

LES FOLLICULES OVARIENS POLYOVOCYTAIRES : PHYSIOLOGIQUES ET PAS SI RARES

POLYOVULAR OVARIAN FOLLICLES: PHYSIOLOGICAL AND NOT SO RARE

Par Karine REYNAUD^(1,*), Sandra THOUMIRE⁽¹⁾, Marie SAINT-DIZIER⁽¹⁾,
Zahid TAHIR⁽¹⁾, Martine CHEBROUT⁽¹⁾ et Sylvie CHASTANT-MAILLARD^(1,2)
(Communication présentée le 7 avril 2011)

RÉSUMÉ

Dans les ovaires des mammifères, la très grande majorité des follicules ne contient qu'un seul ovocyte. Mais, dans la plupart des espèces, certains follicules contiennent plusieurs ovocytes : on parle alors de follicules polyovocytaires ou multiovocytaires. Leur fréquence varie entre <0.1 % et 14% des follicules totaux et ils peuvent contenir de 2 à 17 ovocytes (et même plus de 100 chez certains marsupiaux). Trois hypothèses pourraient expliquer leur formation : la division d'un ovocyte ayant initialement plusieurs noyaux, la fusion de plusieurs follicules différents ou la non-séparation de plusieurs ovocytes au moment de la formation des follicules primordiaux. Cette dernière hypothèse semble la plus probable. La destinée de ces follicules a été encore peu explorée et ils ont été longtemps considérés comme pathologiques. Des travaux menés notamment chez le porc et le chien montrent que ces follicules polyovocytaires peuvent grandir, atteindre le stade préovulatoire et ovuler. Cependant, tous les ovocytes d'un même follicule ne sont pas équivalents. L'observation des ovocytes après ponction du follicule suggère qu'un seul ovocyte semble de bonne qualité morphologique, tandis que les autres sont à des stades de dégénérescence plus ou moins avancés. La régulation du nombre des follicules polyovocytaires est peu connue et il existe des données contradictoires sur les effets de l'âge, des gonadotrophines et des stéroïdes. Leur fréquence peut être augmentée par des traitements à effets œstrogéniques ou par l'action de perturbateurs endocriniens. Chez la souris, le contrôle est également génétique. Les mécanismes conduisant à la formation des follicules polyovocytaires restent à explorer et l'étude du fonctionnement de ces follicules pourrait contribuer à une meilleure connaissance du dialogue ovocyte-follicule.

Mots-clés : Ovaire, follicule, polyovocyttaire, chien.

(1) UMR 1198 INRA-ENVA, Biologie du Développement et Reproduction, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort

(2) École Nationale Vétérinaire de Toulouse, Pathologie de la reproduction, 23 Chemin des Capelles, BP 87614, 31076 Toulouse cedex 3

* Correspondance : K. Reynaud, Tél : 01.43.96.70.97 ; Fax : 01.43.96.71.30 ; Email : kreynaud@vet-alfort.fr

SUMMARY

In mammalian ovaries, the vast majority of follicles contain only one oocyte. However, follicles containing several oocytes, or polyovular follicles, are also found in most species. Their frequency ranges from <0.1% to 14% of the total number of follicles, and they can contain from 2 to 17 oocytes (or even 100 in certain marsupials). Three hypotheses have been proposed to explain their occurrence: division of an oocyte initially containing several nuclei, fusion of several different follicles, or non-separation of several oocytes at the time of the formation of the primordial follicles. This latter hypothesis seems the most likely. The fate of these follicles has not been studied extensively, and for a long time they were considered as pathological. Studies conducted in pigs and dogs have shown that these polyovular follicles can grow, reach the preovulatory stage, and ovulate. However, all the oocytes in a single follicle are not equal. The examination of oocytes retrieved from a single follicle suggests that only one oocyte shows good morphological characteristics, whereas the others are at various stages of more or less advanced degeneration. The regulation of the number of polyovular follicles is still poorly understood and the data on the effects of age, gonadotropins, and steroids is contradictory. Their frequency can be increased by using treatments with estrogenic effects, or endocrine disruptors. In mice, the control is also genetic. The mechanisms leading to the formation of polyovular follicles remain to be explored, and the study of the functioning of these particular follicles would improve our understanding of the oocyte-follicle dialogue.

Key words: ovary, follicle, polyovular, dog.

INTRODUCTION

Dans l'ovaire de mammifère, les follicules contiennent généralement un seul ovocyte. Mais, dans la plupart des espèces, des follicules particuliers, incluant plusieurs ovocytes, peuvent être observés : on parle de follicules polyovocytaires ou multiovocytaires.

Dès 1827, Van Baer décrivait ce type de follicules chez le chien et le porc. À cette époque, les nombreux ovocytes, parfois dégénérés, de ces follicules étaient qualifiés de «corps de Call et Exner», terme décrivant des rosettes de cellules de granulosa disposées autour d'une cavité remplie de liquide.

Ces follicules polyovocytaires ont été ensuite décrits chez de nombreux marsupiaux et mammifères et jusqu'en 1920 environ, chacune de leur découverte était l'occasion d'une publication. Ces follicules étaient à l'époque considérés comme pathologiques.

Selon les espèces, leur fréquence varie entre moins de 0,1 % (rat, chèvre, brebis, vache) et 14% (chien) des follicules totaux et au sein d'une même espèce, elle est très variable entre individus. Ces follicules peuvent contenir de 2 à 17 ovocytes (**tableau 1**). Leur nombre est le plus important chez la chienne dont 70% des ovaires contiennent un follicule polyovocyttaire (Payan-Carreira & Pires, 2008). Dans l'espèce humaine, Gougeon (1981) a observé des follicules polyovocytaires dans 85% des ovaires d'un échantillon de 117 femmes.

ORIGINE DES FOLLICULES POLYOVOCYTAIRES

Trois hypothèses peuvent expliquer la formation des follicules polyovocytaires : la division d'un ovocyte possédant au départ

plusieurs noyaux, la fusion de plusieurs follicules ou la non-séparation de plusieurs ovocytes au moment de la formation des follicules primordiaux.

L'hypothèse d'une division, dans un même follicule, d'un ovocyte polynucléaire est peu probable car dans les ovaires des espèces présentant de très nombreux ovocytes polynucléaires, aucun follicule polyovocyttaire n'est observé. De même, certains ovaires présentant de nombreux follicules polyovocytaires ne montrent aucun ovocyte polynucléaire (chat ; Hartman 1926).

La fusion de plusieurs follicules, et notamment de follicules primordiaux fusionnant avec de plus gros follicules, a été également proposée (Loeb, 1917). Cependant, la fusion de follicules antraux n'a jamais été décrite, ce qui tend à indiquer que les follicules polyovocytaires sont formés tôt au cours de la folliculogénèse.

Enfin, l'hypothèse d'une séparation imparfaite de plusieurs ovocytes à partir des nids d'ovogonies est la plus suivie par les chercheurs. Les cellules folliculaires, au lieu d'isoler chaque ovogonie dans un follicule primordial, en engloberaient accidentellement plusieurs (Honoré 1901). Les follicules polyovocytaires seraient donc des «accidents de développement» : lorsque les ovocytes ne trouvent pas leur complément en cellules de granulosa, ils forment des structures persistantes rassemblant plusieurs ovocytes (Papadaki 1978). La grande densité des follicules primordiaux ne peut cependant pas expliquer la formation des follicules polyovocytaires, car chez la brebis, dont le cortex ovarien montre des follicules primordiaux organisés de façon très dense, l'incidence des follicules polyovocytaires est très faible (Telfer & Gosden, 1987).

L'incidence des follicules polyovocytaires aurait aussi une composante génétique héréditaire : tandis que certaines lignées de

| Espèce | Fréquence (Nb polyovocytaires / nombre total de follicules) | Nombre maximum d'ovocytes par follicule | Référence |
|---------------------|---|---|--|
| Opossum (marsupial) | | > 100 ovocytes | Hartman 1926 |
| Souris | 0.6% des follicules (lignée C58) 2,7% (lignée Swiss) | Max 6 ovocytes | Fekete 1950 Iguchi et al. 1990 |
| Rat | Rare (<0.1%) | | Lane 1938 Davis & Hall, 1950 |
| Hamster | <1% | Max 10 ovocytes | Bodemer & Warnick, 1961a Kent 1962 |
| Cochon d'inde | 0.5 – 1.5 % | | Collins & Kent, 1964 |
| Lapin | Rare (<0.1%) | Max 24 ovocytes | Honoré 1901 Al-Mufti et al. 1988 |
| Porc | 1,4% | Max 5 ovocytes | Greenwald & Moor, 1989 Stankiewicz et al. 2009 |
| Chèvre | Rare (<0.1%) | Max 9 ovocytes | Lucci et al. 1999 |
| Brebis | Rare (<0.1%) | | Hadek 1958 Telfer & Gosden, 1987 |
| Chat | 4% | Max 8 ovocytes | Hartman 1926 Telfer & Gosden, 1987 |
| Chien | 14% | Max 17 ovocytes | Andersen & Simpson, 1973 Telfer & Gosden, 1987 McDougall et al. 1997 |
| Vache | Rare (<0.1%) | | Nuttinck et al. 1993 |
| Primates | 2% | Max 12 ovocytes | Hartman 1926 Telfer & Gosden, 1987 |
| Femme | 0.1–3% | Max 12 ovocytes | Arnold 1912 ; Gougeon 1981 Telfer & Gosden, 1987 |

Tableau 1 : Fréquence des follicules polyovocytaires selon les espèces et nombre maximal d'ovocytes observés par follicule.

souris présentent rarement ce type de follicules, dans d'autres (notamment la lignée C58), tous les animaux en possèdent (Fekete 1950).

CARACTÉRISTIQUES DES FOLLICULES POLYOVOCYTAIRES ET DE LEURS OVOCYTES

Morphologie des follicules polyovocytaires

Les follicules polyovocytaires peuvent être arrondis ou allongés et sont deux à trois fois plus gros que des follicules monoovocytaires de même stade (Telfer & Gosden, 1987). Cette différence n'est pas expliquée par le volume de liquide folliculaire, qui est équivalent entre les follicules mono- et polyovocytaires au moins chez la femme (Dandekar *et al.* 1988). C'est en fait le

«volume» d'ovocytes et de cellules de granulosa qui est plus important. Dans les follicules polyovocytaires antraux, il n'a jamais été décrit de follicule avec deux antrums différents.

Caractéristiques du liquide folliculaire

Dans le liquide folliculaire des follicules polyovocytaires, la concentration en œstradiol est deux fois plus importante que dans celui des follicules monoovocytaires, ce qui pourrait être lié au nombre plus important de cellules de granulosa, mais aussi des ovocytes : l'ovocyte intervient en effet dans le contrôle de la stéroïdogenèse folliculaire (Vanderhyden *et al.* 1998). En parallèle, la concentration en progestérone est plus faible dans les fluides collectés dans des follicules polyovocytaires d'ovaires de truie (Stankiewicz *et al.* 2009).

Nombre et qualité des ovocytes

La majorité des follicules polyovocytaires sont bi-ovocytaires (**figure 1**) et les follicules ayant plus de deux ovocytes sont plus rares. Ainsi, chez le furet, les pourcentages de follicules ayant 2, 3, 4, 5, 6 et plus de 6 ovocytes sont respectivement de 74%, 18%, 2%, 3%, 2% et 1% (Mainland 1928). Les ovocytes peuvent apparaître alignés : chez l'opossum, Hartman (1926) décrit ainsi un follicule contenant sept ovocytes en un arrangement linéaire. Deux types d'organisation des ovocytes sont observés : les ovocytes sont en contact direct entre eux (un cumulus unique englobant plusieurs ovocytes) ou bien séparés par des cellules de granulosa, chacun étant entouré de son propre cumulus (Arnold, 1912 ; Hartman 1926). Ces organisations sont rencontrées respectivement chez 37 et 63% des follicules chez le furet (Mainland 1928). Lorsque deux ovocytes sont en contact, des interdigitations cytoplasmiques ovocyte-ovocyte sont observées. Ces contacts très proches ovocyte/ovocyte sont du même type que ceux entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa suggérant que les ovocytes, entre eux, peuvent avoir une coopération métabolique (Papadaki 1978).

Dans les follicules primaires bi-ovocytaires, trois types de cas sont observés : dans 10% seulement de ces follicules, les deux ovocytes sont d'un diamètre normal, identique à celui d'un ovocyte observé dans un follicule mono-ovocyttaire ($34,4 \pm 0,6 \mu\text{m}$) ; dans 45%, un des deux ovocytes est de diamètre normal et le second, d'un diamètre plus faible, de 20 à 22 μm ; dans les 45% restants, les ovocytes sont tous les deux de petite taille, présentant un diamètre d'environ 25 μm (Al-Mufti *et al.* 1988). À partir de ses observations de tels follicules chez l'opossum et le macaque, Hartman (1926) appelle ainsi le plus gros ovocyte « l'ovocyte chef » et le plus petit « l'ovocyte accessoire ». Quand les ovocytes sont très nombreux (plus de trois ovocytes par follicule), leur taille est inférieure à celles des ovocytes de follicules bi ou tri-ovocytaires (Al-Mufti *et al.* 1988).

Au stade préantral, les ovocytes de plus grande taille des follicules polyovocytaires ont provisoirement un retard de croissance et sont plus hétérogènes que dans un follicule monoovocyttaire. Au stade antral, ils atteindront, avec un peu de retard, la même taille que l'ovocyte des follicules mono-ovocytaires et acquerront la capacité à reprendre leur méiose (Al-Mufti *et al.* 1988). La taille de l'ovocyte est liée à sa position dans le follicule : s'il y a trois ovocytes, le plus gros est situé au centre et a un développement normal, l'ovocyte intermédiaire/périphérique est inclus au sein des cellules de la granulosa du bord de l'antrum, tandis que l'ovocyte « mineur » est localisé contre la lame basale. Les ovocytes situés en périphérie sont plus petits, se développent moins vite et n'atteignent pas la taille maximale (Al-Mufti *et al.* 1988 ; Telfer & Gosden, 1987). La différence de taille entre le plus gros ovocyte et le plus petit, dans les ovaires de truie, est en moyenne de 10 à 20% (Stankiewicz *et al.* 2009). De plus, les gros ovocytes sont capables de reprendre leur méiose pour



Figure 1 : Coupe histologique d'un follicule polyovocyttaire de chien au stade pré-antral contenant deux ovocytes (coloration hématoxyline/éosine).

atteindre le stade métaphase II et leur cumulus peut s'expanser. Les ovocytes périphériques ne montrent un cumulus que partiellement expansé. Ceux situés contre la lame basale ne reprennent pas leur méiose et ne présentent aucune expansion du cumulus (Al-Mufti *et al.* 1988).

Chez le lapin, la vitesse de mucification du cumulus dans les ovocytes de follicules mono- et polyovocytaires est équivalente (Al-Mufti *et al.* 1988). Un ovocyte de bonne qualité (grand diamètre, position centrale) de follicule polyovocyttaire semble donc avoir les mêmes qualités qu'un ovocyte de follicule monoovocyttaire (Al-Mufti *et al.* 1988).

Après ponction folliculaire chez des patientes en vue d'une fécondation *in vitro* (FIV), les ovocytes d'un même follicule polyovocyttaire (76 follicules polyovocytaires ponctionnés) étaient à des stades de maturité différents (cumulus mucifié/intermédiaire/cumulus immature non mucifié) dans 63% des follicules (Dandekar *et al.* 1988). Les ovocytes issus des follicules mono-ovocytaires et les meilleurs ovocytes (qualité morphologique) des follicules polyovocytaires avaient la même capacité à la fécondation (Dandekar *et al.* 1988).

Dans l'espèce canine, avant comme après le pic de LH, les ovocytes d'un même follicule présentent des critères morphologiques (diamètre, couleur du cytoplasme) et fonctionnels (score de mucification) différents (**figure 2**) (Reynaud *et al.* 2009). Le plus souvent, un des ovocytes est de plus grand diamètre, présente un cytoplasme homogène et sombre, un cumulus composé de nombreuses cellules, autant de critères en faveur de sa meilleure qualité. Si parfois deux ovocytes semblent de bonne qualité, un seul présente un cumulus totalement expansé, tandis que le cumulus de l'autre ne l'est que partiellement ou pas du tout (Reynaud *et al.* 2009). Lorsque les ovocytes sont à des stades différents de développement, les cellules de la granulosa du follicule sont au stade d'évolution correspondant à l'ovocyte le plus

développé (Hartman 1926). C'est pour cette raison, selon Hartman (1926), que même si un des ovocytes dégénère, le follicule survit et continue à se développer.

Chez des souris de la lignée C 58, lorsque les ovocytes atteignent le stade métaphase II avant fécondation, les anomalies cytogénétiques ne sont pas plus fréquentes dans les ovocytes issus de follicules polyovocytaires (Jagiello & Ducayen, 1973). Après fécondation, la capacité des ovocytes issus de follicules polyovocytaires à permettre le développement embryonnaire n'est pas vraiment décrite. Pour avoir une réponse précise, il faudrait ponctionner un très grand nombre de follicules, puis, pour les follicules polyovocytaires, mettre en maturation et fécondation *in vitro* séparément les ovocytes de grand diamètre considérés comme de bonne qualité et les petits ovocytes. Dans l'espèce porcine, Stankiewicz *et al.* (2009) ont montré que les ovocytes prélevés dans des follicules polyovocytaires pouvaient être fécondés, mais que le taux de développement au stade blastocyste était significativement inférieur après fécondation des ovocytes issus de follicules polyovocytaires, par rapport aux embryons issus de follicules monoovocytaires. Cependant, dans cette expérience, les ovocytes de grand diamètre et de bonne morphologie n'ont pas été séparés des ovocytes de faible diamètre : en conséquence, la capacité réelle des deux types d'ovocytes provenant d'un follicule polyovocytairre à permettre le développement d'un embryon est encore inconnue.

Comment expliquer une telle variabilité de taille et de qualité entre des ovocytes qui, pourtant, au stade antral, baignent dans

le même fluide folliculaire ? Ils pourraient être différents dans leurs qualités/défauts intrinsèques, leur capacité de croissance, leur sensibilité aux facteurs de croissance... De même, il est étonnant que, dans un follicule polyovocytairre à antrum, certains ovocytes atteignent leur diamètre maximal et induisent la formation d'un cumulus tandis que d'autres seront de plus faible diamètre et resteront contre la lame basale, au milieu des cellules de granulosa murales. L'étude de molécules exprimées précocément et intervenant dans le dialogue ovocyte-cumulus telles que BMP-15 et GDF-9 permettraient certainement d'approfondir les mécanismes de croissance ovocytairre, formation du cumulus et mucification. Il est également possible que les ovocytes soient en compétition pour les nutriments (Kennedy 1924).

DESTINÉE DES FOLLICULES POLYOVOCYTAIRES ET DE LEURS OVOCYTES

Le devenir des follicules polyovocytaires est difficile à explorer. Ces follicules sont-ils capables de permettre à un ovocyte de croître et maturer jusqu'à l'ovulation, puis la fécondation ? Au plan fonctionnel, chez le hamster, les follicules polyovocytaires sont capables de répondre aux gonadotrophines exogènes (Bodemer & Warnick, 1961b) et de passer du stade pré-antral à antral. Selon les auteurs et les espèces, la « destinée » des follicules polyovocytaires varie : pour certains, tous les follicules polyovocytaires entrent en atresie (Loeb 1917, Hartman 1926 ; Lane 1938), alors que pour d'autres, les taux d'atresie apparaissent similaires entre follicules mono- et polyovocytaires (Al-Mufti *et al.* 1988 ; Gougeon 1981). Certains follicules peuvent se développer et ovuler chez le rat (Davis & Hall, 1950) et chez le hamster (Bodemer & Warnick, 1961b). Il est certain et décrit chez de nombreuses espèces que les follicules polyovocytaires peuvent atteindre le stade antral. Il est même possible que le nombre de follicules polyovocytaires atteignant l'ovulation soit sous-estimé : en effet, s'il existe une compétition entre les ovocytes d'un même follicule et qu'un seul ovocyte survit, le follicule d'origine sera jugé mono-ovocytairre, même si ce n'était pas le cas au début de son développement.

Dandekar *et al.* (1988) ont montré, dans l'espèce humaine, que les follicules polyovocytaires étaient capables d'atteindre le stade préovulatoire car, après des ponctions folliculaires pour fécondation *in vitro* (898 follicules), des follicules polyovocytaires étaient observés chez 24% des patientes et, chez ces femmes, environ 8% des follicules ponctionnées étaient polyovocytaires. Néanmoins, ces résultats doivent être considérés avec prudence car la ponction échoguidée peut parfois entraîner l'aspiration de plusieurs follicules en même temps.

Dans l'espèce canine, plusieurs auteurs ont également observé que certains follicules préovulatoires

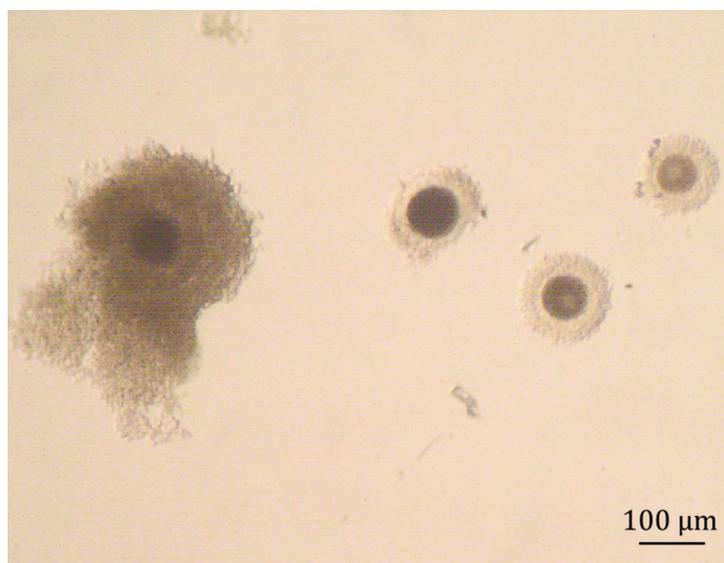


Figure 2 : Cohorte d'ovocytes issus d'un follicule polyovocytairre chez la chienne. La ponction folliculaire a eu lieu avant le pic de LH. Les quatre ovocytes sont très différents quant à leur taille, la couleur et l'homogénéité de leur cytoplasme, et au nombre de couches de cellules de granulosa qui les entourent. De gauche à droite : l'ovocyte 1 est de bonne qualité (grand diamètre, cytoplasme homogène et sombre, nombreuses couches de cellules de granulosa). L'ovocyte 2 a également une bonne morphologie, mais est pratiquement entièrement dénudé, sans cellules de granulosa. Les ovocytes 3 et 4 sont de diamètre plus petit, avec un cytoplasme clair (l'accumulation des lipides, qui a lieu au cours de la maturation intra-folliculaire de l'ovocyte, n'est pas encore achevée).

COMMUNICATION

étaient polyovocytaires (Andersen & Simpson, 1973; Reynaud *et al.* 2009). Si des follicules sont ponctionnés avant l'ovulation (Reynaud *et al.* 2009), on constate que :

- des follicules polyovocytaires de plus de 2 mm de diamètre (pour un diamètre ovulatoire de 6 mm) peuvent être observés chez plus de la moitié (55%) des chiennes,
- ces follicules représentent 4 à 5,5% du total des follicules de diamètre supérieur à 2 mm,
- ces follicules peuvent contenir entre deux et 13 ovocytes.

Dans l'espèce canine, les follicules polyovocytaires sont donc capables d'attendre le stade préovulatoire, en nombre non négligeable.

Quant à leur capacité à ovuler, chez la souris, Fekete (1950) a observé une fois un nombre d'ovocytes ovulés supérieur au nombre de corps jaunes présents sur les ovaires. Dans l'espèce canine, au moins deux travaux ont également décrit un nombre supérieur d'ovocytes ou d'embryons récoltés par rapport au nombre de corps jaunes (Bysted *et al.* 2001; Reynaud *et al.* 2005). Cependant, l'évaluation du rapport entre le nombre d'ovocytes ovulés et le nombre de corps jaunes peut être biaisée positivement ou négativement : le nombre de corps jaunes peut être sous-estimé lorsqu'il est évalué par simple observation macroscopique en l'absence de comptage sur coupes histologiques d'ovaire. Inversement, la technique de rinçage de l'oviducte peut aboutir à une sous-estimation du nombre d'ovocytes ovulés car certains ovocytes ayant atteint le stade préovulatoire peuvent ne pas être suffisamment mucifiés pour être expulsés du follicule (cumulus encore compact) et ne seront donc pas quantifiés après rinçage tubaire.

Chez le lapin, un nombre de fœtus ou de nouveau-nés supérieur à celui de corps jaunes a été observé : Brambell & Mills (1947) ont analysé plus de 2000 portées et ont conclu que 0,23% des follicules ayant ovulé devaient être polyovocytaires et que ce type d'ovulation concernait 1,3% des portées. Néanmoins, outre une approximation sur le nombre de corps jaunes, cette situation pourrait également s'expliquer par une division des embryons après la fécondation (gémellité monozygotique).

Les données disponibles montrent que les follicules polyovocytaires soient capables d'atteindre le stade préovulatoire et d'ovuler.

RÉGULATION ET INDUCTION DES FOLLICULES POLYOVOCYTAIRES

Influence de l'âge

Les effets de l'âge sur la fréquence des follicules polyovocytaires ont été analysés par plusieurs auteurs mais les résultats sont contradictoires et varient selon les espèces.

Chez plusieurs espèces, l'opossum (Hartman 1926), le rat (Davis & Hall, 1950), le hamster (Dawson 1951 ; Bodemer &

Warnick, 1961a), la chèvre (Lucci *et al.* 1999) et la truie (Stankiewicz *et al.* 2009), les follicules polyovocytaires sont plus nombreux pendant la période fœtale ou prépubère que chez l'adulte. Cette observation est cohérente avec l'hypothèse que les follicules polyovocytaires apparaissent très tôt, au moment de la formation des follicules primordiaux. Chez la chienne, les résultats sont contradictoires : selon McDougall *et al.* (1997), l'âge n'aurait aucun effet mais Telfer & Gosden (1987) observent 14% de follicules polyovocytaires chez les jeunes chiennes d'un à deux ans contre 5 % seulement chez celles âgées de sept à onze ans. Inversement, chez le macaque, aucun effet significatif de l'âge n'a été rapporté (Koering 1983).

Dans l'espèce humaine, Gougeon (1981) n'a pas observé d'effet de l'âge sur le nombre de follicules polyovocytaires, alors que Bacsich (1949) a décrit, chez le nouveau-né et l'enfant prépubère, un taux plus important de follicules polyovocytaires que chez la femme adulte. De même, concernant uniquement les gros follicules ponctionnés pour une FIV, Dandekar *et al.* (1988) ont montré que le pourcentage de femmes ayant des follicules polyovocytaires diminuait avec l'âge (de 47% chez les femmes âgées de 20 à 29 ans à 22% chez les femmes de 30-40 ans et 9% au-delà de 40 ans).

Effets des hormones

Observations au cours du cycle hormonal

Chez la chèvre (Harrison 1948) et les primates (Graham et Bradley, 1971), les follicules polyovocytaires sont plus nombreux en oestrus/phase folliculaire qu'en phase lutéale. Pour Papadaki (1978), les gonadotrophines stimuleraient leur recrutement.

Par contre, chez femme, Gougeon (1981) n'observe pas d'effet du statut hormonal (grossesse, jour du cycle, prise de contraceptifs, administration d'inducteurs de l'ovulation) sur la fréquence des follicules polyovocytaires : ces follicules étant probablement formés très tôt au cours de la folliculogénèse, il est logique que des facteurs gonadotropes n'influencent pas leur quantité.

Effets de traitements hormonaux

Chez les rongeurs, Bodemer et Warnick (1961b) et Kent (1959) ont réduit le nombre de follicules polyovocytaires chez les rongeurs par un traitement par les gonadotrophines et l'œstradiol pendant la période prépubère. Chez la souris (Kent 1960) et le cobaye (Collins & Kent, 1964), l'observation des ovaires pendant les premières semaines de vie postnatale (3-10 semaines) ont conduit les auteurs à penser que la FSH favoriserait la formation d'ovocytes polynucléés, tandis que LH favoriserait les follicules polyovocytaires.

Alors que chez la femme, les traitements stéroïdiens n'ont pas d'effet significatif sur la fréquence des follicules polyovocytaires (Gougeon 1981), les contraceptifs pourraient au contraire altérer leur nombre (Kennedy & Donahue 1969).

Chez les primates, un traitement par le diéthylstilbestrol (DES) pendant la vie adulte stimulerait la formation de follicules primordiaux polyovocytaires et jusqu'à 30% des follicules primordiaux/primaires présentent plusieurs ovocytes (Graham & Bradley, 1971). Néanmoins, ce type d'observation est surprenante si l'on considère que les follicules mono- ou poly-ovocytaires se forment pendant la vie fœtale uniquement. Dans cette étude, les auteurs proposent que le DES agisse en induisant l'agrégation de plusieurs follicules.

Chez la souris, la formation des premiers follicules primordiaux est observée juste après la naissance. Pendant cette phase néonatale, l'administration de DES multiple l'incidence des follicules polyovocytaires par 50 (Iguchi *et al.* 1990). Certains follicules contiennent jusqu'à 23 ovocytes ! Leur induction serait accompagnée d'une augmentation de l'expression de l'inhibine alpha et d'une réduction de la dégénérescence ovocytaire (Kim *et al.* 2009). Les follicules polyovocytaires induits par le DES sont capables de répondre aux stimulations par des gonadotrophines, mais l'aspect du cumulus après ovulation est anormal et les capacités de fécondation sont réduites (Iguchi *et al.* 1991).

Le traitement par la génistéine, un phyto-œstrogène à action faiblement œstrogénique utilisé habituellement comme pesticide, réduit l'apoptose des ovocytes et empêche la disjonction des groupes de cellules germinales ce qui expliquerait l'augmentation très importante et dose-dépendante du nombre de follicules polyovocytaires observés dans les ovaires des souris traitées (Jefferson *et al.* 2002).

Causes génétiques

Outre les causes endocrines, certaines modifications génétiques augmentent la fréquence des follicules polyovocytaires. La lignée de souris C58/J présente ainsi de nombreux follicules polyovocytaires (Fekete 1950). D'autre part, récemment, la présence de nombreux follicules polyovocytaires a été décrite chez des rongeurs ayant subi une modification génétique induite (surexpression ou invalidation de gène) :

- les souris transgéniques surexprimant l'inhibine alpha (McMullen *et al.* 2001),
- les souris ayant une invalidation ciblée du gène *Dmrt4* (Balciuniene *et al.* 2006),
- les souris invalidées pour le récepteur de la FSH (Yang *et al.* 2003),
- l'invalidation ciblée du gène *Germ Cell Nuclear Factor* (GCNF) dans un modèle de souris qui ont présenté des follicules biovocytaires en relation avec l'expression aberrante des gènes *BMP* (*bone morphogenetic protein 15*) et *GDF-9* (*growth differentiation factor 9*) (Lan *et al.* 2003)

- les souris chez lesquelles les gènes *BMP-15* et *GDF-9* ont été invalidés et dont les croisements montrent l'influence de la dose normale de ces allèles sur la destinée des ovocytes pendant la folliculogénèse et la période péri-ovulatoire (Yan *et al.* 2001)
- les souris ayant une inhibition de l'expression du gène *Smad2* (Bristol-Gould *et al.* 2005)
- les souris transgéniques avec délétion de l'enzyme T-synthase (absence de Core-1 O-glycanne) : l'apparition des follicules polyovocytaires est plus tardive, au stade préantral, du fait de la formation de ponts entre follicules (Williams & Stanley, 2008).

Aucun lien direct n'a été montré entre la fréquence des follicules polyovocytaires et la fertilité. Chez de nombreuses espèces, une forte proportion de follicules polyovocytaires n'est pas associée à une fertilité plus élevée. De même, chez la femme, le pourcentage de grossesses gémellaires augmente régulièrement avec l'âge (Gougeon 1981).

CONCLUSION

La présence des follicules polyovocytaires dans les ovaires des mammifères est un phénomène très anciennement décrit. Leur fréquence varie beaucoup selon les espèces et leur présence n'est pas une situation pathologique, mais plutôt un « polymorphisme » naturel. Ils ont été à nouveau décrits chez la souris dans de récentes publications car ils peuvent être induits par des mutations génétiques et certains perturbateurs endocriniens. Ces follicules sont formés très précocement dans l'ovaire, au moment de la fragmentation des cystes et de la formation des follicules primordiaux, puis ont une croissance relativement normale. Les follicules sont donc polyovocytaires depuis leur formation et ce stade de fragmentation des cystes semble déterminant. Par contre, les ovocytes qu'ils contiennent ont une évolution différente et ne sont pas au même stade de maturité. Certains sont restés inclus dans la granulosa, sont de taille inférieure au diamètre moyen des ovocytes et n'ont pas induit la formation d'un cumulus, alors que d'autres ont induit un cumulus et sont de taille normale. Quels enseignements peut-on tirer de l'asynchronisme de croissance des différents ovocytes dans un même follicule, alors que ces ovocytes bénéficient du même microenvironnement folliculaire et qu'ils sont sans doute issus de la même ovogonie ? Compte tenu des résultats de l'invalidation, chez la souris, de gènes codant des protéines, comme *BMP-15*, *TGF-9*, de la superfamille des facteurs de transformation bêta, leur détection par immunohistochimie dans des ovocytes isolés de ces follicules polyovocytaires, pourrait constituer une approche pour mettre en évidence les facteurs responsables de la formation du cumulus.

REMERCIEMENTS

Un grand merci à Danielle Monniaux, Stéphane Fabre et Alain Gougeon pour toutes les suggestions / discussions sur ce sujet passionnant des follicules polyovocytaires.

Merci à toute l'équipe du CERCA (Centre d'Etudes en Reproduction des Carnivores) pour leur collaboration pendant les suivis de reproduction de nos animaux. Merci au Dr vétérinaire Palaz, ainsi qu'aux Drs vétérinaires Abeille, Fontanel, Simon-Mennerat, Stofleth et Vaché pour leur aide précieuse concernant la collecte du matériel biologique.

BIBLIOGRAPHIE

- Al-Mufti, W., Bomsel-Helmreich, O., Christidès, J.P. 1988. Oocyte size and intra-follicular position in polyovular follicles in rabbits. *J Reprod Fertil.* 82:15-25.
- Andersen, A.C., Simpson, M.E. 1973. *The Ovary and the Reproductive Cycle of the Dog (Beagle)*. Geron-X Inc., Los Altos, California.
- Arnold, L. 1912. Adult human ovaries with follicles containing several oocytes. *Anat Rec.* 6: 413-422.
- Bacsich, P. 1949. Multinuclear ova and multiovular follicles in the young human ovary and their probable significance. *J Endocrinol.* 6: i
- Balciuniene, J., Bardwell, V.J., Zarkower, D. 2006. Mice mutant in the DM domain gene *Dmrt4* are viable and fertile but have polyovular follicles. *Mol Cell Biol.* 26:8984-8991.
- Bodemer, C.W. & Warnick, S. 1961a. Polyovular follicles in the immature hamster ovary. I: Polyovular follicles in the normal intact animal. *Fertil Steril.* 12: 159-169.
- Bodemer, C.W. & Warnick, S. 1961b. Polyovular follicles in the immature hamster ovary. II: The effects of gonadotropic hormones on polyovular follicles. *Fertil Steril.* 12: 353-364.
- Brambell, F.W. & Mills, I.H. 1947. Studies on sterility and prenatal mortality in wild rabbits; the loss of ova before implantation. *J Exp Biol.* 24:192-210.
- Bristol-Gould, S.K., Hutten, C.G., Sturgis, C., Kilen, S.M., Mayo, K.E., Woodruff, T.K. 2005. The development of a mouse model of ovarian endosalpingiosis. *Endocrinology* 146: 5228-5236.
- Bysted, B.V., Dieleman, S.J., Hyttel, P., Greve, T. 2001. Embryonic developmental stages in relation to the LH peak in dogs. *J Reprod Fertil Suppl.* 57: 181-186.
- Collins, D.C. & Kent, H.A. Jr. 1964. Polynuclear ova and polyovular follicles in the ovaries of young guinea pigs. *Anat Rec.* 148: 115-119.
- Dandekar, P.V., Martin, M.C., Glass, R.H. 1988. Polyovular follicles associated with human in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 49: 483-486.
- Davis, D.E. & Hal, O. 1950. Polyovuly and anovular follicles in the wild Norway rat. *Anat Rec.* 107: 187-192.
- Dawson, A.B. 1951. Histogenetic interrelationships of oocytes and follicle cells; a possible explanation of the mode of origin of certain polyovular follicles in the immature rat. *Anat Rec.* 110: 181-197.
- Fekete, E. 1950. Polyovular follicles in the C58 strain of mice. *Anat Rec.* 108: 699-707.
- Gougeon, A. 1981. Frequent occurrence of multiovular follicles and multinuclear oocytes in the adult human ovary. *Fertil Steril.* 35: 417-422.
- Graham, C.E. & Bradley, C.F. 1971. Polyovular follicles in squirrel monkeys after prolonged diethylstilboestrol treatment. *J Reprod Fertil.* 27: 181-185.
- Greenwald, G.S. & Moor, R.M. 1989. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. *J Reprod Fertil.* 87: 561-571.
- Hadek, R. 1958. Morphological and histochemical study on the ovary of the sheep. *Am J Vet Res.* 19: 873-881.
- Harrison, R.J. 1948. The changes occurring in the ovary of the goat during the estrous cycle and in early pregnancy. *J Anat.* 82: 21-48.
- Hartman, C.G. 1926. Polynuclear ova and polyovular follicles in the opossum and other mammals with special reference to the problem of fecundity. *Am J Anat.* 37:1-52.
- Honoré, C. 1901. Recherches sur l'ovaire de lapin. *Archives de Biologie Tome XVII*
- Iguchi, T., Fukazawa, Y., Uesugi, Y., Takasugi, N. 1990. Polyovular follicles in mouse ovaries exposed neonatally to diethylstilbestrol in vivo and in vitro. *Biol Reprod.* 43: 478-484.
- Iguchi, T., Kamiya, K., Uesugi, Y., Sayama, K., Takasugi, N. 1991. In vitro fertilization of oocytes from polyovular follicles in mouse ovaries exposed neonatally to diethylstilbestrol. *In Vivo* 5:359-363.
- Jagiello, G. & Ducayen, M. 1973. Meiosis of ova from polyovular (C58-J) and polycystic (C57 L-J) strains of mice. *Fertil Steril.* 24: 10-4.
- Jefferson, W.N., Couse, J.F., Padilla-Banks, E., Korach, K.S., Newbold, R.R. 2002. Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER) alpha expression and multioocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ERbeta-mediated and nonestrogenic actions. *Biol Reprod.* 67: 1285-1296.
- Kennedy, W.P. 1924. The Occurrence of Polyovular Graafian Follicles. *J Anat.* 58: 328-334.
- Kennedy, J.F. & Donahue, R.P. 1969. Binucleate human oocytes from large follicles. *Lancet* 12: 754-755.
- Kent, H.A. 1959. Reduction of polyovular follicles and polynuclear ova by oestradiol monobenzoate. *Anat Rec.* 134: 455-462.
- Kent, H.A. Jr. 1960. Polyovular follicles and multinucleate ova in the ovaries of young mice. *Anat Rec.* 137: 521-524.
- Kent, H.A. Jr. 1962. Polyovular follicles and multinucleate ova in the ovaries of young hamsters. *Anat Rec.* 143: 345-349.
- Kim, H., Nakajima, T., Hayashi, S., Chambon, P., Watanabe, H., Iguchi, T., Sato, T. 2009. Effects of diethylstilbestrol on programmed oocyte death and induction of polyovular follicles in neonatal mouse ovaries. *Biol Reprod.* 81: 1002-1009.
- Koering, M.J. 1983. Preantral follicle development during the menstrual cycle in the Macaca mulatta ovary. *Am J Anat.* 166: 429-443.
- Lan, Z.J., Gu, P., Xu, X., Jackson, K.J., DeMayo, F.J., O'Malley, B.W., Cooney, A.J. 2003. GCNF-dependent repression of BMP-15 and

GDF-9 mediates gamete regulation of female fertility. *EMBO J.* 22:4070-4081.

- Lane, C.E. 1938. Aberrant ovarian follicles in the immature rat. *Anat Rec.* 71: 243-247.
- Loeb, L. 1917. The conrescence of follicles in the hypotypical ovary. *Biol Bull.* 33: 187-195.
- Lucci, C.M., Amorim, C.A., Rodrigues, A.P., Figueiredo, J.R., Bão, S.N., Silva, J.R., Gonçalves, P.B. 1999. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. *Anim Reprod Sci.* 56: 223-236.
- Mainland, D. 1928. The Pluriovular Follicle, with reference to its occurrence in the Ferret. *J Anat.* 62: 139-158.
- McDougall, K., Hay, M.A., Goodrowe, K.L., Gartley, C.J., King W.A. 1997. Changes in the number of follicles and of oocytes in ovaries of prepubertal, peripubertal and mature bitches. *J Reprod Fertil Suppl.* 51: 25-31.
- McMullen, M.L., Cho, B.N., Yates, C.J., Mayo, K.E. 2001. Gonadal pathologies in transgenic mice expressing the rat inhibin alpha-subunit. *Endocrinology* 142: 5005-5014.
- Nuttinck, F., Mermillod, P., Massip, A., Dess, F. 1993. Characterization of in vitro growth of

bovine preantral ovarian follicles: A preliminary study. *Theriogenology* 39: 811-821.

- Papadaki, L. 1978. Binovular follicles in the adult human ovary. *Fertil Steril.* 29: 342-350.
- Payan-Carreira, R., Pires, M.A. 2008. Multioocyte follicles in domestic dogs: a survey of frequency of occurrence. *Theriogenology* 69: 977-982.
- Reynaud, K., Fontbonne, A., Marseloo, N., Thoumire, S., Chebrou, M., de Lesegno, C.V., Chastant-Maillard, S. 2005. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction* 130: 193-201.
- Reynaud, K., de Lesegno, C.V., Chebrou, M., Thoumire, S., Chastant-Maillard, S. 2009. Follicle population, cumulus mucification, and oocyte chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. *Theriogenology* 72: 1120-1131.
- Stankiewicz, T., Błaszczuk, B., Udała, J. 2009. A study on the occurrence of polyovular follicles in porcine ovaries with particular reference to intrafollicular hormone concentrations, quality of oocytes and their in vitro fertilization. *Anat Histol Embryol.* 38: 233-239.
- Telfer, E. & Gosden, R.G. 1987. A quantitative cytological study of polyovular follicles in

mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*). *J Reprod Fertil.* 81: 137-147.

- Vanderhyden, B.C. & Macdonald, E.A. 1998. Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis throughout follicular development. *Biol Reprod.* 59: 1296-12301.
- Von Baer, C.E. 1827. De ovis mammalium et hominis genesi. *Epistola Ad Acad Imper Sci Petropolitanam.* L Vossi, Leipzig.
- Williams, S.A. & Stanley, P. 2008. Mouse fertility is enhanced by oocyte-specific loss of core 1-derived O-glycans. *FASEB J.* 22: 2273-2284.
- Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F.J., Elvin, J.A., Carino, C., Prasad, S.V., Skinner, S.S., Dunbar, B.S., Dube, J.L., Celeste, A.J., Matzuk, M.M. 2001. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol.* 15:854-866.
- Yang, Y., Balla, A., Danilovich, N., Sairam, M.R. 2003. Developmental and molecular aberrations associated with deterioration of oogenesis during complete or partial follicle-stimulating hormone receptor deficiency in mice. *Biol Reprod.* 69: 1294-1302.