

Faits et arguments

# État actuel de la folliculogénèse in vitro chez la souris

## State of the art on in vitro folliculogenesis in mouse

C. Mazoyer<sup>a,b,c</sup>, B. Courbière<sup>a,c</sup>, B. Salle<sup>c</sup>, J. Smitz<sup>b</sup>, J. Lornage<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Unité Inserm 418, hôpital Debrousse, 29, rue Soeur-Bouvier, 69322 Lyon cedex 05, France

<sup>b</sup> Universitair Ziekenhuis Vrije Universiteit Brussel (UZ VUB), Laarbeeklaan, 101, 1090 Jette, Belgique

<sup>c</sup> Laboratoire de biologie de la reproduction et Cecos de Lyon, hôpital Édouard-Herriot, 8, avenue Rockefeller, 69373 Lyon cedex 08, France

Reçu le 18 février 2007 ; accepté le 9 juillet 2007

### Résumé

Les systèmes de culture folliculaire ont été développés dans le but de permettre la fécondation in vitro d'ovocytes issus de follicules prélevés immatures. Les techniques de folliculogénèse in vitro pourraient en particulier être appliquées en médecine de la reproduction, pour restaurer la fertilité des patientes ayant bénéficié d'une cryoconservation ovarienne. Plusieurs systèmes de culture, permettant la croissance in vitro de follicules de stades de développement précoces, ont été mis au point chez la souris et validés par des naissances de souriceaux viables. Certaines caractéristiques des systèmes de culture se sont révélées essentielles pour la réussite de la folliculogénèse in vitro : isolement des follicules à un stade déterminé, maintien de la morphologie folliculaire et apport de facteurs de croissances ou d'hormones. Ces méthodes de culture folliculaire ont permis une meilleure compréhension de la physiologie ovarienne, celle, notamment de la relation entre les facteurs endocrines ou paracrines et le développement du follicule. La technique de croissance folliculaire in vitro chez la souris est devenue un véritable outil biologique pour l'amélioration des techniques en reproduction comme pour les études toxicologiques.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

### Abstract

Follicle culture systems have been developed so as to achieve in vitro fertilization of oocytes coming from immature follicles. The in vitro folliculogenesis methods would be especially useful in reproductive medicine to restore fertility in women having undergone ovarian cryopreservation. Several culture systems allowing in vitro growth of small follicles have been developed in mouse. These have proven to be successful by the birth of healthy offsprings. Some elements determine the outcome of culture: follicle isolations at a defined stage of development, follicular morphology preservation, and supplementation of growth factors or hormones. Development of follicle culture in the mouse model led to a better understanding of ovarian physiology, in particular the relation between endocrine and paracrine factors on follicle development. The in vitro techniques in mouse became a valuable tool for improving reproductive technics improvement, and for toxicology studies.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Mots clés :** Médecine de la reproduction ; Folliculogénèse ; Maturation in vitro ; Ovaire ; Culture folliculaire ; Développement folliculaire ; Ovocyte ; Modèle souris ; Facteurs de croissance

**Keywords:** Reproductive medicine; Folliculogenesis; In vitro maturation; Ovary; Follicular culture; Follicular development; Oocyte; Mouse model; Growth factors

## 1. Introduction

Les mécanismes du développement folliculaire et de la régulation de la folliculogénèse dans l'ovaire sont complexes et

en partie méconnus. L'étude de la physiologie ovarienne et notamment celle des follicules est indispensable pour l'amélioration des techniques en médecine de la reproduction. La culture de follicules in vitro est une alternative aux études in vivo pour approfondir les connaissances sur la folliculogénèse car elle permet d'étudier plus précisément ses mécanismes [1].

Le développement de systèmes de culture folliculaire trouverait une application en biologie de la reproduction en

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [jlornage@yahoo.fr](mailto:jlornage@yahoo.fr) (J. Lornage).

se substituant aux lourds traitements de stimulation ovarienne. La culture folliculaire représenterait également une option pour restaurer la fertilité des femmes ou des jeunes filles ayant bénéficié d'une cryoconservation ovarienne avant un traitement anticancéreux. En effet, ces traitements sont gonadotoxiques et ces femmes risquent d'être infertiles, notamment à la suite d'une insuffisance ovarienne précoce. Le but de cette technique est de préserver des fragments de cortex ovarien pour une utilisation future qui permettrait la reprise du développement folliculaire, telles la greffe ou la culture folliculaire. Dans le cas de la folliculogénèse in vitro, le but serait de cultiver des follicules immatures jusqu'au stade préovulatoire, puis de réaliser une fécondation in vitro. De plus, pour certains cancers, des cellules cancéreuses peuvent être présentes dans le fragment ovarien. Le développement in vitro des follicules immatures issus d'ovaires de patientes ayant survécu à un cancer pourrait éviter tout risque de transmission.

Chez l'ensemble des mammifères, la folliculogénèse possède certaines caractéristiques semblables. La souris a souvent été choisie comme modèle d'étude pour en explorer les mécanismes. Ce choix présente plusieurs avantages. La durée nécessaire au développement du follicule jusqu'à l'ovulation est d'environ trois semaines, ce qui permet de réaliser les études de la folliculogénèse dans un laps de temps raisonnable. In vitro, la souris est le seul animal chez lequel des naissances de jeunes viables ont été obtenues grâce au développement de follicules à partir de stades précoces [2–5].

Les différents systèmes de culture mis au point ont permis l'étude de l'influence de plusieurs paramètres sur le développement folliculaire in vitro, comme l'apport de gonadotrophines [6] ou celui d'oxygène [7]. Les travaux réalisés in vitro ont également apporté des précisions sur la régulation de la folliculogénèse, notamment sur les facteurs modulant l'initiation de croissance tel que l'*anti-mullerian hormone* (AMH) [8]. À ce jour, plusieurs méthodes de culture de follicules ovariens à des stades précoces ont été développées. Les travaux d'Eppig et O'Brien ont permis l'achèvement d'une folliculogénèse in vitro complète à partir de follicules primordiaux [3,5]. D'autres travaux ont permis la naissance des souriceaux à partir de follicules isolés aux stades primaires ou préantraux [2,4,9].

L'ensemble des études ayant exploré la folliculogénèse in vitro a permis de connaître les conditions de culture critiques pour la croissance, la survie, la maturation des follicules et la qualité ovocytaire.

## 2. À partir de quel stade folliculaire la folliculogénèse in vitro est-elle possible ?

Le modèle souris est un modèle avantageux pour l'exploration du développement du follicule in vitro. La formation des follicules a lieu à la naissance et le développement de l'ensemble des follicules inclus dans la première vague de croissance se fait de façon synchronisée. Est ainsi rendue possible l'obtention d'une population homogène de follicules et donc la mise au point de différentes méthodes de cultures in vitro à partir de follicules de taille similaire. En effet, l'âge des jeunes souris utilisées peut être sélectionné en fonction du stade de développement folliculaire maximum désiré [10]. Le matériel de départ était constitué soit d'ovaires de souris nouveau-nées entiers dans lesquels on ne trouve que des follicules primordiaux [3,5], soit d'ovaires de souris prépubères pour isoler des follicules aux stades primaire [11] ou préantral [4,12].

### 2.1. Culture d'ovaire entier suivie de culture des complexes ovocytes–cellules de la granulosa (COGC)

Dans les travaux d'Eppig et O'Brien, des ovaires ont été prélevés sur des souris nouveau-nées le jour de leur naissance [3,5]. Les ovaires ne contenaient alors que des follicules primordiaux. Les ovaires ont été cultivés entiers, par groupe, pendant huit jours, sur une membrane poreuse de polycarbonate flottant sur le milieu de culture. Cette étape a permis l'initiation de la croissance des follicules primordiaux et le passage aux stades follicules primaires ou secondaires (Fig. 1 [5]). De manière similaire aux premières entrées en croissance in vivo, l'initiation de la croissance in vitro a été observée de façon prépondérante dans la région médullaire [5]. Dans ces travaux, les ovocytes contenus dans les ovaires cultivés pendant huit jours ont atteint un diamètre comparable à celui des follicules

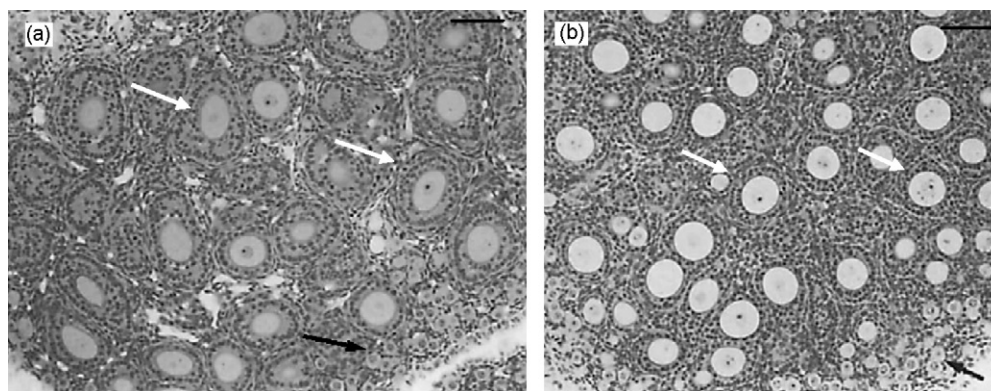


Fig. 1. Ovaire de souris âgée de huit jours (a) et ovaire de souris nouveau-née après culture de huit jours (b), d'après Eppig et O'Brien [5]. Les follicules en croissance sont situés dans la zone médullaire (flèches blanches) alors que les follicules primordiaux restent dans la région corticale (flèches noires). Les follicules en croissance présentent un ovocyte plus gros et sont entourés d'une ou deux couches de cellules de la granulosa. La membrane basale entourant les follicules n'est présente que partiellement dans le tissu cultivé.

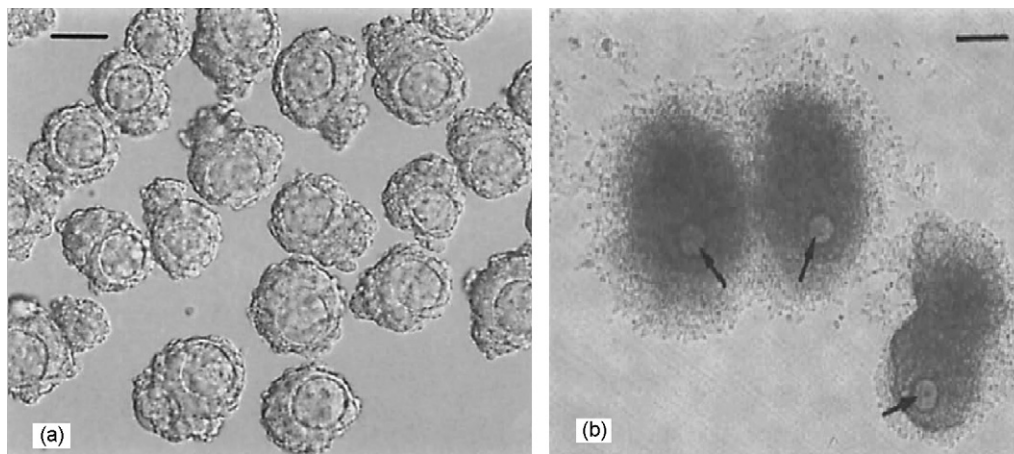


Fig. 2. Complexes ovocytes–cellules de la granulosa, d’après Eppig et O’Brien [5]. Les complexes isolés à partir des ovaires entiers cultivés (a) ; (b) ces mêmes complexes après 14 jours de culture : les cellules de la granulosa ont proliféré autour de l’ovocyte (flèches) ; échelle 50  $\mu\text{m}$  (a) et 100  $\mu\text{m}$  (b).

développés *in vivo* en huit jours (48 versus 44  $\mu\text{m}$ ) [5]. Cependant, la membrane basale était parfois incomplète et la couche de cellules thécales apparaissait moins définie que dans les ovaires de souris de huit jours. La seconde étape a consisté à isoler, grâce à l’action de la collagénase, les COGC du tissu ovarien. Ces complexes étaient formés d’un ovocyte entouré d’une ou deux couches cellulaires, la membrane basale étant en partie dégradée par le traitement enzymatique (Fig. 2a [5]). Les complexes ont été cultivés sur des membranes poreuses traitées au collagène pendant 14 jours supplémentaires (Fig. 2b [5]). Après la maturation ovocytaire en présence de la *follicle stimulating hormone* (FSH), les ovocytes ont été dénudés des cellules de la granulosa et mis en fécondation. En 2003, l’équipe d’O’Brien et al. [3] a révisé son protocole de culture en modifiant plusieurs paramètres concernant la composition du milieu. Ces modifications ont permis d’améliorer la maturation ovocytaire et le développement embryonnaire. Cette étude a montré que les conditions de culture étaient optimales pour le développement préimplantatoire lorsque la FSH était supprimée en fin de culture afin d’éliminer les effets délétères sur l’embryon de la FSH associée à l’insuline [13]. Dans ce même but, le milieu  $\alpha\text{MEM}$  a été préféré au milieu Waymouth pour les six derniers jours de culture, car il possède une plus faible concentration de glucose. L’acide ascorbique, présent en quantité plus importante dans le  $\alpha\text{MEM}$ , favorisait le développement *in vitro* des COGC [13]. Enfin, dans le protocole révisé, de la fétuine a été ajoutée dans le milieu sur l’ensemble de la culture des COGC pour éviter le durcissement de la zone pellucide. Sur 190 embryons transférés dans le protocole original, seul un souriceau viable est né (0,5 %) [5]. Le protocole révisé utilisé en 2003 a permis une amélioration significative de la maturation ovocytaire avec une augmentation du nombre de naissances obtenues : 66 souriceaux, soit 6 % des embryons transférés [3]. Cependant, les taux restent inférieurs à ceux obtenus avec fécondation *in vitro* d’ovocytes issus d’ovaires de souris âgées de 22 jours (17 %) [3].

## 2.2. Culture de follicules isolés

D’autres travaux ont été réalisés à partir d’un stade folliculaire plus tardif. Ils concernent tous des cultures de

follicules isolés [4,9,11,12]. La culture de follicules isolés n’a pu être réalisée qu’à partir de follicules de diamètre supérieur à 80  $\mu\text{m}$ , correspondant au stade grand follicule primaire. Les follicules ont été isolés, soit mécaniquement à l’aide de fines aiguilles, soit enzymatiquement par l’utilisation de collagénase. La sélection d’une population homogène de follicules peut être réalisée sous le grossissement 400 du microscope en mesurant le diamètre du follicule et en dénombrant le nombre de couches cellulaires qui entourent l’ovocyte. Lorsque les souris étaient âgées de huit à 14 jours, les follicules obtenus présentaient une à deux couches de cellules [9,11,12]. Chez des souris plus âgées, les ovaires contenaient des follicules préantraux plus tardifs, mesurant de 150 à 200  $\mu\text{m}$  [4,14]. Les follicules ont été cultivés dans des conditions très variables de support et de milieux en culture. La rupture du follicule mimant l’ovulation du follicule et la maturation de l’ovocyte *in vitro* ont été obtenues de deux façons. Dans certains travaux, les follicules ont été incubés avec la *luteinizing hormone* (LH) [4] ou avec une association d’*human chorionic gonadotropin* (HCG) et de l’*epidermal growth factor* (EGF) [12,15], puis les ovocytes ont été dénudés mécaniquement. L’ovulation a été également mimée mécaniquement *in vitro* en ponctionnant les complexes ovocyte–cellules de la granulosa et en plaçant ensuite les ovocytes quelques heures dans un milieu de maturation.

Les méthodes de validation des systèmes de culture étaient variées : survie folliculaire, appréciation de la morphologie, évaluation de la stéroïdogénèse *in vitro*, maturation de l’ovocyte, compétence à la fécondation ou encore naissance de souriceaux viables. Seul un petit nombre d’équipes a publié des naissances (Tableau 1) consécutives à une culture de follicules isolés à un stade précoce [2,4,9], avec un rapport naissances/embryons transférés variant entre 5 et 6 %. L’obtention de naissances est un objectif difficile à atteindre, compliqué par la technique de transfert embryonnaire. Plus simplement, le diamètre final de l’ovocyte, associé à sa compétence à former le premier globule polaire, pourrait fournir un bon indice de la réussite de la culture.

Ces systèmes de culture ont également permis d’étudier les interactions interfolliculaires en réalisant des cocultures de

Tableau 1  
Synthèse des taux d'ovocytes en métaphase II (MII) associés aux naissances obtenues après folliculogénèse in vitro chez la souris

	Taille finale de l'ovocyte ( $\mu\text{m}$ )	Taux d'ovocytes en MII (%)	Naissances/embryons transférés (%)
Eppig et Schroeder [9]	68	24	5
Spears et al. [4]			6
Cortvrindt et al. [2,6,12,23]	74	41	5
Eppig et O'Brien [5]	70	7	0,5
O'Brien et al. [3]		44	5

follicules de stades différents [14,16,17]. Ces modèles ont permis de mimer in vitro le phénomène de dominance, mettant en évidence la sécrétion par le follicule antral de facteurs inhibant la croissance du follicule préantral cocultivé lors de la diminution de l'apport de la FSH.

### 3. Paramètres influençant le développement des follicules

Diverses méthodes de culture in vitro ont été développées [4,5,7,9,11,14]. La variabilité des systèmes étudiés a permis de mettre en évidence l'influence directe ou indirecte des supports, hormones, facteurs de croissance et gaz utilisés sur le développement folliculaire in vitro.

#### 3.1. Systèmes de culture et structure tridimensionnelle du follicule

##### 3.1.1. Isolement des follicules

Tous les protocoles de culture ont eu une étape commune : l'isolement des follicules préantraux. Les follicules ont été isolés, soit mécaniquement à l'aide de fines aiguilles [9,11,12], soit enzymatiquement par l'utilisation d'enzymes protéolytiques comme la collagénase [3,9]. En comparant les deux types d'isolement, Demeestere et al. ont montré que la méthode enzymatique présentait l'avantage de collecter un nombre important de follicules [18]. Cependant, avec la méthode enzymatique, l'intégrité structurale des follicules n'a pas été préservée : les complexes ovocytes–granulosa obtenus étaient composés d'ovocytes entourés de manière irrégulière de quelques couches de cellules somatiques. La membrane basale a été altérée et les cellules thécales semblaient être éliminées. Au contraire, la méthode mécanique a permis d'obtenir des follicules préantraux intacts avec un ovocyte central, entouré des cellules de la granulosa, de la membrane basale et de quelques cellules thécales. Cette technique a également montré un meilleur taux de survie en fin de culture. De façon identique à la situation in vivo, la membrane basale joue un rôle essentiel dans le maintien de la structure sphérique du follicule in vitro, ce qui évite la libération de l'ovocyte avant la fin de la culture et donc une meilleure survie des follicules. La taille des ovocytes en fin de culture était de 67  $\mu\text{m}$  et le taux de maturation variait autour de 70 % quelle que soit la technique choisie [18].

##### 3.1.2. Supports de culture

Certains supports ont permis de préserver la structure sphérique du follicule, comme la culture en gel de collagène type I et III [19], d'alginate [20] ou d'agar [21] qui stabilise la structure tridimensionnelle. La culture en puits de plaque de microtitration, associée à un transfert des follicules dans de nouveaux puits tous les deux jours [4], a permis également une croissance de follicules morphologiquement similaires aux follicules développés in vivo, c'est-à-dire conservant une couche de cellules thécales entourant la membrane basale. De même, le développement in vitro de follicules sur des membranes poreuses non adhérentes a évité l'adhésion des cellules et a préservé la structure tridimensionnelle du follicule [14]. La structure folliculaire a été également peu modifiée lorsque les follicules ont été déposés sur une membrane poreuse traitée au collagène, car ce traitement a assuré l'adhérence des follicules, mais avec une migration minimale des cellules de la granulosa [9].

D'autres supports ont entraîné une modification de la structure folliculaire, comme la culture en microgoutte de milieu recouverte d'huile minérale [12]. La structure originale du follicule s'était rapidement modifiée, consécutive à l'adhésion des cellules thécales au support et de la prolifération et de la migration des cellules de la granulosa en dehors de la membrane basale. Cependant, le follicule s'était réorganisé pour former une structure particulière induite par la différenciation des cellules de la granulosa, au-dessus d'un tapis de cellules thécales [22]. Les auteurs ont décrit que les follicules se sont réorganisés, soit en dôme présentant au sommet l'ovocyte et en dessous une cavité type antrum (Fig. 3 [23]), soit en une structure en forme disque où les cellules de la granulosa différenciées ont formé un cumulus central entouré d'un anneau de cellules murales. Dans chacun des cas, les interactions entre les trois types de cellules somatiques rencontrés in vivo ont été conservées.

Un système intermédiaire biphasique a été développé par Lenie et al. permettant la culture de follicule à partir du stade primaire [11]. Dans une première phase, tant que le follicule n'avait pas atteint 100  $\mu\text{m}$  de diamètre, la structure tridimensionnelle du follicule a été préservée en empêchant mécaniquement l'adhésion des cellules thécales au support. Puis, l'adhésion des cellules thécales a été possible dans la seconde phase, entraînant la restructuration du follicule. Cette technique a permis la survie des follicules primaires in vitro en évitant la libération précoce de l'ovocyte dans les premiers stades de croissance.

Les systèmes de culture peuvent être choisis en fonction du but de l'étude [10]. Certains systèmes permettent de reproduire la morphologie normale des follicules in vivo en préservant une unité tridimensionnelle multicouche, ce qui est intéressant pour étudier la physiologie du follicule. Ce système dit fermé permet alors d'explorer les relations entre les différents types cellulaires ainsi que l'incidence des modifications morphologiques du follicule. Mais dans ces systèmes dits fermés, l'apport des nutriments, des hormones, des facteurs de croissance et de l'oxygène au centre de la structure et donc à l'ovocyte est modifié. Contrairement à la situation in vivo, les

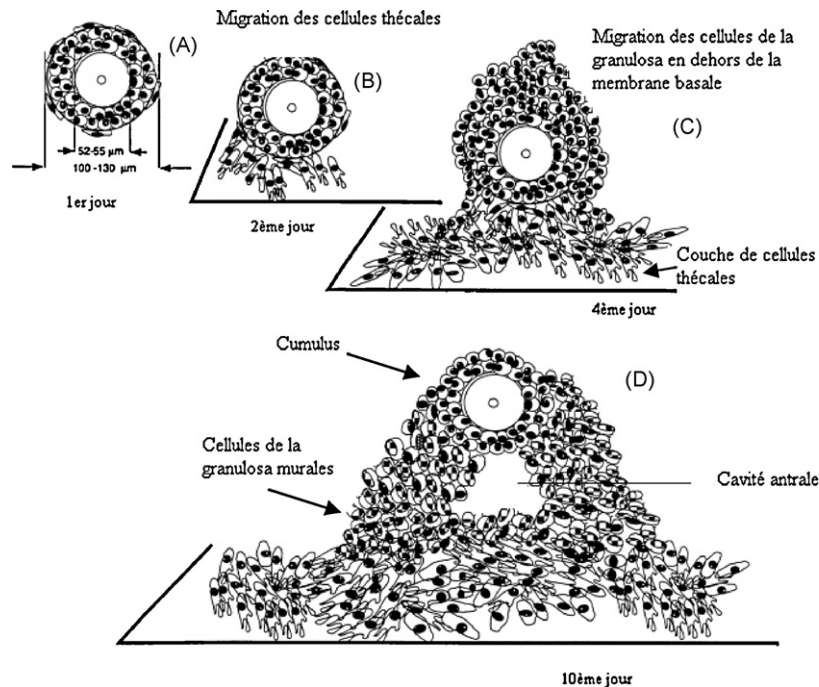


Fig. 3. Structure folliculaire remodelée, d'après Cortvrindt et al. [23] : 1<sup>er</sup> jour de culture : aspect morphologique normal (A) ; 2<sup>e</sup> jour : adhésion des cellules thécales au support (B) ; 4<sup>e</sup> jour : colonisation des cellules de la granulosa en dehors de la membrane basale (C) ; 10<sup>e</sup> jour : formation d'un dôme avec, au centre, une cavité antrale bordée d'un mur de cellules de la granulosa et, au sommet, l'ovocyte entouré de cellules du cumulus (D).

facteurs essentiels à la survie, la croissance du follicule et la maturation ovocytaire doivent franchir une barrière non vascularisée. Lorsque les follicules ont conservé leur structure originale, le taux de rupture du follicule après induction de l'ovulation à l'HCG était inférieur à 60 % [24,25]. L'utilisation de ce même modèle a montré que les ovocytes ovulés *in vitro* n'ont pas acquis leur compétence méiotique malgré une morphologie folliculaire bien conservée et une rupture folliculaire spontanée [26]. Dans une autre étude, la maturation des complexes cumulus-ovocytes, en dehors du follicule dont ils ont été extraits mécaniquement, induisait une meilleure expansion du cumulus que lorsque la maturation se faisait au sein du follicule [4]. Dans cette étude, le taux d'ovocytes fécondés, atteignant le stade de deux blastomères, était également très supérieur dans le cas où les complexes avaient été maturés hors du follicule (41 versus 9 %). Ces résultats montrent que la diffusion des éléments indispensables pour obtenir un ovocyte de qualité, compétents à la maturation nucléaire et au développement embryonnaire, est nettement compromise dans les systèmes fermés.

Lorsque l'objectif est d'obtenir des ovocytes mûrs et compétents au développement embryonnaire, l'accessibilité des nutriments, hormones et gaz à l'ensemble du follicule est essentielle. Ce phénomène serait alors facilité dans les systèmes dits ouverts, puisque la restructuration du follicule diminue le confinement du cumulus et de l'ovocyte.

### 3.2. Délai de formation d'un follicule mûr

Il est nécessaire d'adapter le temps de culture à la taille du follicule de départ pour obtenir le stade de follicule mûr de

manière optimale. Il existe une fenêtre temporelle précise durant laquelle l'induction de la maturation finale de l'ovocyte *in vitro* peut être optimisée. Cette période dépassée, les follicules en culture dégénèrent rapidement [23].

La durée de folliculogénèse *in vivo* à partir de follicules primordiaux n'étant pas connue précisément, il est difficile d'apprécier si la durée de la folliculogénèse *in vitro* est similaire. En revanche, la durée nécessaire au développement du follicule primaire en follicule préovulatoire est de 20 jours *in vivo* [27]. Dans le système de culture d'Eppig et O'Brien, il a fallu 22 jours pour permettre aux follicules primordiaux d'atteindre le terme de leur développement [3,5], alors qu'il en a fallu 18 lorsque les follicules ont été isolés au stade primaire [11] et 12 lorsqu'ils ont été isolés au stade secondaire [12] (Fig. 4). Ces temps de croissance variables, associés à des systèmes et environnements physicochimiques très différents, ont montré qu'à un stade de départ défini correspond un système de culture particulier. *In vitro*, les follicules se retrouvent privés des facteurs régulateurs, produits par la médullaire ovarienne ou par les follicules adjacents et les facteurs autocrines ou paracrines sécrétés en cultures, peuvent diffuser dans le milieu, ce qui diminuerait leur concentration. Cette divergence avec les conditions *in vivo* concernant l'absence de facteurs régulateurs dans le milieu de culture peut diminuer le temps de transition entre deux stades et modifier la durée totale de la folliculogénèse *in vitro*.

L'appréciation du diamètre folliculaire en fin de culture est rendue difficile à cause de la plus ou moins bonne conservation de la structure du follicule. Il est donc plus juste de s'intéresser au diamètre de l'ovocyte après son extraction du follicule mature. Ce diamètre, qui varie autour de 70 μm (Tableau 1),

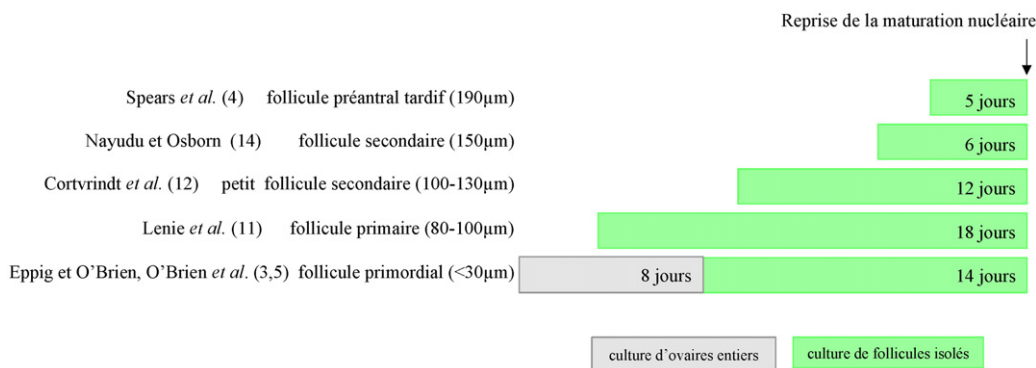


Fig. 4. Délai de formation de follicules mûrs d'après les différents travaux publiés. La maturation ovocytaire est optimale lorsque le temps de culture est adapté au stade folliculaire initial.

reste inférieur à celui des ovocytes développés parallèlement *in vivo*, soit environ 75 µm (5,9,12). Dans les travaux d'Eppig et O'Brien, les ovocytes présentaient un diamètre correspondant à celui des ovocytes obtenus chez une souris de 16 [9] ou 18 jours [3,5], alors que les follicules ont été cultivés 22 jours après la naissance de l'animal. Cependant, *in vivo*, l'ovocyte acquiert sa compétence méiotique dès lors qu'il atteint un diamètre équivalent à 80 % de son diamètre final, soit environ 70 µm [23]. Cette différence entre le diamètre des follicules *in vivo* et *in vitro* ne semble donc pas être préjudiciable pour la maturation nucléaire de l'ovocyte.

### 3.3. Sources de protéines, insuline et acide ascorbique

La plupart des protocoles de culture folliculaire utilise, comme source de protéines, du sérum de veau fœtal ou du sérum de souris présentant un hypogonadisme (hpg), car ils contiennent de très faibles taux de FSH et LH. Cependant, le sérum apporte dans la culture un certain nombre de facteurs difficiles à identifier et à quantifier, qui peuvent interférer avec les composants ajoutés. Dans l'étude de Mitchell et al., la survie folliculaire était similaire en présence de sérum de veau fœtal ou de souris hpg, alors qu'elle était réduite en présence de sérum de souris adulte [28]. Moins de 10 % des ovocytes ont été libérés précocement en présence de sérum de veau fœtal ou de souris hpg contre 40 % lorsque le sérum provenait de souris adulte. En revanche, le nombre d'ovocytes matures obtenus était inférieur en présence de sérum de souris hpg. La variabilité de ces résultats peut être expliquée par la balance de facteurs régulateurs dans les différents sérums. La concentration de sérum ajoutée aux cultures de follicules est habituellement de 5 %. À cette concentration, l'adhésion du follicule au support de culture est facilitée [11]. Une réduction de cette concentration à 1 % n'avait pas affecté la survie folliculaire, mais avait diminué le taux de maturation ovocytaire [29]. Cependant, la synthèse d'œstrogène était plus importante lorsque la concentration de sérum était moindre. Ce phénomène pourrait être dû à la présence de facteurs inhibiteurs de la stéroïdogénèse dans le sérum.

En l'absence de sérum, l'apoptose des cellules de la granulosa est induite dans le follicule, compromettant son développement. L'adjonction d'acide ascorbique dans le milieu

réduirait l'apoptose induite par le stress oxydatif [13,30]. Cette vitamine permettrait également de préserver la structure sphérique du follicule en maintenant l'intégrité de la membrane basale. Ce fait peut s'expliquer par l'induction de l'expression d'inhibiteurs de protéases dégradant le collagène par l'acide ascorbique [30].

De façon moins empirique, l'albumine bovine pourrait remplacer le sérum, mais son utilisation comme source de protéine a montré une accélération de la perte de structure des follicules [14]. Seule l'équipe d'Eppig a réalisé avec succès des cultures en substituant l'albumine bovine au sérum [3,5,9]. Dans ces conditions, l'ajout de la glycoprotéine fœtine était nécessaire pour éviter le durcissement de la zone pellucide pendant la croissance de l'ovocyte.

L'insuline a été couramment ajoutée dans le milieu de culture comme facteur de survie et facteur mitogène mais son intérêt est controversé. En présence d'un faible taux de sérum (1 %), l'insuline n'aurait pas d'influence sur la survie folliculaire ou sur le taux de maturation des ovocytes [29]. Associée à la FSH, elle pourrait être délétère pour le développement préimplantatoire des embryons [3]. Ce phénomène pourrait être expliqué par la synergie d'action de ces deux hormones qui entraînerait une importante augmentation du métabolisme des cellules de la granulosa et ainsi leur différenciation inadéquate et précoce. Cette différenciation prématurée des cellules de la granulosa aurait comme conséquence une altération de la compétence au développement des ovocytes. Ces résultats contradictoires quant au rôle de l'insuline sur le développement folliculaire *in vitro* seraient influencés par les conditions de culture et les facteurs présents dans le milieu. Ces résultats sont observés dans des systèmes de cultures différents qui favorisent, soit le confinement des facteurs paracrines produit par le follicule, soit au contraire une diffusion de ces facteurs dans le milieu de culture abaissant leur concentration. La présence et l'accessibilité à l'ovocyte des facteurs présents dans le sérum peuvent moduler l'action des hormones, causant également une diversité de résultats. De plus, l'insuline est généralement apportée dans le milieu de culture en quantité supraphysiologique, puisque sa concentration représente environ mille fois l'insulinémie de la souris [31], ce qui pourrait également jouer un rôle néfaste sur le développement folliculaire.

### 3.4. Régulation du développement folliculaire

Les connaissances concernant la fonction lors du développement folliculaire d'une majorité de facteurs de croissance et hormones ont été acquises grâce aux modèles animaux. Les systèmes de culture folliculaire chez la souris ont permis d'explorer la physiologie folliculaire et les mécanismes régulant la croissance et la différenciation du follicule (Fig. 5).

#### 3.4.1. Gonadotrophines

In vivo, les gonadotrophines jouent un rôle clé dans le développement du follicule. Malgré l'apparition des récepteurs à FSH dès le stade follicule primaire et celle des récepteurs à l'hormone LH dans les cellules thécales dès le stade de follicule secondaire [32], il est admis que la croissance des follicules préantraux n'est pas sous la dépendance directe des gonadotrophines. À ce stade, le rôle de ces hormones serait de moduler la prolifération et la maturation des cellules de la granulosa [33]. À l'inverse, la croissance terminale est strictement dépendante des gonadotrophines [34]. In vitro, la LH ajoutée en faible quantité dans le milieu de culture participe à la différenciation du follicule préantral en follicule antral, améliore la formation de l'antrum et semble essentielle à la maturation ovocytaire [6,23].

La FSH est apportée de manière usuelle dans les milieux de culture. Elle est considérée comme un facteur de survie. En son absence, seuls 11 % des follicules survivaient après 12 jours de culture contre 80 % en présence de 100 mUI/mL de FSH [35]. Dans ce système de culture, l'apport de FSH limitait la libération précoce des ovocytes par le follicule. Ces auteurs émettent l'hypothèse que le manque de FSH et par conséquent celui d'estrogènes dont la synthèse est induite par la FSH, réduirait le nombre de jonctions communicantes. La perte de ces jonctions diminuerait les contacts entre les cellules, entraînant une mauvaise adhérence entre les cellules de la granulosa et l'ovocyte. La FSH joue un rôle essentiel dans la formation de l'antrum, puisqu'en son absence, les follicules ne développaient jamais de cavité antrale [35,36]. In vitro, la FSH

stimulait la prolifération des cellules de la granulosa dès le stade préantral, favorisait la différenciation du follicule antral et stimulait la stéroïdogénèse [14,36]. Dans leur protocole de culture, Nayudu et Osborn ont montré qu'une concentration de FSH de 100 mUI/mL était suffisante pour obtenir une croissance optimale des follicules jusqu'à un diamètre de plus de 400  $\mu\text{m}$  [14]. Pour Adriaens et al., la dose minimale de FSH recombinante à apporter, permettant une survie de plus de 90 % des follicules, était de 10 mUI/mL [36].

#### 3.4.2. Facteurs endocrines et paracrines

L'AMH, membre de la famille du *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF $\beta$ ), sécrétée par les cellules de la granulosa, inhiberait partiellement l'initiation de la croissance folliculaire [37]. Cette hypothèse a été confirmée in vitro lors de cultures de tissu ovarien de souris nouveau-nées en présence ou en absence d'AMH [8]. En présence d'AMH, le nombre de follicules en croissance était réduit de 40 % par rapport aux cultures témoins. Par ailleurs, son apport lors de cultures de follicules préantraux supprimait l'effet stimulant de la FSH sur la croissance folliculaire en rendant les follicules moins sensibles à la FSH [38]. Un autre facteur identifié in vitro comme activant le passage de follicule primordial à follicule primaire est le *bone morphogenetic protein 7* (BMP-7), membre de la famille des TGF $\beta$ . Le BMP-7 stimulerait également la synthèse des récepteurs à FSH [39]. In vivo, le système kit joue un rôle clé en temps qu'activateur de l'initiation de croissance, de la formation de l'antrum et de la prolifération des cellules de la granulosa [40,41]. Ce système est composé du récepteur c-kit, présent sur la membrane de l'ovocyte et des cellules thécales et de son ligand Kit-Ligand exprimé par les cellules de la granulosa. In vitro, l'ajout de Kit-Ligand lors de la culture de follicules préantraux a permis de confirmer le rôle stimulant direct et indirect de ce facteur sur la prolifération des cellules de la granulosa et la stéroïdogénèse, la formation de l'antrum et la maturation ovocytaire [42].

L'activine A, membre de la famille des TGF $\beta$  sécrété par les cellules de la granulosa, est un autre facteur impliqué dans le

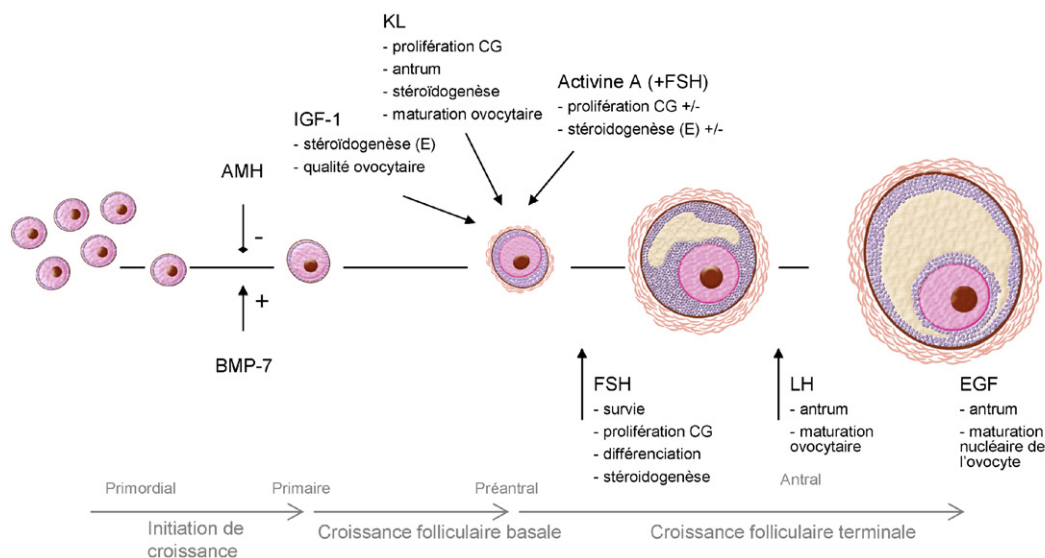


Fig. 5. Facteurs de croissance et hormones ayant une influence in vitro chez la souris sur le développement folliculaire. CG : cellules de la granulosa ; E : estrogènes.

développement et la différenciation du follicule [43]. In vitro, l'activine A, associée à la FSH, a été identifiée comme un facteur favorisant la croissance des follicules préantraux isolés à partir de souris immatures, en stimulant l'activité mitotique des cellules de la granulosa et la production d'estrogènes [44,45]. Cependant, lors de la culture de follicules préantraux isolés à partir de souris adultes, ce facteur inhibait l'effet stimulant de la FSH concernant la production d'estrogènes et la croissance des follicules [45]. Les effets de l'activine sur le développement folliculaire seraient donc dépendants de l'âge de l'animal.

En culture, la présence de l'*insulin like-growth factor I* (IGF-I) entraîne une augmentation de la quantité d'estradiol sécrétée par les cellules de la granulosa. En présence de FSH, l'apport d'IGF-I favorise le développement préimplantatoire de l'embryon [46].

### 3.5. Oxygène et qualité folliculaire

In vivo, l'oxygène est apporté par la vascularisation, alors qu'in vitro, la diffusion de ce gaz s'effectue à travers les différentes couches cellulaires non vascularisées, pouvant limiter son apport au centre de la structure et donc de l'ovocyte. Dans un système de culture folliculaire sans sérum, la survie, le taux de maturation et le taux de développement embryonnaire préimplantatoire diminuait fortement lorsque l'apport d'oxygène augmentait [47]. Une atmosphère normale en oxygène (20 %) provoque la formation d'une plus grande quantité de radicaux libres que lorsque l'apport d'oxygène se rapproche des conditions physiologiques (5 %). Or les radicaux libres sont délétères pour le développement de l'ovocyte, notamment en ce qui concerne la maturation nucléaire [48]. L'apport de sérum protège le follicule et l'ovocyte des radicaux libres. À l'opposé, dans un système de culture avec sérum, la survie folliculaire et la maturation ovocytaire étaient nettement améliorées en présence de 20 % d'oxygène. Cette étude montre que, lorsque l'apport d'oxygène était réduit à 5 %, l'ensemble des cellules au centre de la structure folliculaire était nécrosé [7]. Gosden et Byatt-Smith ont démontré que la majorité de l'oxygène dissous dans le milieu était métabolisé par les couches extérieures des cellules de la granulosa du follicule préantral, limitant la quantité atteignant le centre de l'unité folliculaire [49]. Cependant, une équipe a montré récemment que la consommation d'oxygène est peu importante dans les cellules du cumulus (moins de 0,5 %), ce qui permet à l'ovocyte d'accéder à la majeure partie de l'oxygène apporté au complexe ovocyte-cumulus [50]. L'impact de la quantité d'oxygène apportée sur le développement folliculaire dépend donc considérablement des conditions de culture [7]. Les exigences en oxygène du follicule varient en fonction de la modification de sa structure, de l'apport de facteurs stimulant l'activité mitotique et métabolique des cellules de la granulosa, ou de la présence d'un inhibiteur de radicaux libres.

## 4. Qualité ovocytaire au cours de la folliculogénèse in vitro

La qualité ovocytaire est étroitement liée au développement du follicule, puisque c'est au sein de la structure folliculaire que

se déroulent les processus de croissance et maturation ovocytaire. Cette cellule germinale est le siège d'une maturation nucléaire et cytoplasmique qui lui confère les capacités d'assumer la fécondation et d'initier le développement embryonnaire. Le taux des naissances obtenues après folliculogénèse in vitro est donc un critère, a posteriori, de qualité ovocytaire. Or le rendement des naissances par rapport aux embryons transférés à partir de follicules développés in vitro (Tableau 1) reste très inférieur à celui observé à partir de follicules développés in vivo (6 versus 17 %) [3]. Ces résultats soulignent donc la nécessité d'améliorer la qualité ovocytaire au cours du développement folliculaire in vitro.

Si la constitution nucléaire de l'ovocyte détermine la viabilité de la portée, sa constitution cytoplasmique conditionne la fécondation et le développement embryonnaire des premiers stades [1]. Plusieurs critères ovocytaires ont été étudiés après folliculogénèse in vitro. La capacité de l'ovocyte à reprendre sa méiose et expulser le premier globule polaire (métaphase II) fréquemment évaluée (Tableau 1). Après culture de petits follicules préantraux, le taux d'ovocytes en métaphase II avoisinait 45 % [3,12]. Le diamètre ovocytaire en fin de culture était proche ou similaire à celui des ovocytes in vivo [9,12,51]. In vivo, au stade de développement proche de l'ovulation, les ovocytes présentent une configuration de la chromatine compactée autour de la nucléole associée à une activité transcriptionnelle limitée [51]. In vitro, Pesty et al. ont montré que ce ralentissement de la transcription et cette configuration de la chromatine étaient proches de la situation in vivo [51]. La morphologie des fuseaux méiotiques et l'alignement des chromosomes en métaphase II étaient altérés lorsque de la culture était prolongée ou la tension d'oxygène réduite [48]. Un autre objectif du développement de l'ovocyte est la mise en place de l'empreinte génétique, c'est-à-dire l'expression exclusive de l'une ou l'autre des allèles parentales dans les gènes à empreinte. Kerjean et al. ont démontré que la culture folliculaire altérerait l'acquisition d'une empreinte génétique normale [52]. L'apparition des oscillations intracytoplasmiques de calcium est une des premières étapes précédant la reprise de la méiose. La fréquence de ces oscillations était plus faible dans les ovocytes issus de culture [51] et la mise en place de ce processus in vitro était dépendant de l'âge de l'animal et du supplément hormonal du milieu de culture [53]. De plus, la qualité cytoplasmique serait amoindrie pour les ovocytes issus de sujets prépubères par rapport aux sujets adultes [54]. Or tous les travaux ayant publié des naissances de jeunes viables n'ont concerné que la culture de petits follicules préantraux d'animaux prépubères. Aucune étude n'a permis à ce jour de tels résultats à partir de souris adultes.

## 5. Culture de follicules préantraux chez la femme

Les résultats concernant la folliculogénèse in vitro chez la femme sont limités du fait d'une part, du peu de matériel biologique disponible pour l'étude de la folliculogénèse humaine et, d'autre part, de la durée de la folliculogénèse trop longue (six mois) pour être actuellement reproduite in vitro. La culture de follicules de stades de développement



précoces pendant quatre semaines a permis le développement in vitro de petits follicules secondaires [55,56]. Deux types de cultures ont été étudiés : les follicules ont été cultivés après un isolement partiel, enzymatique ou mécanique, ou conservés au sein de pièces de cortex ovarien de femmes de 200 à 300  $\mu\text{m}$  d'épaisseur déposées sur une membrane poreuse à l'interface milieu/air.

La survie des follicules a été améliorée lorsque leur développement s'effectuait au sein du cortex ovarien [55]. La culture de tissu ovarien présente comme avantages de fournir aux follicules un support physique et de conserver l'interaction entre les follicules [55]. Des follicules préantraux de 100 à 400  $\mu\text{m}$  de diamètre isolés mécaniquement à l'aide de fines aiguilles et cultivés quatre semaines ont pu se développer en petits follicules antraux. Cependant, dans ces conditions, seulement 10 à 20 % des follicules contenaient un ovocyte en fin de culture [57]. La culture de cortex de fœtus humain cryoconservé a montré une survie des follicules pendant 63 jours. Néanmoins, après une entrée en croissance des follicules primordiaux, les follicules se sont bloqués au stade primaire [58]. Ces résultats pourraient être expliqués par l'absence in vitro de facteurs régulateurs issus de la médullaire.

En ce qui concerne la composition des milieux de culture, la FSH permettrait de promouvoir la formation de l'antrum, la production d'estrogènes [57], de réduire l'atrésie et de favoriser la croissance folliculaire [56]. Une faible quantité de LH humaine (2,5 ng/mL) associée à la FSH humaine permettrait de promouvoir la croissance folliculaire et le développement de l'antrum [57]. Récemment, il a été mis en évidence que l'AMH provoquait en culture de tissu ovarien humain des effets similaires à ceux observés chez la souris. À une concentration de 100 ng/mL, l'AMH avait un effet inhibiteur sur l'entrée en croissance des follicules primordiaux humains [59]. D'autres facteurs comme le Kit-ligand [60], l'insuline [56] ou le *growth differentiation factor 9* (GDF9) [61], ajoutés aux cultures de follicules, ont montré un effet bénéfique sur le développement folliculaire in vitro.

Une des difficultés majeures pour la réalisation de la folliculogénèse in vitro chez la femme est le délai nécessaire à la folliculogénèse (six mois), en particulier le temps de transition entre le follicule primordial et primaire qui est de 120 jours in vivo. In vitro, ce temps de transition est réduit à quelques jours [55–57,60–62], mais la croissance de l'ovocyte est souvent insuffisante et la prolifération des cellules de la granulosa peu structurée [10]. Les caractéristiques de survie et de croissance obtenues dans les différentes études mettent en évidence l'aspect inadéquat des systèmes de cultures développés à ce jour chez la femme. Si la transition entre quelques stades folliculaires a pu être réussie, la réalisation d'une folliculogénèse complète reste un défi.

## 6. Conclusion

La culture de follicules de souris en vue d'achever une folliculogénèse in vitro est actuellement une technique reproductible et fiable. Les systèmes de culture mis au point ont permis de tester des composés endogènes, pharmaceutiques

ou toxiques pouvant affecter la folliculogénèse et la qualité ovocytaire dans des conditions bien définies [1,63]. Contrairement au modèle in vivo, le modèle in vitro présente l'avantage de contrôler la concentration exacte du composé testé dans l'environnement du follicule et permet d'évaluer l'influence directe de la molécule étudiée sur le follicule. La croissance folliculaire in vitro suivi de la maturation et de la fécondation in vitro a également permis récemment de valider la technique de vitrification d'ovaire entiers de souris tout en s'affranchissant de la transplantation [64]. Ce modèle est donc un véritable outil biologique pour la connaissance de la physiologie ovarienne et l'amélioration des techniques en reproduction.

Chez la souris, certaines caractéristiques du développement folliculaire sont modifiées in vitro. Pourtant, la production d'un follicule fonctionnel permettant la libération d'un ovocyte mature et compétent au développement chez la souris est possible. La souris est la seule espèce chez qui la réalisation in vitro de toute la folliculogénèse a donné naissance à des jeunes vivants normaux [3,5]. Cependant, le taux de naissances par rapport aux embryons transférés à partir de follicules développés in vitro reste inférieur aux résultats obtenus in vivo et soulignent la nécessité de produire des ovocytes de meilleure qualité. Pour optimiser les systèmes de culture, les caractéristiques des ovocytes développés in vitro doivent être évaluées afin d'assurer une maturation cytoplasmique et nucléaire proche de celles des ovocytes obtenu in vivo.

Le modèle souris a permis de progresser dans la connaissance de la folliculogénèse in vitro. Cependant, ce modèle présente des différences majeures avec la physiologie ovarienne de la femme. Outre la difficulté relative au délai nécessaire à la folliculogénèse in vitro chez la femme, le manque de connaissances concernant les conditions optimales nécessaires au développement des follicules est un frein à la mise au point d'un système de culture optimal. Les exigences des différents stades folliculaires et des divers types cellulaires indispensables au développement du follicule n'ont pas été suffisamment déterminées. Dans le but d'améliorer le développement folliculaire in vitro chez la femme, il est nécessaire de progresser par étapes. En particulier, il est indispensable d'identifier les facteurs présents dans les milieux de culture qui régulent le développement folliculaire in vitro chez les grands mammifères. La poursuite de la recherche fondamentale sur des modèles animaux est donc essentielle pour espérer pouvoir appliquer un jour chez la femme un modèle de folliculogénèse in vitro.

## Références

- [1] Cortvrindt RG, Smitz JE. Follicle culture in reproductive toxicology: a tool for in vitro testing of ovarian function? *Hum Reprod Update* 2002;8:243–54.
- [2] Cortvrindt R, Liu J, Smitz J. Validation of a simplified culture system for primary mouse follicles by birth of live young. In: *In Ares Sero Symposia*; 1998; XI International Workshop on Development and Function of the Reproductive Organ; Artis Zoo, Amsterdam, The Netherlands; 1998.
- [3] O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ. A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol Reprod* 2003;68:1682–6.

- [4] Spears N, Boland NI, Murray AA, Gosden RG. Mouse oocytes derived from in vitro grown primary ovarian follicles are fertile. *Hum Reprod* 1994;9:527–32.
- [5] Eppig JJ, O'Brien MJ. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod* 1996;54:197–207.
- [6] Cortvrindt R, Hu Y, Smitz J. Recombinant luteinizing hormone as a survival and differentiation factor increases oocyte maturation in recombinant follicle stimulating hormone-supplemented mouse preantral follicle culture. *Hum Reprod* 1998;13:1292–302.
- [7] Smitz J, Cortvrindt R, van Steirteghem AC. Normal oxygen atmosphere is essential for the solitary long-term culture of early preantral mouse follicles. *Mol Reprod Dev* 1996;45:466–75.
- [8] Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, et al. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 2002;143:1076–84.
- [9] Eppig JJ, Schroeder AC. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1989;41:268–76.
- [10] Smitz J, Cortvrindt RG. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction* 2002;123:185–202.
- [11] Lenie S, Cortvrindt R, Adriaenssens T, Smitz J. A reproducible two-step culture system for isolated primary mouse ovarian follicles as single functional units. *Biol Reprod* 2004;71:1730–8.
- [12] Cortvrindt R, Smitz J, van Steirteghem AC. In-vitro maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepuberal mice in a simplified culture system. *Hum Reprod* 1996;11:2656–66.
- [13] Eppig JJ, Hosoe M, O'Brien MJ, Pendola FM, Requena A, Watanabe S. Conditions that affect acquisition of developmental competence by mouse oocytes in vitro: FSH, insulin, glucose and ascorbic acid. *Mol Cell Endocrinol* 2000;163:109–16.
- [14] Nayudu PL, Osborn SM. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles in vitro. *J Reprod Fertil* 1992;95:349–62.
- [15] Smitz J, Cortvrindt R, Hu Y. Epidermal growth factor combined with recombinant human chorionic gonadotrophin improves meiotic progression in mouse follicle-enclosed oocyte culture. *Hum Reprod* 1998;13:664–9.
- [16] Baker SJ, Srsen V, Lapping R, Spears N. Combined effect of follicle-follicle interactions and declining follicle-stimulating hormone on murine follicle health in vitro. *Biol Reprod* 2001;65:1304–10.
- [17] Spears N, Baker S, Srsen V, Lapping R, Mullan J, Nelson R, et al. Mouse ovarian follicles secrete factors affecting the growth and development of like-sized ovarian follicles in vitro. *Biol Reprod* 2002;67:1726–33.
- [18] Demeestere I, Delbaere A, Gervy C, van Den Bergh M, Devreker F, Englert Y. Effect of preantral follicle isolation technique on in vitro follicular growth, oocyte maturation and embryo development in mice. *Hum Reprod* 2002;17:2152–9.
- [19] Torrance C, Telfer E, Gosden RG. Quantitative study of the development of isolated mouse pre-antral follicles in collagen gel culture. *J Reprod Fertil* 1989;87:367–74.
- [20] Kreeger PK, Deck JW, Woodruff TK, Shea LD. The in vitro regulation of ovarian follicle development using alginate-extracellular matrix gels. *Biomaterials* 2006;27:714–23.
- [21] Mousset-Simeon N, Jouannet P, Le Cointre L, Coussieu C, Poirot C. Comparison of three in vitro culture systems for maturation of early preantral mouse ovarian follicles. *Zygote* 2005;13:167–75.
- [22] Smitz J, Cortvrindt R. Follicle culture after ovarian cryostorage. *Maturitas* 1998;30:171–9.
- [23] Cortvrindt R, Hu Y, Liu J, Smitz JE. Timed analysis of the nuclear maturation of oocytes in early preantral mouse follicle culture supplemented with recombinant gonadotropin. *Fertil Steril* 1998;70:1114–25.
- [24] Rose UM, Hanssen RG, Kloosterboer HJ. Development and characterization of an in vitro ovulation model using mouse ovarian follicles. *Biol Reprod* 1999;61:503–11.
- [25] Boland NI, Humpherson PG, Leese HJ, Gosden RG. The effect of glucose metabolism on murine follicle development and steroidogenesis in vitro. *Hum Reprod* 1994;9:617–23.
- [26] Qvist R, Blackwell LF, Bourne H, Brown JB. Development of mouse ovarian follicles from primary to preovulatory stages in vitro. *J Reprod Fertil* 1990;89:169–80.
- [27] Pedersen T. Determination of follicle growth rate in the ovary of the immature mouse. *J Reprod Fertil* 1970;21:81–93.
- [28] Mitchell LM, Kennedy CR, Hartshorne GM. Effects of varying gonadotrophin dose and timing on antrum formation and ovulation efficiency of mouse follicles in vitro. *Hum Reprod* 2002;17:1181–8.
- [29] Demeestere I, Centner J, Gervy C, Englert Y, Delbaere A. Impact of various endocrine and paracrine factors on in vitro culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction* 2005;130:147–56.
- [30] Murray AA, Molinek MD, Baker SJ, Kojima FN, Smith MF, Hillier SG, et al. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles in vitro. *Reproduction* 2001;121:89–96.
- [31] Eppig JJ, O'Brien MJ, Pendola FL, Watanabe S. Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown in vitro: follicle-stimulating hormone and insulin. *Biol Reprod* 1998;59:1445–53.
- [32] O'Shaughnessy PJ, McLelland D, McBride MW. Regulation of luteinizing hormone-receptor and follicle-stimulating hormone-receptor messenger ribonucleic acid levels during development in the neonatal mouse ovary. *Biol Reprod* 1997;57:602–8.
- [33] Halpin DM, Charlton HM, Faddy MJ. Effects of gonadotrophin deficiency on follicular development in hypogonadal (hpg) mice. *J Reprod Fertil* 1986;78:119–25.
- [34] Abel MH, Wootton AN, Wilkins V, Huhtaniemi I, Knight PG, Charlton HM. The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology* 2000;141:1795–803.
- [35] Cortvrindt R, Smitz J, van Steirteghem AC. Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture in vitro. *Hum Reprod* 1997;12:759–68.
- [36] Adriaens I, Cortvrindt R, Smitz J. Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects on folliculogenesis and oocyte developmental competence. *Hum Reprod* 2004;19:398–408.
- [37] Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 1999;140:5789–96.
- [38] Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, et al. Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001;142:4891–9.
- [39] Lee WS, Yoon SJ, Yoon TK, Cha KY, Lee SH, Shimasaki S, et al. Effects of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on primordial follicular growth in the mouse ovary. *Mol Reprod Dev* 2004;69:159–63.
- [40] Yoshida H, Takakura N, Kataoka H, Kunisada T, Okamura H, Nishikawa SI. Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Dev Biol* 1997;184:122–37.
- [41] Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J, Bernex F, Panthier JJ, Driancourt MA. Alterations in ovarian function of mice with reduced amounts of KIT receptor. *Reproduction* 2001;121:229–37.
- [42] Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J, Driancourt MA. Effects of Kit Ligand and anti-Kit antibody on growth of cultured mouse preantral follicles. *Mol Reprod Dev* 2000;56:483–94.
- [43] Knight PG, Glistler C. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction* 2001;121:503–12.
- [44] Smitz J, Cortvrindt R, Hu Y, Vanderstichele H. Effects of recombinant activin A on in vitro culture of mouse preantral follicles. *Mol Reprod Dev* 1998;50:294–304.
- [45] Yokota H, Yamada K, Liu X, Kobayashi J, Abe Y, Mizunuma H, et al. Paradoxical action of activin A on folliculogenesis in immature and adult mice. *Endocrinology* 1997;138:4572–6.
- [46] Demeestere I, Gervy C, Centner J, Devreker F, Englert Y, Delbaere A. Effect of insulin-like growth factor-I during preantral follicular culture on steroidogenesis, in vitro oocyte maturation, and embryo development in mice. *Biol Reprod* 2004;70:1664–9.
- [47] Eppig JJ, Wigglesworth K. Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown in vitro: oxygen concentration. *Mol Reprod Dev* 1995;42:447–56.

- [48] Hu Y, Betzendahl I, Cortvrindt R, Smitz J, Eichenlaub-Ritter U. Effects of low O<sub>2</sub> and ageing on spindles and chromosomes in mouse oocytes from pre-antral follicle culture. *Hum Reprod* 2001;16:737–48.
- [49] Gosden RG, Byatt-Smith JG. Oxygen concentration gradient across the ovarian follicular epithelium: model, predictions and implications. *Hum Reprod* 1986;1:65–8.
- [50] Clark AR, Stokes YM, Lane M, Thompson JG. Mathematical modelling of oxygen concentration in bovine and murine cumulus-oocyte complexes. *Reproduction* 2006;131:999–1006.
- [51] Pesty A, Miyara F, Debey P, Lefevre B, Poirot C. Multiparameter assessment of mouse oogenesis during follicular growth in vitro. *Mol Hum Reprod* 2007;13:3–9.
- [52] Kerjean A, Couvert P, Heams T, Chalas C, Poirier K, Chelly J, et al. In vitro follicular growth affects oocyte imprinting establishment in mice. *Eur J Hum Genet* 2003;11:493–6.
- [53] Martins OG, Pesty A, Gouveia-Oliveira A, Cidadao AJ, Plancha CE, Lefevre B. Oocyte Ca<sup>2+</sup> spike acquisition during in vitro development of early preantral follicles: influence of age and hormonal supplementation. *Zygote* 2002;10:59–64.
- [54] Reynaud K, Driancourt MA. Specificities of prepubertal follicles and oocytes. *Gynecol Obstet Fertil* 2002;30:814–6.
- [55] Hovatta O, Wright C, Krausz T, Hardy K, Winston RM. Human primordial, primary and secondary ovarian follicles in long-term culture: effect of partial isolation. *Hum Reprod* 1999;14:2519–24.
- [56] Wright CS, Hovatta O, Margara R, Trew G, Winston RM, Franks S, et al. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in vitro growth of human ovarian follicles. *Hum Reprod* 1999;14:1555–62.
- [57] Abir R, Franks S, Mobberley MA, Moore PA, Margara RA, Winston RM. Mechanical isolation and in vitro growth of preantral and small antral human follicles. *Fertil Steril* 1997;68:682–8.
- [58] Sadeu JC, Cortvrindt R, Ron-El R, Kasterstein E, Smitz J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured frozen-thawed human fetal ovarian tissue. *Fertil Steril* 2006;85(Suppl. 1):1130–41.
- [59] Carlsson IB, Scott JE, Visser JA, Ritvos O, Themmen AP, Hovatta O. Anti-mullerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. *Hum Reprod* 2006;21:2223–7.
- [60] Carlsson IB, Laitinen MP, Scott JE, Louhio H, Velentzis L, Tuuri T, et al. Kit ligand and c-Kit are expressed during early human ovarian follicular development and their interaction is required for the survival of follicles in long-term culture. *Reproduction* 2006;131:641–9.
- [61] Hreinsson JG, Scott JE, Rasmussen C, Swahn ML, Hsueh AJ, Hovatta O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:316–21.
- [62] Wandji SA, Srsen V, Nathanielsz PW, Eppig JJ, Fortune JE. Initiation of growth of baboon primordial follicles in vitro. *Hum Reprod* 1997;12:1993–2001.
- [63] Sun F, Betzendahl I, Shen Y, Cortvrindt R, Smitz J, Eichenlaub-Ritter U. Preantral follicle culture as a novel in vitro assay in reproductive toxicology testing in mammalian oocytes. *Mutagenesis* 2004;19:13–25.
- [64] Hasegawa A, Mochida N, Ogasawara T, Koyama K. Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by in vitro growth, in vitro maturation, and in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2006;86(Suppl 4):1182–92.