stade de début d'atrésie constitue une phase de transition particulièrement intéressante. D'un point de vue morphologique, on constate à ce stade une « régionalisation » de l'entrée en apoptose. Ainsi, la zone du cumulus, c'est-à-dire les cellules entourant l'ovocyte, et la zone la plus externe du mur de granulosa, c'est-à-dire les cellules proches de la thèque et de sa vascularisation et au contact direct de la membrane basale, apparaissent comme des zones privilégiées de survie des cellules de la granulosa (figure 3). Par ailleurs, d'un point de vue fonctionnel, apoptose, prolifération cellulaire mais aussi stéroïdogénèse co-existent généralement dans le mur de granulosa des follicules en début d'atrésie. *In vivo*, l'augmentation du taux d'apoptose dans les cellules de la granulosa précède chez la brebis la chute de l'activité aromatasase et de la production d'œstradiol par ces cellules [5]. Sur des cellules de la granulosa de rate en culture, le déclenchement de l'apoptose s'accompagne même d'une stimulation de la stéroïdogénèse [7, 8]. Cette apparente contradiction peut s'expliquer de différentes façons. Selon une première hypothèse, les cellules qui meurent les premières seraient celles qui sont dans les stades les moins avancés de différenciation, et donc les moins stéroïdogènes. En faveur de cette hypothèse, signalons l'existence d'un gradient de différenciation dans le mur de granulosa, les cellules les plus différenciées étant situées au voisinage de la membrane basale, c'est-à-dire dans une zone privilégiée de survie cellulaire [9]. Selon une deuxième hypothèse, non exclusive de la première, il pourrait y avoir co-existence d'un processus d'apoptose et d'une stéroïdogénèse active au sein d'une même cellule de la granulosa. Cette hypothèse est étayée par l'existence d'une compartimentation cellulaire dans les cellules de la granulosa, permettant le maintien de l'intégrité des organites associés à la stéroïdogénèse (mitochondries, gouttelettes lipidiques, lysosomes, réticulum endoplasmique lisse) pendant les 24 premières heures suivant l'induction de l'apoptose [10].

Tableau I

CHANGEMENTS FONCTIONNELS OBSERVÉS AU COURS DE L'ATRÉSIE DES FOLLICULES EN DÉVELOPPEMENT TERMINAL CHEZ LES OVINS ET LES BOVINS

	Marqueurs fonctionnels	Changements d'expression ou de concentration
granulosa	P450 aromatasase récepteurs FSH et LH connexine 43 IGFBP-2 et -5 récepteurs de l'IGFII/mannose 6 phosphate laminine, fibronectine, collagène IV, héparane sulfate protéoglycanes	perte précoce perte tardive diminution progressive augmentation augmentation augmentation tardive
thèque folliculaire	P450 17 α -hydroxylase, C17-20 lyase IGFBP-2 et -4 récepteurs de l'IGFII/mannose 6 phosphate fibronectine cellulaire	diminution tardive augmentation perte précoce perte précoce
liquide folliculaire	œstrogènes androgènes IGFBP-2, -4 et -5 métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 héparane sulfate protéoglycanes prorénine	chute précoce augmentation augmentation progressive augmentation précoce et progressive augmentation augmentation

De quoi meurt un follicule ?

• Facteurs atrésiants et facteurs de survie

S'il est relativement facile de décrire comment meurt un follicule, en revanche les causes de cette mort restent encore du domaine de l'hypothèse. C'est une évidence de dire que la survie d'un follicule dépend d'un équilibre entre des facteurs stimulants et des facteurs inhibiteurs de son développement. Il est beaucoup moins évident de définir, parmi les facteurs capables de moduler la survie, la prolifération et la différenciation des cellules folliculaires (Tableau II), ceux qui sont effectivement « limitants » de ce développement. Quelques faits méritent néanmoins d'être rapportés. Chez la souris, la présence de mutations dans le gène codant pour la cytokine Steel (appelée également *Stem cell factor*) où son récepteur membranaire c-kit a pour conséquence au niveau ovarien, soit l'absence totale de cellules germinales, soit la présence de follicules primordiaux dont la croissance ne dépasse pas le stade de follicule primaire [11]. Le couple Steel/c-kit jouerait donc un rôle crucial dans la survie

des cellules germinales pendant l'ovogenèse, et vraisemblablement pendant la folliculogénèse. En effet Steel, synthétisé par les cellules de la granulosa qui entourent l'ovocyte, est capable d'activer la croissance de ce dernier, porteur du récepteur c-kit [12]. On peut penser qu'un « désaccord » du couple Steel/c-kit pourrait être à l'origine de la dégénérescence ovocytaire qui caractérise l'atrésie des follicules préantraux. Un autre fait qui mérite d'être souligné est la stricte dépendance des follicules en croissance terminale vis-à-vis des gonadotrophines. Ainsi, l'hypophysectomie, mais aussi l'immunisation contre le GnRH ou l'administration d'antagonistes du GnRH induisent l'atrésie rapide de tous les follicules au-delà d'une taille définie, caractéristique de chaque espèce (0,2 mm de diamètre chez la rate, 2 mm chez la brebis, 3 à 5 mm chez la femme ou la vache...). Avant ce stade, la croissance folliculaire (appelée « croissance folliculaire basale ») est vraisemblablement sous le contrôle essentiel de facteurs de croissance et de cytokines qui règlent la prolifération des cellules de la granulosa. Au-delà de ce stade, FSH, par son action sur les cellules de la granulosa, semble être le chef d'orchestre

du développement folliculaire. L'absence de développement folliculaire terminal chez les femmes porteuses d'une mutation du récepteur de FSH [13] et chez les souris dont l'expression de la sous-unité β de FSH a été supprimée par transgénèse (*knock-out*) [14] en est une illustration. Enfin, peu de temps avant l'ovulation, le développement final du follicule préovulatoire passe sous le contrôle essentiel de LH qui prend le relais de FSH. Ainsi FSH, puis LH, sont véritablement les facteurs limitants du développement folliculaire terminal. Signalons néanmoins à ce stade l'importance des régulations de type paracrine, mettant en jeu des facteurs de croissance (les IGF et leurs protéines de liaison, TGF- β , activine, pour n'en citer que quelques-uns) et des stéroïdes (œstradiol) dans l'amplification des réponses des cellules folliculaires aux gonadotrophines. Comme nous le verrons plus loin, ces régulations paracrines jouent vraisemblablement un rôle décisif dans la sélection des follicules ovulatoires.

• Les acteurs moléculaires de l'apoptose

L'environnement folliculaire, constitué d'un ensemble de facteurs de

Tableau II

FACTEURS PEPTIDIQUES ET STÉROÏDIENS CAPABLES DE MODULER LA SURVIE, LA PROLIFÉRATION ET LA DIFFÉRENCIATION DES CELLULES DE LA GRANULOSA

	Facteurs stimulants	Facteurs inhibiteurs
Survie	FSH, LH insuline, IGF EGF, TGF-α FGF activine interleukine-1 laminine progestérone	IGFBP⁽²⁾ follistatine ⁽²⁾ TGF- β interleukine-6 TNF- α , Fas ligand interféron γ GnRH androgènes
Prolifération	FSH insuline, IGF EGF, TGF-α FGF activine TGF- β interleukine-1 TNF- α laminine œstrogènes	IGFBP⁽²⁾ follistatine ⁽²⁾ TGF- α TGF- β interleukine-6 interféron γ
Différenciation ⁽¹⁾	FSH, LH insuline, IGF activine ⁽³⁾ TGF- β laminine œstrogènes androgènes	IGFBP⁽²⁾ follistatine ⁽²⁾ inhibine ⁽³⁾ EGF, TGF-α FGF TGF- β interleukine-6 TNF- α androgènes

Les facteurs dont l'effet est similaire dans des espèces animales variées sont indiqués en caractères gras. En revanche, la réponse cellulaire vis-à-vis d'autres facteurs varie de façon très importante (un même facteur pouvant être stimulant ou inhibiteur) selon l'espèce animale, le modèle expérimental et le degré de différenciation des cellules de la granulosa. En particulier, l'action des cytokines, des stéroïdes et des facteurs de la famille du TGF- β sur les cellules de la granulosa n'est pas vraiment comprise actuellement.

IGF: insulin-like growth factors, IGFBP: IGF binding proteins, EGF: epidermal growth factor, TGF: transforming growth factor, FGF: fibroblast growth factor, TNF: tumor necrosis factor.

(1) Appréciée par la présence d'une stéroïdogénèse active (production d'œstradiol, de progestérone, expression de l'aromatase ou de la cholesterol side-chain cleavage) ou de récepteurs de LH.

(2) Substances capables de lier un facteur actif et de moduler son action. Les IGFBP et la follistatine inhibent respectivement les actions des IGF et de l'activine sur des cellules de la granulosa in vitro.

(3) En revanche, l'inhibine et l'activine sont, respectivement, des facteurs stimulants et inhibiteurs de la différenciation des cellules de thèque.

nature endocrine ou paracrine, engendre une cascade de signaux intracellulaires dont l'intégration détermine la poursuite ou non du développement folliculaire. Nous avons parlé précédemment de l'existence de deux formes d'atrésie folliculaire, l'une ayant l'ovocyte pour cible, et touchant les follicules préantraux, particulièrement à la fin de la vie foetale et pendant la période prépubertaire, l'autre ayant les cellules de la granulosa pour cible, et tou-

chant uniquement les follicules à antrum. Il est à présent établi qu'un processus d'apoptose, ou de mort cellulaire programmée, constitue la base moléculaire et cellulaire de ces deux formes d'atrésie [15]. La présence d'une endonucléase (très vraisemblablement la DNase I) dont l'activité dépend d'ions calcium et magnésium est d'ailleurs retrouvée dans l'ovocyte des follicules préantraux et dans les cellules de la granulosa des follicules à antrum chez la rate [16].

Les principaux acteurs connus de l'apoptose sont exprimés par les cellules de la granulosa et agissent selon des modes décrits auparavant pour d'autres modèles cellulaires. Ainsi, les caspases CASP-2 et CASP-3, ces cystéines protéases qui activent indirectement les endonucléases en dégradant spécifiquement les lamines nucléaires et la PARP (poly(ADP-ribose) polymérase, enzyme de réparation de l'ADN) [17], sont exprimées par les cellules de la granulosa. L'injection d'eCG à des rates prépubères empêche l'atrésie folliculaire, l'apoptose des cellules de la granulosa et réduit l'expression de ces caspases [18]. L'activation des caspases s'effectuerait au moins par deux voies qui sont présentes dans les follicules ovariens (figure 4):

- la voie Fas/récepteur du TNF- α . Ces 2 récepteurs membranaires, ainsi que leurs ligands respectifs, sont exprimés dans l'ovaire et l'activation du système Fas/Fas ligand est capable de déclencher *in vitro* l'apoptose dans les cellules de la granulosa [19, 20] et l'ovocyte [21]. *In vivo*, l'administration d'anticorps anti-Fas, capable de mimer l'effet du ligand Fas, a pour effet d'induire l'atrésie folliculaire et de diminuer le nombre d'ovulations chez la souris, tandis que les ovaires de souris mutantes *lpr*, chez lesquelles l'expression de Fas est très réduite (*m/s* 1993, n° 6-7, p. 663), ont deux fois plus de follicules préantraux à l'état adulte que les souris normales [22]. D'une façon générale, cette voie permet l'induction de l'apoptose, soit par activation directe des caspases [23], soit en activant la synthèse, à partir des sphingomyélinases, de céramide, qui pourrait jouer le rôle de second messager en activant une c-jun kinase (JNK/SAPK) [24]. D'après des observations préliminaires, l'ajout d'un analogue de céramide au milieu de culture de follicules de rat induit l'apoptose des cellules de la granulosa mais le rôle de ce facteur, encore controversé dans l'apoptose d'autres types cellulaires [23], reste à établir dans l'ovaire;

- la voie du « rhéostat » Bcl-2/Bax. Les facteurs Bcl-2, Bax, Bad, Bok, Bcl-xL et Bcl-xS sont exprimés dans l'ovaire chez de nombreux mammifères et chez les oiseaux [25]. Le *knock-out* du facteur de survie Bcl-2 a pour effet de diminuer le nombre de

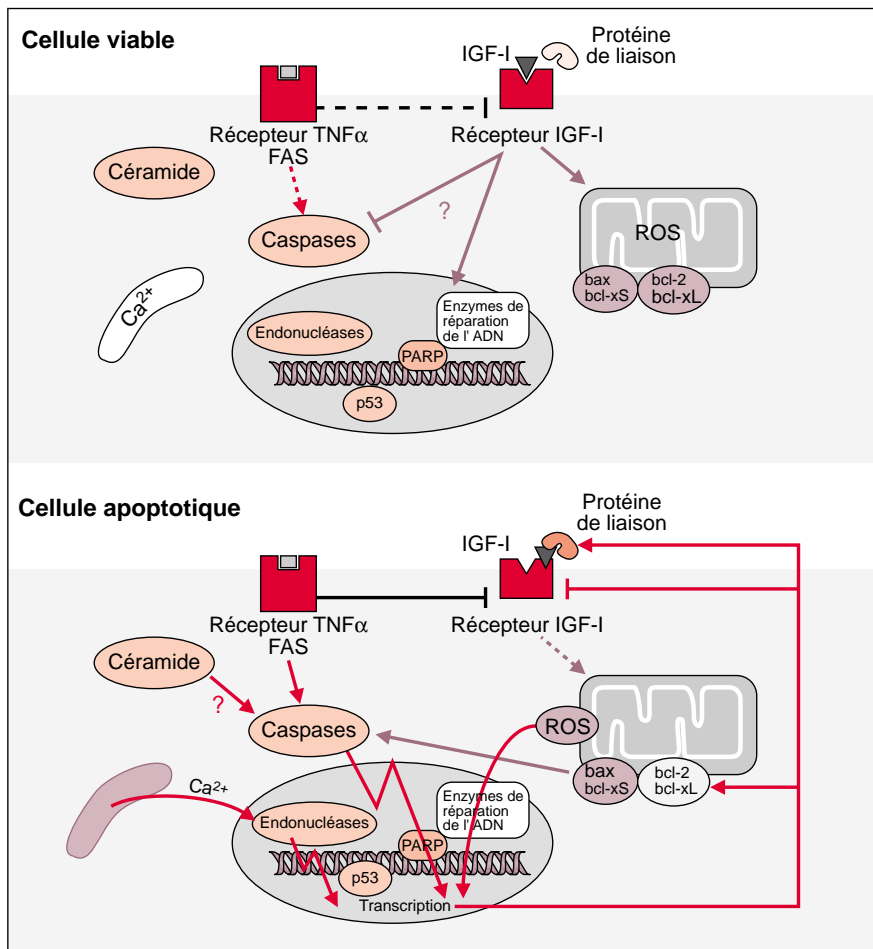


Figure 4. **Mécanismes cellulaires conduisant à l'apoptose dans les cellules de la granulosa.** La survie des cellules de la granulosa est contrôlée par un ensemble de facteurs, dont le facteur de croissance IGF-I. Dans un follicule sain, la biodisponibilité de l'IGF-I dans le milieu extracellulaire est élevée en raison des faibles teneurs en protéines de liaison que IGF présente dans le liquide folliculaire. L'activation du récepteur de l'IGF-I permet la survie de la cellule, en empêchant le déclenchement des différents mécanismes intracellulaires conduisant à l'apoptose. Dans un follicule en début d'atrésie, l'augmentation des teneurs en protéines de liaison des IGF conduit à une baisse de la biodisponibilité de l'IGF-I et, par suite, à l'inactivation des mécanismes de survie. L'activation des caspases s'effectuerait sous le double contrôle du système Fas/récepteur du TNF- α , et des éléments de la famille de Bcl-2 qui, avec les radicaux libres de l'oxygène (ROS), règlent la perméabilité mitochondriale et la libération de facteurs apoptotiques. Des événements transcriptionnels tels que la surexpression de p53 et Bax, et l'inhibition de l'expression de Bcl-xL et du récepteur de l'IGF-I amplifieraient ce processus. Le cas de l'IGF-I et de ses protéines de liaison est ici présenté à titre d'exemple, mais ce système ne saurait en aucun cas être le seul à régler le déclenchement de l'apoptose dans les cellules de la granulosa.

follicules primordiaux dans les ovaires de souris de 42 jours, cependant la croissance folliculaire s'effectue apparemment normalement et les souris sont fertiles [26]. En revanche, le *knock-out* du facteur Bax (capable d'induire l'apoptose en s'associant aux facteurs de survie Bcl-

2 ou Bcl-xL sous forme d'hétérodimère) augmente d'un facteur 3 le nombre de follicules primordiaux, et empêche l'apoptose des cellules de la granulosa dans les follicules dont, par ailleurs, le développement semble normal [27]. La survie des cellules germinales pendant l'ovogé-

nèse, et peut-être la folliculogénèse, serait donc étroitement dépendante du rapport Bcl-2/Bax. L'apoptose des cellules de la granulosa serait, quant à elle, sous le contrôle essentiel de Bax, dont l'expression dans les follicules de rate augmente très fortement lors de leur entrée en atrésie et diminue après administration de gonadotrophines [28]. Les facteurs Bcl-2 et Bcl-x, présents dans la membrane externe des mitochondries, inhiberaient l'apoptose en réglant la perméabilité de la membrane mitochondriale [29], ainsi qu'en activant une voie anti-oxydante. De fait, des inhibiteurs de *stress oxydatif*, ajoutés au milieu de culture de follicules de rate, sont capables de mimer l'effet anti-apoptotique de FSH sur les cellules de la granulosa [30] et d'activer une pompe membranaire permettant le passage d'acide ascorbique dans ces cellules [31].

Un dernier ensemble de facteurs pourrait jouer un rôle décisif dans le déclenchement de l'apoptose des cellules de la granulosa. Il s'agit des oncogènes (facteurs des familles de c-Myc, c-Fos, c-Jun...) et des anti-oncogènes (p53, WT-1, pRB...) réglant directement l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Par exemple, c-Myc, qui est connu pour stimuler la prolifération et induire l'apoptose de nombreux types cellulaires, est exprimé par les cellules de la granulosa à forte activité de prolifération contenues dans les petits follicules à antrum ainsi que par les cellules de follicules atrétiques [32]. Parmi ces facteurs, il semble que le facteur de transcription p53 puisse jouer un rôle pivot dans l'induction de l'atrésie folliculaire. Considéré comme le « gardien du génome », c'est un inhibiteur de prolifération cellulaire, permettant la mise en place des systèmes de réparation de l'ADN des cellules endommagées. En outre, il stimule la transcription du gène *Bax* et inhibe celle de *Bcl-2*, jouant ainsi un rôle actif dans l'induction de l'apoptose [33]. Dans les follicules ovariens de rate, on observe l'expression de p53 dans les noyaux des cellules de la granulosa apoptotiques ; l'administration d'eCG inhibe à la fois l'apoptose des cellules de la granulosa et la synthèse

de p53, de WT-1 et de Bax dans ces cellules [34]. Sur des cellules de la granulosa de rate en culture primaire, le blocage de l'activité transcriptionnelle de p53 après transfection de l'antigène LT du virus SV40 inhibe l'induction de l'apoptose par l'AMPc ou la forskoline [7]. Enfin, sur des cellules de la granulosa immortalisées, exprimant une forme mutante thermosensible de p53, le passage de la température de 37°C (à laquelle le mutant p53 est inactif) à la température de 32°C (à laquelle le mutant se fixe à l'ADN et induit l'expression de p21) provoque l'arrêt de la prolifération cellulaire, stimule de façon transitoire la stéroïdogenèse et permet l'induction massive et rapide de l'apoptose en présence de niveaux élevés d'AMPc [8]. L'ensemble de ces résultats suggère qu'une montée de l'expression de p53 dans les cellules de la granulosa des follicules ovariens pourrait, en induisant une augmentation des niveaux intracellulaires de Bax, déclencher le processus d'apoptose, cela dans des cellules où les niveaux des facteurs intracellulaires de survie tels que Bcl-2 ne contrebalancent pas l'augmentation de Bax. En revanche, si l'équilibre entre facteurs de survie et facteurs apoptotiques est favorable, p53 pourrait induire la sortie des cellules de la granulosa du cycle cellulaire et permettre leur entrée en différenciation terminale. La liste des gènes possédant une séquence consensus pour p53 dans leur promoteur ne cesse de s'allonger. Citons en particulier le gène de l'IGFBP-3, dont l'induction par p53 conduit à l'inhibition de la prolifération cellulaire [35]. On ne sait pas si une telle séquence consensus est présente dans les promoteurs des gènes des IGFBP-2, -4 (et IGFBP-5 chez les ruminants) dont, nous le rappelons, l'expression augmente au cours de l'atrésie folliculaire [3]. En revanche, sa découverte récente dans le promoteur de la métalloprotéase MMP-2 [36] permet d'imaginer un rôle de p53 dans l'augmentation des niveaux intrafolliculaires de MMP-2 observée lors de l'atrésie [4]. Parions que p53, ainsi que son « grand frère » récemment découvert p73 (*m/s* 1997, n° 12, p. 1472) [37], sont au cœur des mécanismes de développement et d'atrésie folliculaire...

Pourquoi lui et pas un autre ?

Comprendre pourquoi dans l'ovaire d'une espèce mono-ovulante comme la femme, tel follicule dégénère tandis que tel autre, soumis au même environnement endocrinien, poursuit son développement, reste « la » question cruciale. En d'autres termes, il s'agit de savoir comment est réglé le gaspillage folliculaire qui s'opère pendant toute la vie de la femelle. En gros deux hypothèses s'affrontent, l'une déterministe, l'autre stochastique: soit le follicule est prédestiné dès sa formation à ovuler ou à dégénérer, soit le processus d'atrésie s'opère à chaque stade de développement au hasard, par tirage au sort dans un *pool* de follicules ayant tous les mêmes potentialités. On peut penser que certains follicules sont prédestinés à dégénérer. Des anomalies de morphogenèse peuvent être observés dans la population de follicules primordiaux et primaires comme, par exemple, la présence de plusieurs ovocytes par follicule, fréquemment signalée dans l'ovaire de chienne en particulier [38], ou d'un nombre insuffisant de cellules somatiques, ou d'anomalies ovocytaires. Ces follicules, s'ils démarrent leur croissance, dégénèrent dans leur grande majorité avant d'acquiescer un antrum. La perte massive de cellules germinales qui suit l'ovogenèse pendant la vie fœtale et le début de la vie postnatale pourrait correspondre à l'élimination de la plupart de ces follicules anormalement constitués. Cependant, le *pool* de follicules primordiaux, qui échappent à cette première vague de dégénérescence et à partir desquels la folliculogenèse s'édifie, n'est pas homogène. Ainsi, la position même du follicule dans le cortex ovarien détermine son aptitude à entrer en croissance et le taux de division de ses cellules de la granulosa [39]. On peut supposer qu'elle détermine aussi en partie le stade auquel le follicule dégénérera. Enfin, nous ne savons pas actuellement si deux follicules « normalement constitués », mais l'un formé au début de la période ovogénétique et l'autre plus tardivement, ont les mêmes capacités de développement. L'hypothèse d'une prédestination semble beaucoup moins vraisem-

blable quand on considère l'atrésie des follicules au cours de leur développement terminal. En effet, à ce stade la plasticité du développement folliculaire est remarquable puisque l'administration de gonadotrophines exogènes est capable d'empêcher l'atrésie de follicules qui normalement n'auraient pas atteint le stade ovulatoire et d'induire ainsi une polyovulation. L'hypothèse d'une « récupération » de follicules en début d'atrésie par des niveaux élevés de gonadotrophines lors d'un traitement de stimulation ovarienne a même été avancée [40]. De façon tout à fait remarquable également, la suppression chez la vache de tous les follicules de plus de 5 mm de diamètre appartenant à la première vague du cycle œstrien, sauf un, pris au hasard, conduit au développement du follicule laissé en place, qui, dans tous les cas, devient dominant et capable d'ovuler [41]. Ce résultat montre clairement que n'importe quel follicule qui entre en développement terminal lors d'une vague folliculaire a les potentialités de se développer jusqu'au stade préovulatoire. Alors comment, dans les conditions physiologiques normales, s'effectue la sélection du follicule ovulatoire? La réponse à cette question réside vraisemblablement dans le fait que le *pool* de follicules au sein duquel s'opère la sélection n'est pas homogène. Bien que des follicules de même taille aient, *a priori*, les mêmes potentialités, ils ne sont pas fonctionnellement identiques en termes de vitesse de prolifération des cellules folliculaires, de stéroïdogenèse et de synthèse de facteurs de croissance et/ou de protéines de liaison de ces facteurs. Les raisons de ces différences entre follicules apparemment tous au même stade de développement nous échappent pour l'instant. On peut penser que les caractéristiques de chaque follicule résultent à la fois de sa date d'entrée en croissance, de sa position dans l'ovaire, de l'importance de sa vascularisation, de l'« histoire » de son exposition aux gonadotrophines, etc. Quoi qu'il en soit, chaque follicule est donc caractérisé par un équilibre local qui lui est propre, entre des facteurs paracrines stimulants (œstradiol, IGF, activine...) et inhibiteurs (androgènes, IGFBP, follistatine...) de son

développement. De fait, une hiérarchie fonctionnelle s'établit entre follicules, pourtant *a priori* au même stade de développement. Lors de chaque vague folliculaire, le démarrage synchrone d'un groupe de follicules en développement terminal est suivi d'une diminution des concentrations circulantes de FSH, en réponse à la rétroaction négative de l'œstradiol et de l'inhibine sécrétés par ces follicules sur le système hypothalamo-hypophysaire. Dans cet environnement endocrinien qui devient alors « limitant », seul le follicule fonctionnellement le mieux adapté poursuit son développement. Les autres follicules débutent un processus d'atréisie qui se traduit dès ses premiers stades par une augmentation de la synthèse d'éléments inhibiteurs (IGFBP, p53, Bax, caspases) et la perte de synthèse d'éléments stimulants (œstradiol, Bcl-xL), changements qui ne font que précipiter leur dégénérescence (figure 5). La sélection du follicule préovulatoire ne résulte donc pas d'un tirage au sort, mais du « choix » du follicule en parfaite harmonie, à un instant donné, avec les niveaux circulants de gonadotrophines. Ainsi, entre une hypothèse déterministe et une hypothèse stochastique du début de l'atréisie, c'est en fait une hypothèse opportuniste qui semble se dégaier.

Conclusions

Le gaspillage phénoménal de cellules germinales qui est la conséquence de l'atréisie folliculaire s'effectue selon un « programme » dont la signification biologique est vraisemblablement liée au succès de la reproduction dans chaque espèce de mammifères. En effet, le bilan positif de ce gaspillage est l'ovulation dont le nombre à chaque cycle œstrien ou menstruel est finement réglé. Le taux d'ovulation naturel apparaît dans tous les cas adapté à la capacité de mener à terme à la fois le développement embryonnaire pendant la gestation et l'élevage des jeunes. On pourrait dire pour simplifier que la survie d'une espèce dépend d'une bonne adéquation entre taux d'ovulation, capacité utérine et nombre de mamelles. Il en résulte que l'ovaire ne fonctionne pas au maximum de ses

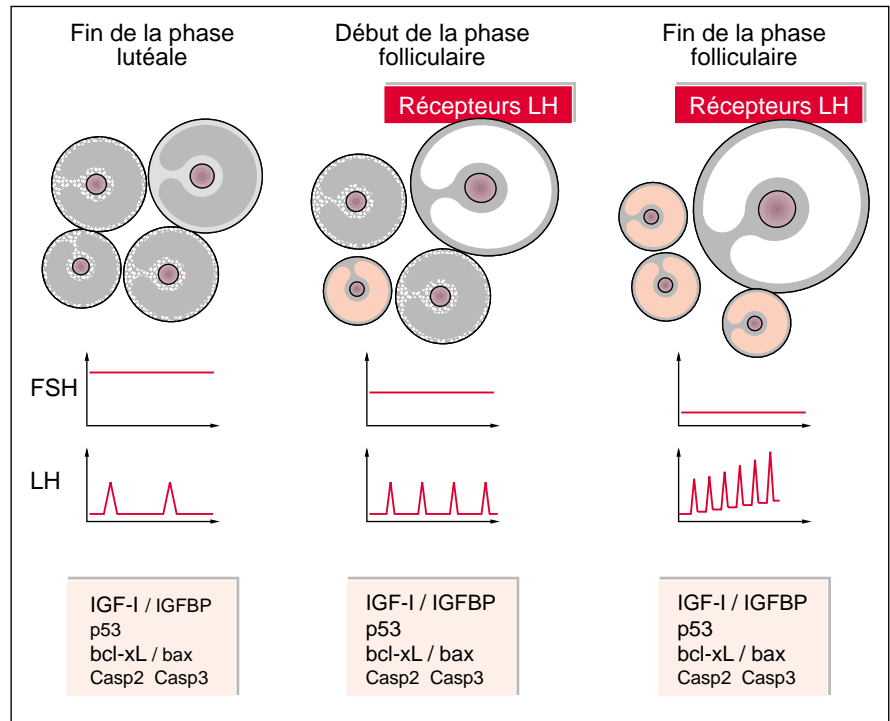


Figure 5. **Sélection du follicule ovulatoire au cours de la croissance folliculaire terminale, pendant la phase folliculaire du cycle ovarien.** Lors de la régression du corps jaune en fin de phase lutéale, les concentrations circulantes élevées de FSH permettent la croissance synchrone d'un groupe de follicules en développement terminal. En début de phase folliculaire, la pulsativité de LH s'accélère mais les concentrations de FSH diminuent, en réponse à la rétroaction négative de l'œstradiol et de l'inhibine sécrétés par ces follicules sur le système hypothalamo-hypophysaire. Dans cet environnement endocrinien qui devient alors « limitant », seul le follicule fonctionnellement le mieux adapté, qui a acquis des récepteurs de LH dans ses cellules de la granulosa et peut donc s'affranchir de la baisse de concentration de FSH, poursuit son développement. Les autres follicules débutent un processus d'atréisie qui se traduit dès ses premiers stades par une augmentation de synthèse d'éléments inhibiteurs (IGFBP, p53, Bax, caspases) et la perte de synthèse d'éléments stimulants (Bcl-xL), changements qui ne font que précipiter leur dégénérescence. La fin de phase folliculaire se caractérise par la « dominance » du futur follicule ovulatoire dont le développement s'effectue alors sous le contrôle exclusif des pulses de LH, et la dégénérescence des follicules non sélectionnés. Dans la figure, les encadrés schématisent les principales variations des éléments stimulants et inhibiteurs du développement folliculaire, observées dans les follicules qui entrent en atréisie au cours du mécanisme de sélection du follicule ovulatoire.

capacités mais selon un optimum qui dépend d'un ensemble de contraintes propres à la survie de l'espèce et de l'individu.

Nous ne percevons encore que les grandes lignes de ce programme. Nos efforts doivent maintenant se concentrer sur l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires qui le soutiennent, non seulement dans un contexte physiologique, mais aussi pathologique. Par exemple, il est reconnu que certains cas de

défaillance ovarienne précoce (*premature ovarian failure*) s'expliquent par une accélération de la perte de cellules germinales. Ce syndrome s'observe chez les femmes de caryotype 45,X0 (syndrome de Turner, voir [42] dans le même numéro de *m/s*), ou atteintes d'anomalies dans la région du gène *ZFX* sur le chromosome X. Il s'observe également chez des femmes de caryotype normal présentant des symptômes de ménopause précoce et pour lesquelles une

insensibilité folliculaire aux gonadotrophines ou des problèmes d'auto-immunité ont été diagnostiqués [43]. Les mécanismes à l'origine de l'accélération de la perte folliculaire dans ces cas pathologiques restent encore peu explorés. Un autre type de maladie ovarienne fréquemment rencontrée chez la femme est le syndrome des ovaires polykystiques. Dans ce cas, l'absence d'ovulation est associée à un arrêt de croissance folliculaire au-delà de 10 mm de diamètre et à une production excessive d'androgènes par les cellules thécales des follicules ainsi bloqués. Quelle que soit la cause primaire de cette affection (hypersécrétion de LH, d'insuline, ou mutation dans le gène codant pour l'enzyme P450 *cholesterol side-chain cleavage*... [44]), les mécanismes conduisant au blocage du développement folliculaire n'ont pas été identifiés. Actuellement nous ne savons pas dans quelle mesure ils diffèrent des mécanismes qui conduisent à l'arrêt de croissance d'un follicule lors de son entrée en atresie dans un contexte physiologique. Pour conclure, il est certain que mieux comprendre les mécanismes intimes de l'atrésie pourrait permettre à terme, avec le développement des technologies de congélation d'ovocytes, de mieux gérer le capital de cellules germinales dont dispose un individu, avec des retombées appliquées aussi bien chez l'homme, comme nous venons de l'évoquer, que chez l'animal (conservation des espèces en voie de disparition, création de troupeaux d'élite) ■

RÉFÉRENCES

- Baker TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc Roy Soc London, Ser. B* 1963; 155: 557-79.
- Cataldo NA, Giudice LC. Insulin-like growth factor binding protein profiles in human ovarian follicular fluid correlate with follicular functional status. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 821-9.
- Monget P, Besnard N, Huet C, Pisselet C, Benne F, Gasser F, Hatey F, Mulsant P, Tomanek M, Monniaux D. Role of the IGF system in the sheep ovary. In: LeRoith D, ed. *The role of insulin-like growth factors in ovarian physiology*. Frontiers in Endocrinology, vol 19, 1996: 85-99.
- Huet C, Monget P, Pisselet C, Hennequet C, Locatelli A, Monniaux D. 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, extracellular matrix components, and matrix metalloproteinases. *Biol Reprod* 1998; 58: 175-85.
- Jolly PD, Tisdall DJ, De'ath G, Heath DA, Lun S, Hudson NL, McNatty KP. Granulosa cell apoptosis, aromatase activity, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response to gonadotropins, and follicular fluid steroid levels during spontaneous and induced follicular atresia in ewes. *Biol Reprod* 1997; 56: 830-6.
- Jolly PD, Smith PR, Heath DA, Lun S, Hudson NL, Still LA, Watts CH, McNatty KP. Morphological evidence of apoptosis and the prevalence of apoptotic versus mitotic cells in the membrana granulosa of ovarian follicles during spontaneous and induced follicular atresia in ewes. *Biol Reprod* 1997; 56: 837-46.
- Aharoni D, Dantes A, Oren M, Amsterdam A. cAMP-mediated signals as determinants for apoptosis in primary granulosa cells. *Exp Cell Res* 1995; 218: 271-82.
- Keren-Tal I, Suh BS, Dantes A, Lindner S, Oren M, Amsterdam A. Involvement of p53 expression in cAMP-mediated apoptosis in immortalized granulosa cells. *Exp Cell Res* 1995; 218: 283-95.
- Amsterdam A, Koch Y, Lieberman ME, Lindner HR. Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *J Cell Biol* 1975; 67: 894-900.
- Amsterdam A, Dantes A, Selvaraj N, Aharoni D. Apoptosis in steroidogenic cells: structure-function analysis. *Steroids* 1997; 62: 207-11.
- Huang EJ, Manova K, Packer AI, Sanchez S, Bachvarova RF, Besmer P. The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Dev Biol* 1993; 157: 100-9.
- Packer AI, Hsu YC, Besmer P, Bachvarova RF. The ligand of the c-kit receptor promotes oocyte growth. *Dev Biol* 1994; 161: 194-205.
- Aittomaki K, Lucena JL, Pakarinen P, et al. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* 1995; 2: 959-68.
- Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet* 1997; 15: 201-4.
- Hsueh AJW, Billig H, Tsafiriri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev* 1994; 15: 707-24.
- Boone DL, Tsang BK. Identification of deoxyribonuclease I in the rat ovary. *Biol Reprod* 1997; 57: 813-21.
- Pozo F, de La Rubia Sanchez G, Ménisier-de Murcia J, de Murcia G. La poly(ADP-ribose) polymérase: un facteur de survie. *Med Sci* 1998; 14: 1196-1203.
- Flaws JA, Kugu K, Trbovich AM, Tilly KI, DeSanti A, Hirschfield AN, Tilly JL. Interleukin-1 β -converting enzyme-related proteases (IRPs) and mammalian cell death: dissociation of IRP-induced oligonucleosomal endonuclease activity from morphological apoptosis in granulosa cells of the ovarian follicle. *Endocrinology* 1995; 136: 5042-53.
- Quirk SM, Cowan RG, Joshi SG, Henrikson KP. Fas antigen-mediated apoptosis in human granulosa/luteal cells. *Biol Reprod* 1995; 52: 279-87.
- Hakuno N, Koji T, Yano T, Kobayashi N, Tsutsumi O, Taketani Y, Nakane PK. Fas/APO-1/CD95 system as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. *Endocrinology* 1996; 137: 1938-48.
- Mori T, Xu JP, Mori E, Sato E, Saito S, Guo MW. Expression of Fas-Fas ligand system associated with atresia through apoptosis in murine ovary. *Horm Res* 1997; 48 (suppl 3): 11-9.
- Sakamaki K, Yoshida H, Nishimura Y, Nishikawa SI, Manabe N, Yonehara S. Involvement of Fas antigen in ovarian follicular atresia and luteolysis. *Mol Reprod Dev* 1997; 47: 11-8.
- Nagata S, 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-65.
- Lassignal Johnson N, Gardner AM, Diener KM, Lange-Carter CA, Gleavy J, Jarpe MB, Minden A, Karin M, Zon LI, Johnson GL. Signal transduction pathways regulated by mitogen-activated/extracellular response kinase kinase induce cell death. *J Biol Chem* 1996; 271: 3229-37.
- Tilly JL, Tilly KI, Perez GI. The genes of cell death and cellular susceptibility to apoptosis in the ovary: a hypothesis. *Cell Death Differ* 1997; 4: 180-7.
- Ratts VS, Flaws JA, Kolp R, Sorenson CM, Tilly JL. Ablation of *bcl-2* gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology* 1995; 136: 3665-8.
- Knudson CM, Tung KSK, Tourtellotte WG, Brown GAJ, Korsmeyer SJ. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 1995; 270: 96-9.
- Tilly JL, Tilly KI, Kenton ML, Johnson AL. Expression of members of the *bcl-2* gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of apoptosis is associated with decreased *bax* and constitutive *bcl-2* and *bcl-x_{long}* messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 1995; 136: 232-41.
- Polla BS, Banzet N, Dall'Ava J, Arrigo AP, Vignola AM. Les mitochondries, carrefour entre vie et mort cellulaire. *Med Sci* 1998; 14: 18-25.

RÉFÉRENCES

30. Tilly JL, Tilly KI. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology* 1995; 136: 242-52.
31. Behrman HR, Preston SL, Aten RF, Rinuldo P, Zreik TG. Hormone induction of acid ascorbic transport in immature granulosa cells. *Endocrinology* 1996; 137: 4316-21.
32. Li S, Maruo T, Ladines-Llave CA, Kondo H, Mochizuki M. Stage-limited expression of myc oncoprotein in the human ovary during follicular growth, regression and atresia. *Endocr J* 1994; 41: 83-92.
33. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *Bax* gene. *Cell* 1995; 80: 293-9.
34. Tilly KI, Banerjee S, Banerjee P, Tilly JL. Expression of the p53 and Wilms'tumor suppressor genes in the rat ovary: gonadotropin repression *in vivo* and immunohistochemical localization of nuclear p53 protein to apoptotic granulosa cells of atretic follicles. *Endocrinology* 1995; 136: 1394-402.
35. Buckbinder L, Talbott R, Velasco-Miguel S, Takenaka I, Faha B, Seizinger BR, Kley N. Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein by p53. *Nature* 1995; 377: 646-9.
36. Bian J, Sun Y. Transcriptional activation by p53 of the human type IV collagenase (gelatinase A or matrix metalloproteinase 2) promoter. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 17: 6330-8.
37. Jost CA, Marin MC, Kaelin WG. P73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 1997; 389: 191-4.
38. McDougall K, Hay MA, Goodrowe KL, Gartley CJ, King WA. Changes in the number of follicles and of oocytes in ovaries of prepubertal, peripubertal and mature bitches. *J Reprod Fert* 1997; 51: 25-31.
39. Mariana JC, de Pol J. Analyse morphométrique de la population des follicules primordiaux de l'ovaire de lapine de 30 jours. *Arch Biol (Bruxelles)* 1986; 97: 139-56.
40. Monniaux D, Mariana JC, Gibson WR. Action of PMSG on follicular populations in the heifer. *J Reprod Fert* 1984; 70: 243-53.
41. Gibbons JR, Wiltbank MC, Ginther OJ. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biol Reprod* 1997; 57: 1066-73.
42. Monget P, Hembert S, Binart N, Gougeon A, Panthier JJ. La physiologie ovarienne: ce que nous disent les souris... *Med Sci* 1998 (sous presse).
43. Hoek A, Schoemaker J, Drexhage HA. Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. *Endocr Rev* 1997; 18: 107-34.
44. Franks S, Gharani N, Waterworth D, Batty S, White D, Williamson R, McCarthy M. The genetic basis of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 1997; 12: 2641-8.

TIRÉS À PART

D. Monniaux.

Summary

Follicular atresia, a programmed wastage

In ovaries of mammals, an intense loss of germinal cells occurs by follicular atresia throughout the life. In granulosa cells of antral follicles, early stages of atresia are characterized by an increase in apoptotic rate, a decrease in proliferation rate and the loss of P450 aromatase expression. In addition, an increase in insulin-like growth factor binding proteins (particularly IGFBP-2) expression by follicular cells is observed. These early changes might be, at least for some of them, the cause of later changes such as the loss of gonadotropin responsiveness of follicular cells. A follicle dies when some essential factors supporting its development are lacking. In small preantral follicles, growth factors and cytokines such as Steel factor are limitant for follicular growth. Terminal follicular development is strictly dependent upon gonadotropin (FSH, then LH in the final preovulatory stage) supply, but growth factors such as IGF-I play also important roles in amplifying gonadotropin action in follicular cells. When the endocrine and/or paracrine environment is inadequate for the antral follicle, apoptosis is triggered in granulosa cells. Main effectors of apoptosis are caspases which are activated by two ways in granulosa cells, the one involving Fas/TNF- α receptor, the other involving factors of the Bcl-2 family. Transcriptional events, such as increase in p53, Bax, caspases and decrease in Bcl-xL expression, enhance these processes in granulosa cells.

Why, when two follicles of the same size are submitted to the same endocrine environment, one will develop while the other will become atretic, is an essential question to answer. Two hypotheses are proposed, the first deterministic, the second stochastic. It is suggested that some of the primordial follicles which begin to grow are predetermined to degenerate in the preantral stage. By contrast, the choice of the ovulatory follicle (and atresia of the others) occurs partly at random at each ovarian cycle. It results in selection of the «best» follicle at a given time and in a given endocrine environment. Determination of ovulation rate and, consequently, success of reproduction are tightly related to the programmed wastage of follicles which is atresia.