

Université du Québec  
Institut national de la recherche scientifique  
INRS-Institut Armand-Frappier

CARACTÉRISATION DE LA TOXICITÉ OVARIENNE DE MÉTABOLITES DU  
CYCLOPHOSPHAMIDE *IN VITRO*

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès science (M.Sc.) en  
Sciences expérimentales de la santé

**Par**  
PATRICE DESMEULES

**Jury d'évaluation**

Directeur de recherche :	Dr Patrick J. Devine INRS-Institut Armand-Frappier
Évaluateur interne :	Dr Michel Charbonneau INRS-Institut Armand-Frappier
Évaluateur externe :	Dr Bernard Robaire, Département de Pharmacologie et de Thérapeutique Université McGill







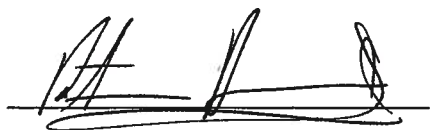
## Résumé

Les tendances actuelles de fertilité dans les sociétés occidentales sont telles que les femmes ont moins d'enfants et reportent à plus tard la venue de leur premier. Dans ce contexte d'allongement de la période où des xénobiotiques peuvent interférer avec les gonades avant la conception surgit le besoin croissant d'avoir les outils pour mieux évaluer les dommages potentiellement causés aux gamètes femelles. L'ovaire est ainsi fait qu'il contient un nombre fini de follicules dormants non renouvelables (primordiaux) qui s'épuise progressivement jusqu'à la ménopause. Les ovocytes qui s'y trouvent à l'état quiescent peuvent perdurer ainsi plusieurs années et risquent de subir des atteintes multiples avant d'être ovulés.

Plusieurs xénobiotiques ont été identifiés comme ayant le potentiel d'entraîner spécifiquement une perte accélérée des follicules dormants. De cette perte, qui est irréversible, peuvent surgir l'infertilité et une apparition prématurée de la ménopause; en effet, ces follicules entretiennent le pool de follicules en croissance qui soutiennent la fonction ovarienne. Ces conséquences sont fréquemment observées chez les survivantes de traitements de radiochimiothérapie. Les agents y étant utilisés, particulièrement la radiation ionisante et les agents alkylants, affectent des follicules ovariens de divers stades, mais les follicules primordiaux y sont particulièrement sensibles. Bien que l'incidence des effets de ces traitements assez répandus soit relativement bien décrite, le mécanisme spécifique pour expliquer la dégénérescence des follicules dormants demeure incompris. Cela est du en grande partie à la difficulté éprouvée à isoler des fractions pures de ces petits follicules, éparpillés au travers de la masse de follicules en croissance, pour mener de telles études.

Dans cette étude, un système de culture d'ovaires néonataux de souris a été utilisé pour caractériser la toxicité ovarienne d'un des agents alkylants les plus couramment utilisés en chimiothérapie, le cyclophosphamide (CPA). Les ovaires à ce stade donnent justement accès à une grande proportion de follicules primordiaux. Ils pourraient donc s'avérer précieux pour mener des investigations plus approfondies sur les mécanismes sous-jacents à la dégénération de ces follicules, par ce composé et d'autres. Cette étude a tenté d'établir les conditions pour étudier ces mécanismes *in vitro*. La comparaison de la toxicité de différents métabolites du CPA chez la

souris a permis de voir que l'on pouvait reproduire les effets de cet agent sur les petits follicules en utilisant directement la moutarde phosphoramidée (MP). Par ailleurs, le potentiel ovotoxique d'un produit de dégradation volatile de la MP a également été soulevé. Les effets de la MP ont ensuite été caractérisés dans le temps pour montrer que la dégénérescence des petits follicules était assez rapide (24 à 72 h) et qu'elle se soldait par la fragmentation de l'ADN. Cependant, des différences de réaction des cellules somatiques et germinales ont été notées en fonction du stade folliculaire en histologie normale. Il en fut de même quant à la localisation d'un marqueur de l'apoptose, la caspase 3 activée, qui fut détectée presque exclusivement dans les cellules somatiques des follicules activés. La comparaison de la toxicité de la MP entre la souris et le rat a par ailleurs été entreprise. Les résultats, présentés en annexe, ont confirmé l'existence d'une grande différence de sensibilité des follicules primordiaux entre ces deux espèces. Cependant, ils suggèrent qu'elle ne soit pas due à des divergences dans le métabolisme général du CPA, tel que proposé auparavant, mais à des différences physiologiques d'origine cellulaire. L'investigation de ces bases cellulaires a été amorcée avec le système *in vitro* en regardant si les ovocytes pouvaient détecter des cassures d'ADN. Les résultats disponibles en annexe suggèrent qu'il existe des différences dans la capacité de réparer de telles lésions en fonction de l'état d'activation de l'ovocyte. Ainsi, les résultats obtenus lors de cette étude ont permis de poser quelques conditions qui pourront mener à des investigations plus poussées des mécanismes de la toxicité du CPA dirigée envers les follicules primordiaux avec l'aide du système de culture d'ovaires néonataux.



Patrice Desmeules  
Étudiant



Patrick J. Devine  
Directeur de recherche

## Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, Patrick J. Devine. Par ses conseils prodigués avec générosité, sa patience, sa confiance et sa complicité, il a su faire que cette expérience de recherche soit profitable en plus d'être formatrice.

Je voudrais aussi souligner le support de mes collègues de laboratoire, Sukhdeep Kaur Sahambi et Souad Meftah.

Je souhaite également remercier Messieurs Charbonneau et Robaire pour leurs généreux conseils quant à l'organisation de la rédaction de ce mémoire.

Enfin, je voudrais exprimer ma reconnaissance au Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada pour le soutien financier pendant la durée de mes études.

## Table des matières

Résumé .....	iii
Remerciements .....	v
Table des matières .....	vi
Liste des abréviations .....	viii
Liste des figures .....	ix
Liste des tableaux .....	ix
Section I : Revue de littérature .....	1
Introduction .....	1
1 Fonction et développement des follicules ovariens.....	3
1.1 Implication du follicule dans la fonction ovarienne.....	3
1.1.1 Cellules somatiques du follicule ovarien .....	4
1.1.2 Assemblage des follicules primordiaux .....	5
1.1.3 Transition des follicules du stade primordial au stade primaire.....	7
1.1.4 Poursuite de la folliculogenèse et atrophie .....	8
1.1.5 Durée de la folliculogenèse .....	10
1.1.6 Étude des follicules préantraux en culture .....	11
1.2 Cinétique du nombre de follicules primordiaux.....	12
1.2.1 Épuisement de la réserve folliculaire chez la femme .....	13
2 Mécanismes et effecteurs de la mort cellulaire dans l’ovaire .....	16
2.1 Introduction à la mort cellulaire programmée.....	16
2.2 Apoptose et fonction ovarienne.....	18
2.2.1 Dégénérescence des ovocytes avant l’assemblage des follicules.....	18
2.2.2 Dégénérescence folliculaire au stade postnatal.....	19
2.2.2.1 Dégénérescence des plus grands follicules .....	20
2.2.2.2 Dégénérescence des follicules immatures.....	21
3 Perturbation de la fonction et du développement folliculaire par les xénobiotiques .....	24
3.1 Toxicité dirigée vers les follicules en croissance .....	24
3.2 Toxicité dirigée vers les follicules primordiaux.....	25
3.3 Métabolisme des produits toxiques dans l’ovaire .....	27
3.4 Connaissances reliées à la destruction des follicules préantraux par des agents toxiques ...	28



3.4.1 Implication de la voie apoptotique dans la mort des follicules préantraux .....	28
3.4.2 Implication du récepteur de l'aryl hydrocarbone .....	30
3.5 Apoptose dans les ovocytes ovulés après exposition à la doxorubicine .....	31
4 Perturbation de la fonction reproductrice de la femme .....	33
4.1 Insuffisance ovarienne (ménopause) précoce .....	33
4.1.1 Conséquences de l'insuffisance ovarienne précoce sur la santé de la femme.....	34
4.2 Facteurs de prédisposition à l'insuffisance ovarienne précoce .....	34
4.3 Chimiothérapie et fonction reproductrice de la femme.....	35
4.3.1 Incidence des troubles de la fonction ovarienne après chimiothérapie.....	37
4.3.2 Facteurs du pronostic de la fonction ovarienne après chimiothérapie .....	40
4.3.3 Évaluation clinique de la réserve folliculaire .....	41
4.4 Pathophysiologie des dommages ovariens causés par la chimiothérapie .....	42
5 Usage du cyclophosphamide et effets sur la fonction ovarienne .....	43
5.1 Utilisation du cyclophosphamide .....	43
5.2 Paramètres de la pharmacocinétique du cyclophosphamide .....	43
5.3 Métabolisme du cyclophosphamide .....	44
5.4 Toxicité ovarienne du cyclophosphamide.....	49
6 Objectifs .....	51
Section II : Article.....	53
Résumé en français de l'article .....	53
Contribution des co-auteurs .....	54
Discussion générale et conclusions .....	67
Références .....	80
Annexe 1 : Effets de la moutarde phosphoramidée sur le nombre de follicules préantraux d'ovaires néonataux cultivés de rat .....	100
Annexe 2 : Détection de la forme phosphorylée de H2AX dans des ovaires exposés à la moutarde phosphoramidée in vitro.....	102

## Liste des abréviations

ADH : Alcool déshydrogénase  
AGT : O<sup>6</sup>-alkylguanine-ADN-alkyltransférase  
AHR : Récepteur de l'aryl hydrocarbure (*Aryl Hydrocarbon Receptor*)  
ALDH : Aldéhyde déshydrogénase  
ANF :  $\alpha$ -naphthoflavone  
AMH : *anti-Mullerian hormone*  
AP : Aldophosphamide  
Apaf-1 : *Apoptosis activating factor 1*  
ATM : *ataxia-telangiectasia mutated*  
Bad : *Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter*  
B(a)P : Benzo- $\alpha$ -pyrène  
Bax : *Bcl-2 X associated factor*  
Bcl-2, Bcl-xl : *B cell lymphoma*  
Caspase : *Cysteinylnl aspartate-specific protease*  
CEZ : chloroéthylaziridine  
CHO : *Chinese Hamster Ovary*  
CPA : cyclophosphamide  
CPM : carboxyphosphamide  
CYP : cytochrome P450  
DFF : *DNA fragmentation factor*  
DMBA : diméthylbenz[ $\alpha$ ]anthracène  
EGF : *epidermal growth factor*  
FADD : *Fas-associated death domain*  
FSH : *follicle stimulating hormone*  
GST : Glutathion-s-transférase  
Gy : Gray  
HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique  
HHO : hypothalamo-hypophysio-ovarien  
IGF : *insulin-like growth factor*  
IOP : insuffisance ovarienne précoce  
LH : *luteinizing hormone*  
Mcl-1 : myeloid cell leukemia sequence 1 (*Bcl-2-related*)  
MP : moutarde phosphoramidée  
PARP : Poly-(ADP)-ribose polymérase  
p.ex : par exemple  
TCDD : 2,3,7,8-tétra-chloro-*p*-dioxine  
TUNEL : *Terminal UTP Nucleotide End Labelling*  
VCD : vinylcyclohexène diepoxide  
VCH : vinylcyclohexène  
3-MC : 3-méthylchloranthrène  
4HC : 4-hydroperoxyphosphamide  
4-OH-CPA : 4-hydroxyphosphamide  
4-KTCP : 4-ketophosphamide

## Liste des figures

Figure 1: Illustration du follicules ovarien et de ses couches de cellules somatiques .....	4
Figure 2 : Dénomination des stades folliculaires traversés lors de la folliculogenèse.....	9
Figure 3 : Paramètres de fertilité chez la femme associés au nombre de follicules présents dans l'ovaire .....	14
Figure 4 : Schéma simplifié de certains éléments impliqués dans l'apoptose .....	17
Figure 5 : Différents représentants des moutardes azotées .....	44
Figure 6 : Principaux événements impliqués dans le métabolisme du cyclophosphamide.....	46
Figure 7 : Deux voies de détoxification du cyclophosphamide .....	47
Figure 8 : Alkylation d'une guanine par une moutarde azotée .....	48
Figure 9 : Schéma d'effets observés et d'interrogations concernant l'action de la MP dans les follicules ovariens .....	79
Figure 10 (Annexe 1): Nombre de petits follicules d'ovaires de rat cultivés 8 jours après une exposition à différentes concentrations de moutarde phosphoramidée.....	101
Figure 11 (Annexe 2): Immunomarquage pour $\gamma$ -H2AX dans des ovaires de souris CD-1 néonatales exposés <i>in vitro</i> à la moutarde phosphoramidée. ....	110
Figure 12 (Annexe 2): Distribution du nombre d'ovocytes de follicules primordiaux et primaires petits selon le nombre de foyers de $\gamma$ -H2AX qu'ils contenaient à la suite d'exposition à la moutarde phosphoramidée .....	110

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux facteurs de régulation du développement des follicules primordiaux.....	8
Tableau 2 : Étiologie de l'insuffisance ovarienne précoce .....	35
Tableau 3 : Degré de risque d'insuffisance gonadique associé avec les agents chimiothérapeutiques .....	37
Tableau 4 (Annexe 2): Proportion de follicules présentant des ovocytes avec plus de 5 foyers de $\gamma$ -H2AX en fonction de la concentration et du temps après des expositions de Moutarde Phosphoramidée à des ovaires néonataux en culture .....	107



## Section I : revue de littérature

### Introduction

L'ovaire joue le rôle de pivot dans la fonction reproductrice de la femme par la production d'hormones et la délivrance des gamètes femelles (ovocytes). La fonction de cet organe repose sur la présence des follicules ovariens. Ce sont ces structures qui supportent le développement, la maturation et l'ovulation des ovocytes. Or, l'ovaire contient une réserve non renouvelable de follicules à l'état dormant, les follicules primordiaux. Plusieurs agents détruisent les ovocytes inclus dans les follicules de ce stade, causant ainsi des dommages irréversibles. En effet, on considère que lorsqu'un follicule primordial est détruit, il ne peut être remplacé. Ainsi, leur destruction peut entraîner l'épuisement prématuré de la réserve de follicules et se traduire par de l'infertilité et la rupture de la fonction ovarienne (ménopause) de façon précoce.

L'insuffisance ovarienne précoce est une conséquence commune des traitements de radiochimiothérapie contre le cancer et certaines maladies autoimmunes. De fait, parmi les différents agents utilisés lors de ces traitements, plusieurs causent des effets délétères sur les follicules dormants. La toxicité ovarienne de l'un des plus largement utilisés d'entre eux, le cyclophosphamide (CPA), a déjà été caractérisée *in vivo* chez les rongeurs. Les follicules primordiaux présentent divers degrés de résistance à cet agent selon l'espèce et la souche utilisée. Ces variations ont été attribuées à des différences dans la bioactivation de ce promédicament. Malgré tout, le mécanisme de destruction des follicules quiescents demeure incompris. Ce manque réside en partie dans la difficulté à avoir accès à un nombre suffisant de follicules primordiaux, qui, de par leur taille, n'occupent qu'une très faible proportion de la masse tissulaire ovarienne au stade adulte.

L'absence de moyens cliniques non invasifs pour évaluer la réserve ovarienne limite la capacité à prédire l'issue de la fonction reproductrice de la femme après des expositions à des agents ovotoxiques. Cela nous pousse à tenter d'approfondir la compréhension des mécanismes sous-jacents à la destruction des ovocytes, notamment par le CPA. Cela pourrait, d'une part,

permettre de préserver la fonction ovarienne du nombre croissant de survivantes aux traitements contre le cancer et d'autre part, mieux évaluer la santé des gamètes y ayant résisté.

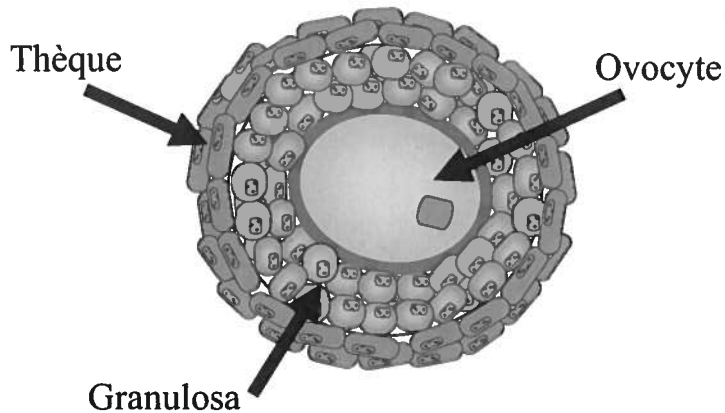
Les prochaines sections visent, en premier lieu, à présenter l'importance des follicules, notamment les follicules primordiaux, dans l'accomplissement de la fonction ovarienne. Ensuite, elles présenteront les connaissances ayant trait à la dégénérescence naturelle des follicules ovariens, puis celles rattachées à la destruction folliculaire induite par des xénobiotiques. Enfin, les impacts de l'ovotoxicité sur la fonction reproductrice de la femme seront présentés, de même que les caractéristiques du CPA et ses effets connus sur l'ovaire.

# 1 Fonction et développement des follicules ovariens

## 1.1 Implication du follicule dans la fonction ovarienne

L'ovaire joue deux rôles importants dans l'organisme. L'un d'eux est d'assurer le développement et la délivrance des gamètes femelles (par l'ovulation) pour que la fertilisation puisse avoir lieu. L'autre consiste à produire des hormones, dont l'inhibine et les stéroïdes ovariens, qui sont essentielles pour assurer le développement des ovocytes, exercer un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, préparer le corps de la mère et soutenir l'établissement et le maintien des premiers stades embryonnaires lors de la grossesse (Hirshfield, 1991).

Le développement et la maturation des ovocytes s'effectuent au sein d'une structure appelée le follicule, dans lequel la cellule germinale est entourée et supportée par des cellules somatiques de deux types (Figure 1). Un développement folliculaire adéquat, au cours duquel le follicule dormant est activé et traverse différentes étapes de croissance, est essentiel pour mener au succès le processus d'ovulation. C'est au sein même du follicule et de ses restes, le *corpus luteum*, que seront produits l'estradiol et la progestérone. Ces deux stéroïdes capitaux sont produits sous l'action des gonadotrophines hypophysaires FSH et LH. Ils participent activement à l'orchestration du cycle menstruel en interagissant avec l'endomètre utérin et en exerçant une rétroaction sur l'axe hypothalamo-hypophysaire pour réguler la production de la GnRH hypothalamique et des gonadotrophines. Le follicule constitue donc une unité reproductrice fondamentale au sein de l'ovaire. L'assemblage et le développement de ces unités constituent ainsi des aspects critiques de la fonction reproductrice féminine (Hirshfield, 1991).



**Figure 1:** Illustration du follicule ovarien et de ses couches de cellules somatiques

### 1.1.1 Cellules somatiques du follicule ovarien

Une des nécessités pour la reproduction est la capacité des cellules somatiques présentes dans la gonade à contrôler et maintenir le processus de gamétogenèse. Dans l'ovaire, deux types de cellules somatiques entourent l'ovocyte et participent au développement du follicule, ou folliculogenèse; il s'agit des cellules de la granulosa, couche qui borde immédiatement l'ovocyte, et celles de la thèque, plus à l'extérieur (Figure 1). Ces cellules constituent le site d'action et de synthèse de plusieurs facteurs et hormones qui participent à la régulation complexe et mal comprise du développement folliculaire en interagissant directement au niveau du follicule et aussi dans l'axe hypothalamo-hypophysaire (Hirshfield, 1991).

Les cellules de la granulosa, de part leur proximité, fournissent à l'ovocyte le support physique et le microenvironnement requis pour son développement. Elles traversent plusieurs états de différenciation au cours du développement folliculaire, en passant de la quiescence dans les follicules primordiaux à la lutéinisation dans les *corpus luteum*, via le stade pré-ovulatoire où elles synthétisent de grandes quantités d'estradiol. Cette différenciation résulte de l'action de plusieurs hormones. De nombreux récepteurs spécifiques y ont été repérés, dont ceux pour les gonadotrophines LH et FSH, et ceux pour quelques facteurs impliqués dans la régulation du développement des follicules préantraux (EGF, AMH, IGF, notamment) (Skinner, 2005). La biosynthèse des stéroïdes y ayant lieu au cours de certaines parties de la folliculogenèse est régulée principalement par l'action de la FSH. Juste avant l'ovulation, la LH contrôle la capacité



de ces cellules à synthétiser les progestines. Ce rôle important des gonadotrophines sur les cellules de la granulosa aux stades avancés de développement folliculaire contraste avec les premiers stades de follicules, où ces cellules sont indépendantes des gonadotrophines et des hormones stéroïdiennes (Hirshfield, 1991).

Les cellules qui forment la thèque, quant à elles, sont issues du stroma ovarien. La couche la plus interne de cette structure est séparée des cellules externes de la granulosa par une membrane basale. Leur rôle principal consiste à produire des androgènes à partir du cholestérol afin d'alimenter les cellules de la granulosa qui les transforment en estrogènes aux stades avancés de développement. Au stade du follicule primordial, les cellules de la thèque ne sont pas présentes. Leur recrutement, qui est critique, s'effectuerait vers le stade primaire chez le rat (Skinner, 2005). Chez la souris, les premières cellules de la thèque reconnaissables apparaissent seulement quand le follicule a acquis 2 à 3 couches de cellules de la granulosa (Peters, 1969). À ces étapes de la folliculogénèse, elles sont comme leurs voisines de la granulosa, indépendantes des gonadotrophines et des stéroïdes, qu'elles ne synthétisent qu'à des stades ultérieurs de développement (Hirshfield, 1991).

### **1.1.2 Assemblage des follicules primordiaux**

L'histogénèse des follicules primordiaux n'a pas été décrite clairement mais repose sur l'organisation des cellules somatiques autour d'un ovocyte quiescent. Au cours de la période embryonnaire, les lignées de cellules germinales s'établissent dans la gonade et prolifèrent en formant éventuellement des regroupements appelés des nids d'ovocytes. Les cellules germinales sont transformées en ovocytes lorsque les ovogonies arrêtent de proliférer et entament la méiose. L'ovocyte traverse les premiers stades de la prophase I de la méiose mais arrête sa progression au stade diplotène. Il demeure dans cet état pendant toute la folliculogénèse jusqu'à l'ovulation, où la méiose reprend son cours. Ce n'est que tard dans le développement fœtal chez la femme et tôt dans la période post-natale chez les rongeurs que l'assemblage des follicules primordiaux en tant que tel s'effectuera (Hirshfield, 1991). L'apoptose s'enclencherait apparemment aléatoirement parmi certains ovocytes au sein des nids, vraisemblablement sous l'effet du *Tumor necrosis factor- $\alpha$*  (Morrison et Marcinkiewicz, 2002). Ensuite, les ovocytes restants, isolés, s'associeraient avec des cellules squameuses, précurseurs des cellules de la granulosa. Ces

cellules somatiques, à l'intérieur et à l'extérieur des regroupements d'ovocytes, proliféreraient pendant la période de formation des follicules primordiaux, mais deviendraient également quiescentes une fois incluses dans ceux-ci (Hirshfield, 1991). Chaque follicule primordial est ceinturé par sa propre membrane basale, probablement synthétisée par les cellules de prégranulosa. Cet assemblage serait entravé par des niveaux élevés de progestérone et d'estradiol. *In vitro*, un ajout de progestérone s'avérerait en mesure de réduire l'incidence de l'apoptose des ovocytes de rats au sein des nids (Kezele et Skinner, 2003). Chez le rat, un déclin des niveaux d'estradiol, de par la séparation de la mère, précède justement les jours post-natals deux et trois, où cet assemblage s'effectue (Montano *et al.*, 1995).

Le nombre de follicules primordiaux établi à la naissance dépend en partie de la durée et du taux de prolifération des ovogonies en mitose. Chez les mammifères, le nombre maximal de cellules germinales implantées dans l'ovaire est observé autour du point de transition de la mitose à la méiose des ovogonies (Reynaud et Driancourt, 2000). L'entrée en méiose des ovogonies coïncide également avec une mort massive de cellules germinales. Une autre perte importante d'ovocytes s'effectue lors d'une période de dégénération des follicules primordiaux suivant de peu la période de leur assemblage (Reynaud et Driancourt, 2000). Pour témoigner de l'importance de la dégénération des ovocytes, notons que chez la femme, le nombre de follicules primordiaux implantés à la naissance ne constitue que 20 % du nombre de cellules germinales observées maximalement (Baker, 1963). Chez la souris, seulement 8000 follicules primordiaux seront formés à partir des 85 000 cellules germinales présentes au jour embryonnaire 18.5 (Hirshfield, 1991).

Les follicules primordiaux consistent donc en un seul ovocyte entouré généralement d'une couche de cellules de prégranulosa aplaties, le tout cerné par une membrane basale. Les cellules de ces follicules quiescents démontrent peu de signes d'activité biosynthétique. Ils évoluent dans le stroma ovarien, sans cellules de la thèque apparentes ou de tissu mésenchymateux organisé pour les entourer, ni réseau indépendant de capillaires sanguins (Hirshfield, 1991).

Les femelles naissent avec une grande réserve de ces follicules primordiaux dormants. La plupart de la documentation scientifique suggère que cette banque constitue le seul

approvisionnement de follicules qui pourront se développer jusqu'au processus d'ovulation pendant toute la durée de la vie reproductrice de la femme (Hirshfield, 1991). Toutefois, une équipe a récemment reporté la présence potentielle d'une population de cellules souches de lignée germinale dans l'épithélium de surface de l'ovaire et suggéré qu'elles pourraient contribuer à remplacer rapidement les follicules ayant dégénéré (Johnson *et al.*, 2004). Ces auteurs ont par la suite proposé que ces cellules souches de lignée germinales dérivées de la moelle osseuse immigreraient de façon continue dans les ovaires de souris (Johnson *et al.*, 2005). Ces observations suggèrent qu'il soit possible que cette population de cellules souches puisse fournir un apport continu de follicules primordiaux, mais elles sont loin de faire l'unanimité (Greenfeld et Flaws, 2004; Gosden, 2004; Telfer *et al.*, 2005; Gougeon, 2005). Ces critiques soulèvent que davantage de preuves, tout comme des corroborations indépendantes des résultats présentés, seront nécessaires pour confirmer cette idée et remiser le paradigme du pool non renouvelable de follicules primordiaux. La compréhension actuelle de la physiologie ovarienne s'accommode mieux de l'idée d'un stock fini d'ovocytes instauré tôt dans le développement de l'organisme.

### **1.1.3 Transition des follicules du stade primordial au stade primaire**

Certains follicules primordiaux demeurent à l'état quiescent pendant presque toute la vie de la femme tandis que d'autres amorcent leur développement aussitôt qu'ils sont formés. La première étape de la folliculogenèse est la transition du stade primordial vers le stade primaire (Figure 2). Cette transition est marquée par deux événements principaux. En premier lieu, il s'effectue un changement dans la morphologie et l'activité des cellules de la granulosa, qui passent d'un état squameux à cuboïde. Ensuite, les volumes cytoplasmique et nucléaire de l'ovocyte augmentent et la synthèse d'une couche protéique autour de l'ovocyte (la *zona pellucida*) s'amorce. Le résultat consiste en un follicule plus grand contenant des cellules de la granulosa arrondies (Hirshfield, 1991; Skinner, 2005). Le vocable «primaire» est employé pour identifier ces follicules jusqu'à ce qu'ils aient moins de deux rangs complets de cellules dans la granulosa. Lorsqu'il y a deux ou plus de ces rangs, le follicule est dit «secondaire».

Les facteurs qui régulent l'activation des follicules primordiaux seraient en bonne partie produits dans l'ovaire même, par les cellules de différents stades folliculaires. La compréhension actuelle de ce processus suggère qu'il soit indépendant des gonadotrophines et de la plupart des

autres hormones extraovariennes. Le Tableau 1 présente les principaux facteurs de régulation de ce phénomène, qui demeure malgré tout assez mal compris.

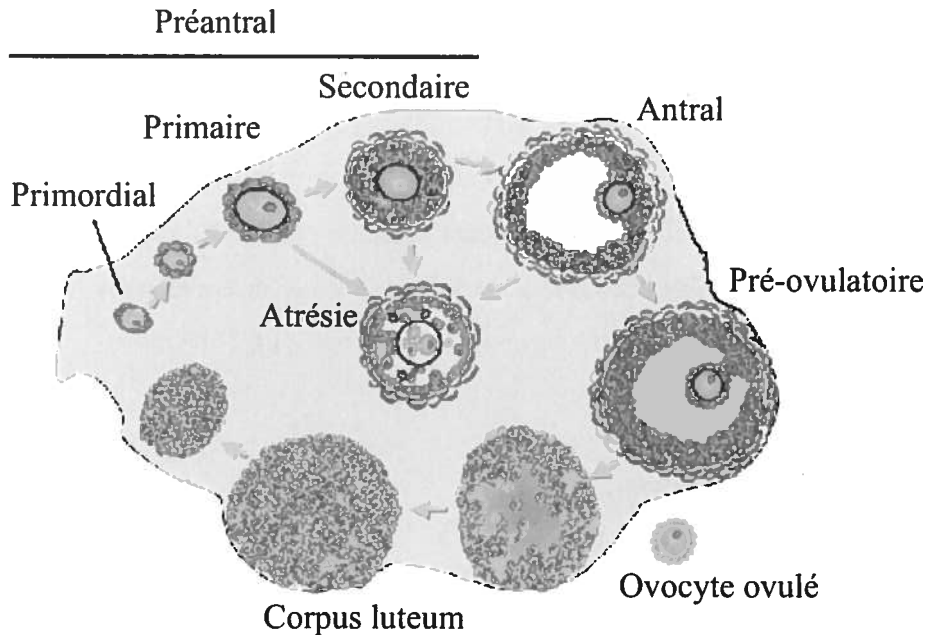
**Tableau 1 : Principaux facteurs de régulation du développement des follicules primordiaux**  
Adapté de Skinner (2005)

<b>Facteur de régulation</b>	<b>Source cellulaire</b>	<b>Site d'action cellulaire</b>	<b>Effet</b>
<i>Tumour necrosis factor alpha</i>	Ovocyte	Ovocyte	Apoptose
<i>Basic fibroblast growth factor</i>	Ovocyte	Granulosa, thèque, stroma	Promeut la transition primordial/primaire
<i>Kit ligand</i>	Granulosa	Ovocyte, thèque, stroma	Promeut la transition primordial/primaire
<i>Leukaemia inhibitory factor</i>	Granulosa	Ovocyte, granulosa	Promeut la transition primordial/primaire
<i>Keratinocyte growth factor</i>	Thèque	Granulosa	Promeut la transition primordial/primaire
<i>Bone morphogenic protein-4</i>	Thèque, stroma	Granulosa	Promeut la transition primordial/primaire Survie de l'ovocyte
<i>Growth differentiation factor 9</i>	Ovocyte	Granulosa	Développement des follicules primaires
Insuline	Endocrine	Ovocyte	Antagoniste de l'effet du KL
Hormone Anti-Müllérienne	Follicule antral	Follicule primordial	Inhibe la transition primordial/primaire

#### 1.1.4 Poursuite de la folliculogénèse et atresie

Dans l'ovaire, un follicule qui amorce son développement s'engage nécessairement dans l'une ou l'autre de deux issues bien distinctes. Il peut poursuivre son développement jusqu'à la

fin et en arriver à l'ovulation, ou bien se dégrader par un processus de mort programmée appelé **atrésie** (Figure 2). En fait, la plupart des follicules (environ 99%) ne vont jamais se rendre au stade de l'ovulation et vont entreprendre l'atrésie. Ce phénomène peut s'enclencher à n'importe quel stade du développement folliculaire (Hirshfield, 1991).



**Figure 2** : Dénomination des stades folliculaires traversés lors de la folliculogénèse  
Tiré de Devine et Hoyer (2004)

Celui-ci constitue un *continuum* d'événements qui alimentent la maturation des différents types cellulaires du follicule (Hirshfield, 1991). Une fois le follicule primordial activé, son développement est orchestré par l'entremise de facteurs intra-ovariens jusqu'aux stades secondaires. Mais plus le follicule se développe, plus sa réceptivité à la FSH s'accroît (Gougeon, 1998). Cette hormone hypophysaire agit en tant qu'inducteur de première importance de la maturation des cellules de la granulosa. Cependant, la réponse de celles-ci dépend de leur état de maturation. La FSH peut y déclencher l'expression de récepteurs à la LH et de l'aromatase (synthèse d'estradiol) et permettre au follicule d'acquérir toute la machinerie nécessaire pour la maturation finale. À un certain stade de développement, une cavité remplie de fluides (antrum)

se développe au sein des couches de la granulosa; le follicule résultant est alors dit «antral». Finalement le follicule peut atteindre le stade préovulatoire, où les cellules de la granulosa sont différenciées et se divisent moins, prêt pour le pic de LH qui déclenchera l'expulsion de l'ovocyte (ovulation). À la suite de cet événement, les restes de cellules du follicule entreprennent une différenciation supplémentaire (lutéinisation) qui mène à la formation du *corpus luteum* et produisent de grandes quantités de progestérone nécessaire pour supporter l'implantation potentielle d'un embryon. Le développement des derniers stades folliculaire serait donc dirigé par la FSH et même beaucoup par la LH (Sullivan *et al.*, 1999), mais il impliquerait toujours des facteurs intra ovariens. Dans une boucle de rétroaction négative, la sécrétion de LH et de FSH dans l'hypophyse antérieure est notamment affectée par l'action inhibitoire du 17- $\beta$ -estradiol et de la progestérone. L'absence de ces deux hormones ovariennes provoque ainsi une hausse des niveaux de base de FSH et LH (Gougeon, 1998; Hirshfield, 1991).

### **1.1.5 Durée de la folliculogénèse**

La croissance des follicules aux premiers stades est très lente. Une étude a traduit cette lenteur en rapportant que 57% des follicules primordiaux ayant une cellule de la granulosa cuboïde, donc activée et marquée au bromodeoxyuridine lors d'une exposition de 7 jours à cet agent, ont persisté tels quels pendant les 150 jours qu'ont duré l'expérience (Meredith *et al.*, 2000). Cependant, une méthode de fertilisation *in vitro* a été établie à partir des follicules primordiaux et donne un estimé du temps (probablement minimal) requis pour le développement de petits follicules; elle permet la récolte d'ovocytes fertilisables après deux séries de culture (follicule entier, puis ovocyte séparé) variant entre 8 et 14 jours (O'Brien *et al.*, 2003). Chez le rat, le temps de doublement des cellules de la granulosa a été estimé à 7 jours avant l'atteinte de la première vingtaine de cellules autour de l'ovocyte (stade primaire) (Hirshfield, 1989). Le taux de prolifération de ces cellules augmenterait par la suite, proportionnellement avec la taille du follicule, pour atteindre un temps de doublement maximal de 24 h au stade antral. Mais le temps nécessaire pour que le nombre de cellules d'une section de follicule atteigne 32 est probablement plus grand que celui nécessaire pour passer des 32 aux 2500 cellules des follicules antraux (Hirshfield, 1991).

Malgré tout, la caractérisation temporelle de la folliculogenèse ne peut être décrite avec précision à cause de la variabilité engendrée par l'interaction de plusieurs facteurs régulant la prolifération des cellules folliculaires. De façon générale, la durée complète de la folliculogenèse est longue par rapport à la durée du cycle reproducteur de la femelle adulte. Elle s'échelonne sur plusieurs semaines chez les rongeurs et probablement sur plusieurs mois chez les animaux de plus grande taille. Chez la souris, par exemple, le développement complet d'un follicule varie entre 19 jours et 5 mois (Pedersen, 1970) pour un cycle d'oestrus de 4 jours. Chaque follicule progresse à travers les différents stades de follicule à un rythme différent, rythme déterminé par l'importante somme d'influences qui affectent le temps de génération des cellules de la granulosa (Hirshfield, 1991).

#### **1.1.6 Étude des follicules préantraux en culture**

Différents moyens ont été élaborés pour pallier à la difficulté d'étudier les petits follicules préantraux; malgré leur nombre, ceux-ci ne constituent plus qu'une petite proportion du tissu ovarien lorsqu'un pool de follicules en croissance est établi, dès la puberté. La culture d'ovaires néonataux a été utilisée notamment pour étudier les facteurs impliqués dans l'activation du développement des follicules primordiaux. Chez les rongeurs, c'est à ce stade que l'ovaire contient le plus de ces follicules dormants, leur formation ayant cours principalement avant le quatrième jour post-natal (Hirshfield, 1991). Cette méthode a été adaptée (Parrott et Skinner, 1999) sur les bases d'une technique similaire de culture de vésicules séminales et de la glande bulbouréthrale (Cooke *et al.*, 1987; Alarid *et al.*, 1994).

Les ovaires de rats prélevés et mis en culture au jour post-natal quatre contiennent environ 70 % de follicules primordiaux, majoritairement situés dans le cortex, et l'équivalent de 23 % de follicules primaires, le reste étant des follicules secondaires préantraux (Parrott et Skinner, 1999). Sur une période d'une quinzaine de jours de culture, le développement des follicules primordiaux vers le stade primaire peut s'initier spontanément. Une étude a rapporté que près de 40 % des follicules primordiaux persistaient 14 jours après la mise en culture tandis que le pourcentage de follicules en développement atteignait 60 %; le nombre total de follicules demeurait assez fixe jusqu'au quatorzième jour (Nilsson *et al.*, 2001). La comparaison avec le 30 % de follicules en développement avant la mise en culture suggère que plus de follicules primordiaux amorcent leur

développement en culture qu'*in vivo* sur la même période, mais ce phénomène demeure mal compris. Fait intéressant, lorsque l'on met des ovaires de rat en culture au jour post-natal zéro plutôt que quatre, alors que les follicules primordiaux ne sont pas encore assemblés, leur développement se poursuit spontanément après l'assemblage (Kezele et Skinner, 2003). Pour leur part, les ovaires de souris cultivés à partir du jour deux contiennent également une grande proportion de follicules primordiaux et certains follicules s'y développent jusqu'au stade secondaire préantral à l'intérieur d'une période de quatre jours de culture. Comme chez le rat, plus de follicules semblent atteindre le stade primaire qu'*in vivo* (Durlinger *et al.*, 2002).

Chez les espèces de plus grande taille, dont les bovins et les singes, la culture de pièces corticales d'ovaires fœtaux a été utilisée pour tenter d'identifier ce qui régule l'activation des follicules primordiaux (Fortune, 2002). Le cortex y est utilisé car c'est à cet endroit que se situent la plupart des follicules dormants. Le même phénomène de suractivation spontanée des follicules primordiaux y survient, comme dans les pièces corticales d'ovaires humains adultes, d'ailleurs (Carlsson *et al.*, 2006). En effet, le nombre de follicules primordiaux trouvés dans des pièces corticales d'ovaires de babouins chute de moitié dès le deuxième jour de culture et de 82 % après le dixième jour. Parallèlement, le nombre de follicules primaires y augmente de sept fois (Wandji *et al.*, 1997). Les petits follicules bovins suivent les mêmes tendances (Wandji *et al.*, 1996). Malgré cela, très peu de follicules atteignent le stade secondaire.

Ainsi, l'observation de l'activation spontanée des follicules primordiaux est généralisée malgré quelques différences techniques d'un laboratoire à l'autre. Il en est de même quant au fait que les follicules d'ovaires néonataux cultivés sont limités dans leur développement en culture, en comparaison avec la situation *in vivo* (Devine *et al.*, 2002). Aucun follicule antral ne s'y développe à cause de l'absence de gonadotrophines, dont la FSH (Fainstat, 1968).

## **1.2 Cinétique du nombre de follicules primordiaux**

L'ovaire de mammifère est particulier parce qu'il contient à la naissance de l'organisme la totalité des follicules qui lui seront nécessaires pour remplir sa fonction. Chez toutes les espèces, la réserve de follicules diminue avec le temps (Hirshfield, 1991). Une étude a investigué la

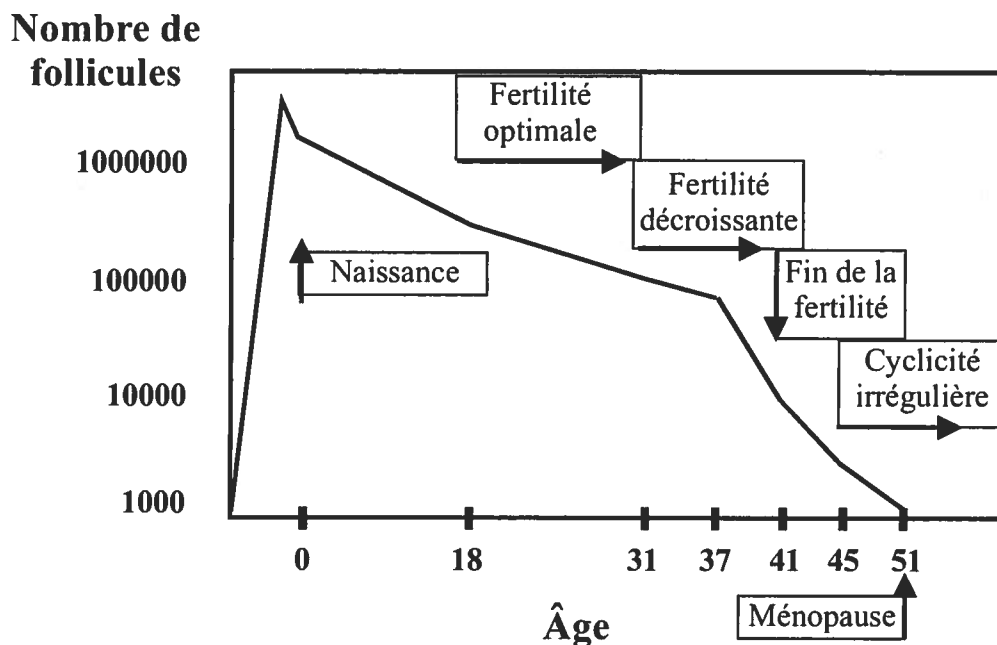


cinétique du développement des follicules préantraux chez la souche de souris CBA/Ca (Faddy *et al.*, 1987). Peu après la naissance, l'ovaire de ces souris contient environ 8000 ovocytes inclus dans des follicules primordiaux. Un déclin à pic des follicules primordiaux s'effectue alors dans ce qui constitue une phase initiale d'attrition. Cette perte massive serait due en bonne partie à la mort de follicules, bien que certains ovocytes peuvent aussi migrer hors de l'ovaire, au travers de l'épithélium de surface (Wordinger *et al.*, 1990). À 20 jours après la naissance, le nombre de follicules primordiaux est déjà diminué à moins de 60 % du nombre initial, et à 60 jours, il ne constitue plus que 30 % du stock d'origine. La cadence du déclin diminue cependant avec l'atteinte de la maturité sexuelle et va s'atténuer davantage une fois passé le cap des 60 jours. En contraste au taux de mort des follicules primordiaux, le taux journalier auquel ils amorcent leur croissance ne varie pas en fonction de l'âge. Le taux de croissance folliculaire est également élevé, des follicules antraux étant observés généralement dès le jour post-natal neuf. Même si les souris n'entament pas une période similaire à celle de la ménopause chez la femme, elles connaissent une période étendue de reproduction acyclique, suivie de l'épuisement complet de la réserve folliculaire quelques mois avant leur mort de vieillesse (Gosden *et al.*, 1983).

### **1.2.1 Épuisement de la réserve folliculaire chez la femme**

Chez la femme, l'épuisement progressif du stock de follicules primordiaux par entrée dans des cycles de croissance folliculaire et d'atrésie aboutit normalement à la cessation de la cyclicité menstruelle entre 45 et 54 ans; cela marque l'entrée dans la ménopause (Figure 3). L'importance de la dégénération physiologique des follicules se comprend en considérant que sur les quelques 400 000 follicules présents à la puberté, seulement 400 vont aboutir à l'ovulation au cours de la période reproductrice de la femme. Des modèles mathématiques de la diminution de la réserve de follicules primordiaux ont été développés. Ils suggèrent que le taux de perte folliculaire de la femme doublerait autour de 37 ans, en raison d'un rythme d'initiation de la croissance folliculaire plus important (Gougeon *et al.*, 1994; Faddy et Gosden, 1996). Cela causerait un épuisement prématuré de la réserve folliculaire, une forme de sénescence isolée d'un organe. En dessous du seuil de quelques milliers de follicules restants (45-46 ans en moyenne), les patrons cycliques de menstruations de la femme deviennent irréguliers (Richardson *et al.*, 1987). Lorsqu'il reste moins d'un millier de follicules, il n'y en a plus suffisamment pour soutenir les cycles hormonaux supportant le cours normal des menstruations, et celles-ci cessent (Faddy *et al.*,

1992). On considère une femme en ménopause si ses menstruations n'ont pas eu lieu pendant une période supérieure à douze mois consécutifs (McKinlay, 1996).



**Figure 3** : Paramètres de fertilité chez la femme associés au nombre de follicules présents dans l'ovaire  
Adapté de Faddy *et al.* (1992)

La ménopause est donc déterminée par un certain nombre de follicules plutôt qu'un certain âge. Un modèle de déclin exponentiel simple (Faddy et Gosden, 1995) prédit que la ménopause surviendrait chez la majorité des femmes à l'intérieur de 5 à 10 ans lorsque la réserve ne compte plus que 10 000 follicules, et en dedans de 21 à 27 ans avec une réserve de 100 000 follicules. Lorsque cet état est atteint, la chute de sécrétion d'estrogènes et d'inhibine dans l'ovaire coïncide avec une hausse des niveaux plasmatiques de FSH et de LH, à cause de la cessation du rétrocontrôle négatif exercé par ces facteurs ovariens sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (McKinlay, 1996). Cela laisse peu de doutes sur le rôle central de l'ovaire dans ce phénomène. De plus, des gonadotrophines exogènes ne sont plus en mesure de provoquer la maturation folliculaire ou l'ovulation lors de cette période, de par le manque de follicules (Gow *et al.*, 1994).

Ainsi, la pérennité de la fonction ovarienne repose sur le nombre de follicules y étant présent. Elle sera donc influencée par le nombre de follicules établis à la naissance et la dynamique entre la croissance et la mort folliculaire. La mort programmée des follicules est capitale dans la régulation de la fonction ovarienne car la grande majorité des follicules ovariens s'y destinent. La seconde partie examinera donc les mécanismes à la base de la dégénérescence des follicules ovariens.

## 2 Mécanismes et effecteurs de la mort cellulaire dans l'ovaire

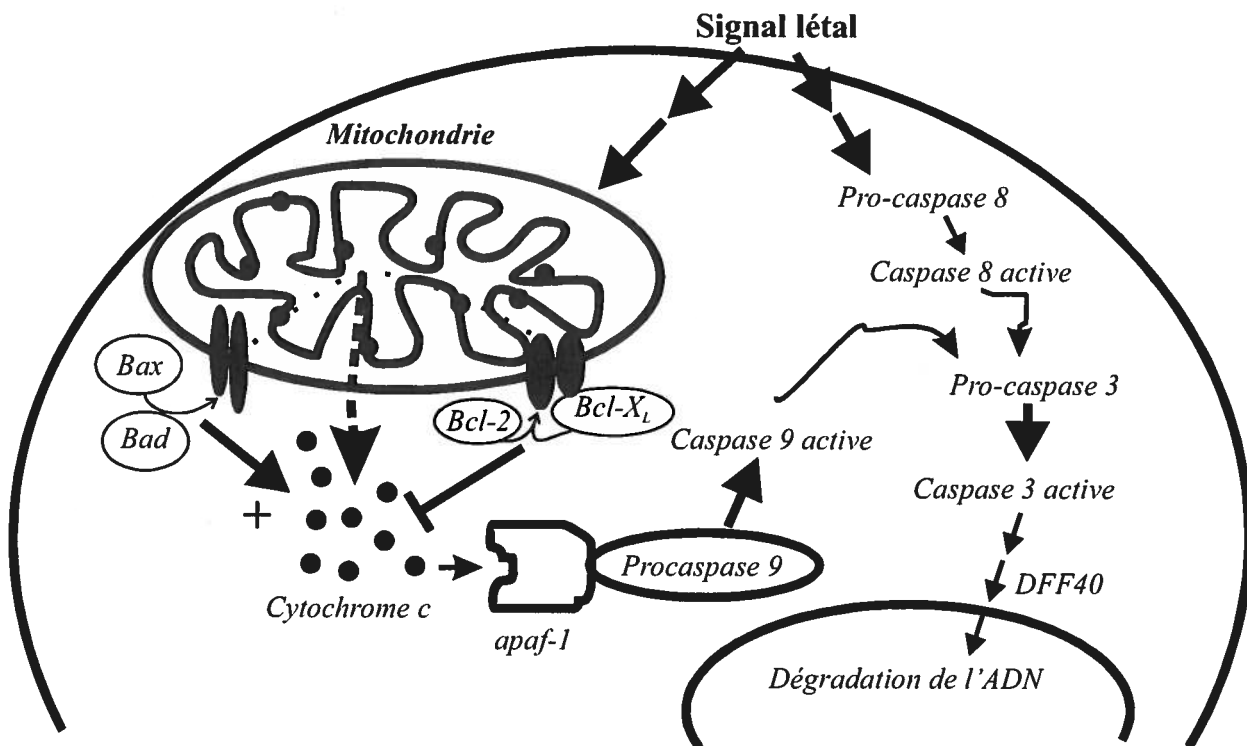
### 2.1 Introduction à la mort cellulaire programmée

La mort cellulaire programmée, ou apoptose, est impliquée dans plusieurs processus physiologiques, notamment dans le développement et la fonction ovarienne. Dans les cellules de mammifères, la réponse apoptotique passe classiquement par l'une ou l'autre de deux voies différentes, dépendamment du stimulus reçu par la cellule. Dans la voie extrinsèque, l'apoptose est initiée par la liaison à un récepteur de surface de ligands létaux, comme ceux de la superfamille du ligand de *Fas/Tumor necrosis factor- $\alpha$* . La voie intrinsèque, qui transiterait ultimement par la mitochondrie, prendrait origine d'une large gamme de changements à l'intérieur même de la cellule à la suite d'insultes pathologiques ou toxiques ou encore par l'absence de signaux de survie (Morita et Tilly, 1999; Riedl et Shi, 2004).

Une fois le signal létaux reçu, le recrutement de molécules de signal intracellulaire pour relier ces signaux à un système central de contrôle est nécessaire. Les messagers secondaires alors utilisés dépendent du type, de la dose et de la durée d'action des stimuli, mais aussi du type cellulaire impliqué. Dans le cas de la liaison d'un signal létaux à des récepteurs de mort cellulaire, ceux-ci peuvent se regrouper en triades et lier la protéine *FADD*, qui peut alors servir d'adaptateur pour recruter et activer la caspase initiateur 8. Celle-ci peut à son tour activer une caspase effectrice comme la caspase 3. Dans l'exemple d'un signal interne, les signaux sont généralement intégrés au niveau de la mitochondrie sous la gouverne des protéines membres de la famille *Bcl-2*. Elles sont près d'une vingtaine, se subdivisent en facteurs favorisant ou inhibant la poursuite de l'apoptose et leurs interactions détermineront le destin de la cellule. Selon l'intégration des signaux, différents facteurs peuvent être relâchés de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytoplasme (Morita et Tilly, 1999; Riedl et Shi, 2004).

Le relâchement du cytochrome *c* de la mitochondrie est un exemple des événements intracellulaires capitaux sous le contrôle des membres de la famille du gène *Bcl-2* (Figure 4). En se liant à la protéine adaptatrice Apaf-1 dans le cytosol, le cytochrome *c* permet d'engager la machinerie impliquée dans l'exécution du processus de mort programmée. La liaison de ce complexe avec la procaspase 9 entraîne l'activation de cette enzyme par clivage. Lorsqu'elle est

activée, cette caspase joue un rôle dans le déclenchement de la phase exécutive de l'apoptose, par le clivage (l'activation) de caspases en aval, dont les caspases 2, 3, 6 et 7 (Riedl et Shi, 2004). L'activité protéasique de celles-ci peut notamment catalyser le clivage des *DNA-fragmentation factor* (40 ou 45) pour lever l'inhibition des sous-unités nucléases qu'elles contiennent et ainsi entraîner la dégradation de l'ADN nucléosomal en fragments de longueur caractéristique (Liu *et al.*, 1998). Les caspases entraînent irrémédiablement les cellules dans la mort en affectant des protéines cellulaires clés, des enzymes nucléaires et des facteurs de signalisation requis pour l'homéostasie cellulaire (p.ex. la *poly-ADP ribose polymerase*, l'actine, la lamine) (Sakahira *et al.*, 1998). Les signes distinctifs de l'apoptose, tant morphologiques (condensation cellulaire, bourgeonnement de la membrane plasmique, fragmentation et pycnose nucléaire) que biochimiques (clivage d'ADN) seraient reliés à l'activation des caspases mais d'autres protéases peuvent également exécuter l'apoptose (Morita et Tilly, 1999; Tilly, 2001).



**Figure 4 :** Schéma simplifié de certains éléments impliqués dans l'apoptose  
Inspiré de Tilly (2001)

## 2.2 Apoptose et fonction ovarienne

### 2.2.1 Dégénérescence des ovocytes avant l'assemblage des follicules

Dans l'ovaire, une énorme quantité de cellules germinales est perdue par dégénérescence au stade embryonnaire, quand les ovogonies se divisent par mitose et lorsqu'elles traversent les premières phases de la méiose. Malgré son importance numérique, le processus de mort des ovogonies est relativement peu documenté.

Différentes approches ont été utilisées pour attribuer la perte des ovogonies à l'apoptose. D'abord, des analyses de contenu en ADN par cytométrie en flux dans des ovaires fœtaux de souris ont permis d'identifier une population de cellules apoptotiques (Coucouvanis *et al.*, 1993). Ensuite, la détection de fragments d'ADN en échelle dans des extraits d'ovaires murins fœtaux (Ratts *et al.*, 1995) et l'observation d'ovogonies positives pour la fragmentation nucléaire chez la souris (Reynaud et Driancourt, 2000) et l'humain (De Pol *et al.*, 1997) sont venues appuyer ces analyses. Dans des ovaires fœtaux humains, la condensation de la chromatine et la formation de corps apoptotiques dans les cellules germinales pendant l'ovogenèse a également été observée en microscopie électronique (De Pol *et al.*, 1997, 1998).

L'étude des facteurs intracellulaires qui réguleraient cette dégénérescence abondante des cellules germinales a aussi fait l'objet de quelques études. Les protéines anti-apoptotiques *Bcl-2* et *Mcl-1*, de même que *Bax* (proapoptotique), ont été immunolocalisées dans les cellules germinales d'ovaires fœtaux humains (Vaskivuo *et al.*, 2001; Hartley *et al.*, 2002; Quenby *et al.*, 1999). Pour leur part, de nombreuses caspases dont les caspases initiatrices 8 et 9, de même que les caspases effectrices 2, 3 et 7, ont été détectées dans des spécimens d'ovaires fœtaux humains (Fulton *et al.*, 2005). La forme clivée de la caspase 3 a été localisée dans les cellules germinales, avant que les follicules primordiaux ne se forment (Fulton *et al.*, 2005). De plus, la culture d'ovaires fœtaux de souris en présence d'inhibiteurs de caspases, dont l'activité avait été confirmée dans les ovogonies et ovocytes, aurait abrogé l'apoptose des cellules germinales (Morita et Tilly, 1999). Plus tard dans l'ovogenèse, c'est-à-dire dans la période qui coïncide avec la rupture des nids d'ovocytes, du marquage pour les fragments d'ADN (TUNEL) et pour la

forme clivée de la poly-ADP ribose polymérase (clivage effectué au cours de l'apoptose) a été observé dans les ovocytes murins (Pepling et Spradling, 2001).

Plusieurs modèles de souris mutantes ont également été utilisés pour examiner la régulation de la survie des cellules germinales avant leur implantation au sein des follicules. Les ovaires de souris dont l'expression du facteur de survie *Bcl-x* était diminuée présentaient moins de follicules primordiaux à la naissance, ce qui suggère que ce facteur supporte la survie des ovogonies pendant leur développement (Rucker *et al.*, 2000). Chez ces souris, la délétion supplémentaire des deux allèles du gène proapoptotique *Bax* a restauré la survie des cellules germinales, suggérant ainsi que l'équilibre entre *Bcl-x* et *Bax* est capital dans le destin des futurs ovocytes (Rucker *et al.*, 2000). Par ailleurs, une surexpression de *Bcl-2* spécifique aux cellules germinales en prolifération (transgène couplé au promoteur de *c-kit*) augmentait leur survie, tandis que l'inactivation des deux allèles de ce gène, mais pas d'un seul, entraînait une réduction du nombre d'ovocytes implantés à la naissance (Ratts *et al.*, 1995). De plus, une réduction de l'apoptose des cellules germinales fœtales a été observée chez des souris dont était inactivé le gène de l'acide sphingomyélinase, l'enzyme qui produit la céramide, un composé proapoptotique (Morita *et al.*, 2000). Le même phénotype fut observé chez les souris *knock-out* pour l'une des caspases effectrices de l'apoptose, la caspase 2 (Bergeron *et al.*, 1998; Morita *et al.*, 2001). Cependant, l'inactivation de la caspase 3 n'a pas affecté le nombre de follicules primordiaux implantés à la naissance (Matikainen *et al.*, 2001b).

Il ressort donc de plusieurs études différentes que des facteurs clefs dans le déroulement de l'apoptose seraient impliqués dans la dégénérescence des cellules germinales au cours du développement de l'ovaire, avant que les ovocytes ne soient implantés au sein des follicules.

### **2.2.2 Dégénérescence folliculaire au stade postnatal**

Une fois les follicules établis au sein de l'ovaire, la perte des cellules germinales est la conséquence indirecte du processus d'atrésie. Bien que l'atrésie puisse survenir à tous les stades folliculaires, elle se distingue plus facilement chez les grands follicules préantraux et les follicules antraux que chez les plus petits follicules préantraux (stades primordial, primaire, secondaire préantral). Le processus de dégénérescence semble de plus se dérouler de façon

différente selon le stade folliculaire. Dans les grands follicules ovariens, l'ovocyte meurt une fois que les cellules de la granulosa ont dégénéré et les restes du follicule sont éliminés par phagocytose ou résorption dans le stroma ovarien (Inoue *et al.*, 2000). Quant à elle, l'atréisie des plus petits follicules semble être enclenchée dans l'ovocyte d'abord, la mort des cellules de la granulosa survenant en second lieu (Reynaud et Driancourt, 2000; Morita et Tilly, 1999). Il semble que les mécanismes opérant le contrôle de la mort des ovocytes dans ces petits follicules (primordiaux, primaires) seraient davantage complexes que ceux mis en œuvre dans les ovocytes au stade fœtal (Reynaud et Driancourt, 2000).

### **2.2.2.1 Dégénérescence des plus grands follicules**

Les premiers signes d'atréisie rencontrés dans les grands follicules (grands préantraux et antraux) concernent les cellules de la granulosa et se rapprochent des caractéristiques morphologiques classiques de l'apoptose. Ils incluent la condensation cytoplasmique accompagnée de pycnose nucléaire, la condensation de la chromatine et sa redistribution contre l'enveloppe nucléaire (Tilly, 1996). La dégradation nucléaire dans ces cellules a été révélée par l'étiquetage des fragments d'ADN *in situ* et l'examen des oligonucléosomes dans des extraits d'ovaires entiers (Ratts *et al.*, 1995; Tilly et Hsueh, 1993). La survie des cellules de la granulosa semble reliée au statut du facteur de transcription p53, qui lorsque surexprimé, peut y entraîner un déclenchement rapide de la mort (Keren-Tal *et al.*, 1995). L'activation de l'apoptose des cellules de la granulosa était aussi rapidement déclenchée après modification à la hausse de l'expression du gène proapoptotique *Bax* (Tilly *et al.*, 1995), tandis que la surexpression de *Bcl-2* l'inhibait (Hsu *et al.*, 1996). Pendant l'atréisie des grands follicules, la déficience en *Bax* a d'ailleurs retardé la mort des cellules de la granulosa jusqu'à l'apparition d'ovocytes en dégénérescence (Knudson *et al.*, 1995), alors que l'ovocyte dégénère toujours en dernier à ces stades.

Le rôle des caspases dans l'exécution de l'apoptose des cellules de la granulosa a aussi été investigué. La déficience en caspase 3 a entraîné des dérèglements dans la dégénérescence des follicules au stade antral, en retardant à son tour la mort des cellules de la granulosa; la caspase 2, pour sa part, ne semblerait pas y jouer un rôle essentiel (Matikainen *et al.*, 2001b). La transformation de la procaspase 3, de même que l'activité enzymatique de la caspase 3, ont d'ailleurs été détectés pendant la mort des cellules de la granulosa murines (Robles *et al.*, 1999),



tandis qu'un inhibiteur spécifique pour cette caspase bloquait leur dégénérescence en culture (Maravei *et al.*, 1997). Cette caspase apparaît donc essentielle dans la progression de la mort programmée des cellules de la granulosa pendant l'atrésie, comme pour celle de nombreux autres types cellulaires.

#### 2.2.2.2 Dégénérescence des follicules immatures

En contraste aux données sur la mort des cellules de granulosa des grands follicules, les mécanismes d'initiation et d'exécution de l'apoptose dans les cellules de follicules préantraux demeurent très peu connus, notamment à cause de la difficulté à extirper une quantité significative de ces follicules du tissu ovarien. Quelques informations proviennent toutefois des souris transgéniques. Une étude a révélé la présence d'une réserve trois fois plus grande de follicules primordiaux au moment de la puberté chez des souris *knock-out* pour *Bax*, alors qu'aucune différence du nombre de ces follicules n'était observée à la naissance (Perez *et al.*, 1999a). Cela suggère que ce gène proapoptotique soit impliqué dans la mort programmée des ovocytes aux stades folliculaires préantraux. Par contre, l'implication de l'antiapoptotique *Bcl-2* est moins claire. Chez des souris transgéniques où une surexpression de *Bcl-2* était confinée aux ovocytes de follicules en croissance (transgène en aval du promoteur pour la protéine *Zona Pellucida-3* qui est exprimée à partir du stade folliculaire primaire), le nombre de follicules primaires est demeuré inchangé par rapport aux souris sauvages. Pourtant, plus de petits follicules préantraux (de 2 à 4 couches de granulosa dans leur classification) persistaient dans le tissu (Morita *et al.*, 1999). De plus, lorsque *Bcl-2* était surexprimé avant l'établissement des follicules primordiaux, l'augmentation du nombre de ce type de follicule à la naissance ne se maintenait pas à long terme, les souris transgéniques retrouvant un pool de follicules primordiaux semblable aux souris sauvages à partir de 30 jours (Flaws *et al.*, 2001a). D'autre part, dans des ovaires humains, les ovocytes et les cellules de la granulosa des follicules primordiaux et primaires, bien que positifs pour la fragmentation nucléaire (TUNEL), étaient exempts d'immunomarquage pour p53, un facteur de transcription pouvant être relié au déclenchement de l'apoptose (Depalo *et al.*, 2003).

Le manque d'information concernant le processus de mort des ovocytes au sein des follicules contraste quelque peu avec les données provenant de l'étude des ovocytes ovulés *in*

*vitro*. Après un certain temps de culture, ces ovocytes démontrent spontanément des signes d'apoptose incluant le rétrécissement du cytoplasme et le bourgeonnement de la membrane plasmique. Le clivage et la fragmentation d'ADN *in situ*, de même que l'activité de caspases, y ont aussi été démontrés (Perez *et al.*, 1999b; Perez *et al.*, 1997; Morita et Tilly, 1999; Tilly, 2001). Cette dégénérescence spontanée peut être inhibée par la surexpression de *Bcl-2* (Morita *et al.*, 1999), l'inhibition des caspases et l'exposition à un métabolite contrebalançant les événements promus par la céramide, la sphingosine-1-phosphate (Perez *et al.*, 1997). Malgré certains résultats contradictoires (Van Blerkom et Davis, 1998), la majorité des éléments appuient l'idée que la dégénérescence des ovocytes ovulés, comme celle des ovogonies, passe par l'apoptose (Perez *et al.*, 1999b).

Par contre, les évidences sont moins nombreuses et probantes en ce qui concerne la mort des ovocytes alors qu'ils sont à l'intérieur du follicule. L'examen de l'ultrastructure des ovocytes atériques a notamment révélé quelques divergences avec les critères standard de l'apoptose. La ségrégation nucléolaire, la condensation nucléaire et cytoplasmique, la formation de corps apoptotiques et la redistribution de la chromatine le long de la membrane nucléaire, des signes distinctifs de l'apoptose (Wyllie *et al.*, 1980), n'ont pas été observés dans les ovocytes de follicules de rat en dégénérescence à différents stades (Devine *et al.*, 2000).

En outre, l'inactivation du gène de la caspase 3 n'a pas changé le nombre de follicules préantraux perdus lors des deux premiers mois de la période postnatale (Matikainen *et al.*, 2001b). Cela en dépit du fait que les ovocytes ovulés et les ovogonies expriment assurément cette caspase effectrice chez la souris (Exley *et al.*, 1999). La forme clivée de la caspase 3 a aussi été localisée dans quelques ovocytes de follicules préantraux de souris (Fenwick et Hurst, 2002), suggérant qu'elle puisse à tout le moins avoir une implication partielle dans la dégénérescence de ces follicules.

Ainsi, le rôle de facteurs impliqués dans l'apoptose sur le destin des follicules ovariens semble varier selon leur stade de développement. L'implication de la mort programmée s'est avérée jusqu'ici plus facilement identifiable lorsque la dégénérescence des cellules de la granulosa précède celle du follicule tout entier ou après que l'ovocyte ait été expulsé du follicule.

Mais bien que la perturbation de la fonction ovarienne puisse passer par des mécanismes encore plus difficiles à élucider que la mort cellulaire, la réduction du nombre de follicules ovariens, particulièrement des follicules dormants, est une conséquence commune et critique de l'action des xénobiotiques. La troisième partie situera notamment cet aspect à travers le survol de l'interférence des substances toxiques avec la fonction de l'ovaire.

### **3 Perturbation de la fonction et du développement folliculaire par les xénobiotiques**

La dégénérescence des follicules ovariens par atresie fait partie intégrante de la physiologie ovarienne. Pendant la vie reproductrice de la femelle, un recrutement constant de follicules dormants s'effectue pour entretenir les pools de follicules à différents stades de croissance. La plupart de ces follicules seront éliminés par atresie, processus essentiel pour ramener un équilibre. Le flux constant de follicules ainsi généré est l'élément sur lequel repose la fertilité de la femelle et il est régulé par le statut hormonal et plusieurs facteurs intraovariens et environnementaux (Hirshfield, 1997).

Or, la susceptibilité des différents stades folliculaires face aux agents toxiques est connue comme étant variable. La gamme des effets des xénobiotiques inclut des différences aussi importantes que la perturbation de la prolifération cellulaire ou de la stéroïdogenèse aux stades avancés, que la destruction directe de follicules. L'impact sur la fonction reproductrice va différer dépendamment du sous-ensemble de follicule affecté.

#### **3.1 Toxicité dirigée vers les follicules en croissance**

Les xénobiotiques qui causent des dommages sélectifs aux grands follicules en croissance peuvent entraîner une interruption temporaire et réversible de la cyclicité; les effets ne se manifesteront qu'à court ou moyen terme. En effet, si les follicules dormants ont été épargnés après la fin de l'exposition, la fonction ovarienne normale va être retrouvée ultimement, une fois que des follicules primordiaux auront été recrutés pour régénérer le flot de follicules en croissance (Hoyer, 2005).

L'atteinte des follicules croissants peut se situer au niveau de la production de stéroïdes ou de l'ovulation. Par exemple, le di-(2-ethylhexyl)phthalate, un composé utilisé pour conférer de la souplesse aux plastiques, inhiberait l'expression de l'aromatase via l'activation du récepteur de proliférateurs activés par les peroxyosomes (Lovekamp-Swan et Davis, 2003; Davis *et al.*, 1994). Une telle action peut abaisser le niveau d'estradiol en circulation et entraîner une perturbation de la cyclicité. D'autres composés en mesure d'affecter la balance estrogénique,

comme les *psoralens* (Diawara *et al.*, 1999), peuvent également venir interférer dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien et amener des irrégularités dans la cyclicité ovarienne. Les plus grands follicules peuvent aussi être amenés vers l'atrésie par des agents cytotoxiques tuant leurs cellules en prolifération dans la *granulosa*; le CPA en est un exemple (Ataya *et al.*, 1989).

### 3.2 Toxicité dirigée vers les follicules primordiaux

Quant à elle, l'atteinte des follicules primordiaux peut entraîner des effets irréversibles. Ces unités constituent une banque non renouvelable à la source de tout follicule en croissance et auxquels la longévité de la fertilité féminine est intimement liée. Cependant, les effets sur la cyclicité de l'atteinte de la réserve de follicules primordiaux peuvent n'être détectés que tardivement. En effet, la fonction ovarienne peut se maintenir jusqu'à ce que les follicules déjà activés au moment de l'exposition aient terminé leur maturation ou dégénéré et qu'un nombre insuffisant de follicules primordiaux ne puisse reconstituer le pool de follicules en croissance. Chez le rat, la réduction du nombre de follicules primordiaux établis à la naissance, par exposition *in utero* au busulfan, ne semblait pas ralentir le taux auquel ils étaient activés au stade post-natal. Chez ces sujets avec une banque réduite de follicules primordiaux au départ, le nombre de grands follicules antraux s'est maintenu à un niveau normal jusqu'à l'épuisement complet, prématuré, de la réserve de follicules dormants au rythme de décroissance naturel (Hirshfield, 1994). Ainsi, les conséquences ultimes de la destruction de ces follicules sont l'infertilité et la ménopause précoce. Une autre conséquence potentielle de la rupture de la fonction ovarienne est l'apparition de tumeurs ovariennes; il semble y avoir une relation directe entre leur développement et la déplétion des ovocytes dans l'ovaire (Hoyer et Sipes, 1996).

Les produits identifiés comme pouvant détruire des follicules primordiaux sont variés et incluent notamment des molécules qui lient le récepteur de l'Aryl Hydrocarbure (AHR). Plusieurs études *in vivo* chez le rat et la souris ont montré que certains hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), notamment le benzo[*a*]pyrene (BaP), le 3-méthylchloranthrene (3-MC) et le diméthylbenz[*a*]anthracene (DMBA) peuvent détruire les follicules dormants (Mattison et Thorgeirsson, 1979; Gulyas et Mattison, 1979; Mattison, 1979; Mattison *et al.*, 1983a; Borman *et al.*, 2000). Une administration orale de doses élevées de BaP à la mère souris pendant la

gestation s'est même avérée en mesure de produire une stérilité complète chez ses filles (MacKenzie et Angevine, 1981).

Quelques composés retrouvés en milieu professionnel peuvent également toucher les petits follicules ovariens. Parmi ceux-ci figurent les diepoxides créés par le métabolisme du 1,3-butadiene, un produit relâché pendant la confection de caoutchouc synthétique et de résines thermoplastiques. Une étude a montré que les follicules primordiaux étaient respectivement détruits à 98% et 85% chez des souris dosées avec le 1,3-butadiene monoepoxide et le 1,3-butadiene diepoxide (Doerr *et al.*, 1996). La dimérisation du 1,3-butadiene forme le 4-vinylcyclohexene (VCH), un composé largué à faible concentration pendant la fabrication des pneus, des plastifiants et des pesticides. Le VCH cause la destruction sélective des follicules primordiaux et primaires chez la souris et son métabolite diepoxide, le VCD, en fait autant chez le rat et la souris (Grizzle *et al.*, 1994; Kao *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1990), entraînant de l'insuffisance ovarienne précoce (Mayer *et al.*, 2002). Le 2-bromopropane, un substitut des chlorofluorocarbones, est un autre composé industriel qui peut amener la destruction de follicules primordiaux et d'autres types folliculaires chez la souris (Yu *et al.*, 1999) et la femme (Kim *et al.*, 1996).

Une variété d'autres agents peut produire des pertes importantes de follicules primordiaux, notamment certaines toxines fongiques et des antibiotiques (p.ex. la bléomycine) (Hoyer, 2005). Ceux qui sont les mieux décrits et dont les femmes sont le plus à même d'être exposés à fortes doses demeurent les agents utilisés en radiochimiothérapie. La radiation ionisante est depuis longtemps reconnue pour causer une destruction rapide des ovocytes contenus dans les follicules primordiaux et une hausse de l'atrésie entraînant une perte de volume ovarien (Russell *et al.*, 1959; Dobson et Felton, 1983; Jarrell *et al.*, 1986; Lee et Yoon, 2005). La cisplatine, la doxorubicine, la vinblastine ainsi que plusieurs agents alkylants comme la moutarde azotée, le chlorambucil, le CPA, le busulfan (Yoshida *et al.*, 2005), le 1,4-di(methanesulfonyl)-butane (Myleran) et le triméthylèneamine (TEM) font partie, quant à eux, des agents antinéoplastiques répertoriés comme ayant la capacité d'interférer avec la fonction ovarienne en affectant directement les follicules dormants (Hoyer et Sipes, 1996; Hoyer, 2005).

### 3.3 Métabolisme des produits toxiques dans l'ovaire

Le métabolisme au sein de l'ovaire pourrait contribuer à y moduler l'étendue des dommages causés par des composés toxiques. La régulation de l'expression des enzymes de bioactivation et de détoxification demeure pourtant peu connue dans ce tissu. Son étude est compliquée par le fait qu'elle peut être affectée par les hormones en circulation et être amenée à varier selon les différents types cellulaires et folliculaires, l'état de différenciation de ces cellules et le moment du cycle. De plus, le rôle des enzymes membres de la famille des cytochromes P450 dans la bioactivation des xénobiotiques dans l'ovaire demeure difficile à établir car plusieurs d'entre elles ont aussi une implication dans la stéroïdogénèse (aromatase, P450<sub>scc</sub>, P450<sub>c17</sub>). Malgré tout, l'expression ovarienne de plusieurs formes de cytochrome P450 suggère que le métabolisme des xénobiotiques y a lieu, même si l'ovaire pourrait n'être qu'un organe secondaire de bioactivation en comparaison avec le foie (Cannady *et al.*, 2003; Devine et Hoyer, 2004). Quant aux réactions de détoxification, il est connu qu'elles peuvent être catalysées dans l'ovaire par l'époxyde hydrolase microsomale (hydratation de l'époxyde en diols; Cannady *et al.*, 2002) et par la *glutathion-S-transférase* (GST, conjugaison avec le glutathion). Dans l'ovaire de rat, l'expression des différentes isoformes de la GST s'est révélée dépendante de l'âge et des hormones et serait plus importante dans le *corpus luteum* (Singh et Pandey, 1996; Toft *et al.*, 1997). Son activité serait pourtant moins variable à travers le cycle oestral que celle de deux autres enzymes de détoxification investiguées, la phénol UDP-glucuronosyltransférase et la phénol sulfotransférase. Leur activité présentaient une élévation accrue pendant la phase lutéale du cycle (Becedas et Bengtson Ahlberg, 1995).

Le rôle direct du métabolisme ovarien dans la toxicité a été examiné pour certains xénobiotiques. Lorsque injecté directement dans l'ovaire, le BaP, qui doit être activé en un métabolite toxique, était ovotoxique (Shiromizu et Mattison, 1984). De surcroît, la perte d'ovocytes causée par ce HAP était atténuée lorsqu'un inhibiteur potentiel des cytochromes P450, l' $\alpha$ -naphthoflavone (ANF), était administré parallèlement (Shiromizu et Mattison, 1984). Il a été suggéré que les cellules de granulosa des grands follicules soient en mesure de métaboliser directement le DMBA et le 3-MC (Bengtsson *et al.*, 1987, 1992). Mais le 7,12-DMBA peut aussi causer directement une perte de follicules primordiaux sur des ovaires néonataux de souris *in vitro* (Rajapaksa *et al.*, 2007).

Par ailleurs, il semble que les xénobiotiques eux-mêmes puissent contribuer à moduler l'expression des enzymes de bioactivation et de détoxification dans l'ovaire. Davantage de métabolites du BaP ont été trouvés après incubation avec des extraits de tissus provenant de souris exposées au 3-MC par rapport aux tissus témoins, suggérant une induction du métabolisme de cet HAP par le 3-MC (Mattison *et al.*, 1979). Chez la souris, le VCH et son diépoxyde, le VCD, affecteraient le niveau d'expression d'ARN messager, de même que la distribution et l'activité fonctionnelle des protéines de l'époxyde hydrolase microsomale (Cannady *et al.*, 2002). Dans l'ovaire, cette enzyme semble être surtout localisée dans les cellules interstitielles et de la thèque (Cannady *et al.*, 2002). Il en est de même pour certaines isoformes du cytochrome P450 (2E1, 2A et 2B) connues pour activer le VCH quant à leur modulation par ces composés et à leur localisation (Cannady *et al.*, 2003). Des variations du métabolisme entre les compartiments de l'ovaire ont par ailleurs été mises en évidence. En effet, la capacité de détoxifier le VCD serait décroissante entre les grands follicules préantraux, les petits follicules préantraux et les cellules de l'interstice (Flaws *et al.*, 1994). Il semble donc que les cellules de l'interstice ovarien jouent un rôle prépondérant dans l'activation des xénobiotiques.

### **3.4 Connaissances reliées à la destruction des follicules préantraux par des agents toxiques**

Normalement, l'atrésie des follicules préantraux est déclenchée par des stimuli dont l'action demeure encore mal comprise. Il en est autant des moyens par lesquels les composés chimiques peuvent accélérer la perte de ces follicules.

#### **3.4.1 Implication de la voie apoptotique dans la mort des follicules préantraux**

Les quelques études ayant examiné les mécanismes sous-jacents à la destruction des petits follicules ovariens ont surtout porté sur la toxicité du VCD. Chez le rat, cet agent cause une diminution du nombre de follicules primordiaux et primaires après des expositions répétées à 80 mg/kg ou plus *in vivo* chez des individus immatures et néonataux, et à 30  $\mu$ M sur des ovaires néonataux exposés *in vitro* (Springer *et al.*, 1996a; Devine *et al.*, 2002). Bien que les nombres de follicules aient été réduits après seulement huit jours d'exposition en culture (à 30  $\mu$ M), les premiers signes de destruction folliculaire ont été détectés au dixième jour d'exposition au VCD *in vivo* (Springer *et al.*, 1996a; Devine *et al.*, 2002). Les ovocytes de certains follicules



primordiaux et primaires présentait des formes irrégulières et montraient une forme de margination de la chromatine le long de la membrane nucléaire, malgré un patron de dégradation nucléaire qui s'est révélé aléatoire dans les follicules entiers au cours de la période d'exposition (6 à 14 jours; Springer *et al.*, 1996a).

L'analyse de certains gènes dans des fractions folliculaires séparées mécaniquement en fonction de la taille a aussi été effectuée après des expositions au VCD. Dans une étude, les niveaux d'ARN messager dans les petits follicules préantraux d'ovaires de rats immatures exposés quotidiennement à 80 mg/kg de VCD pendant 10 jours ont été rehaussés pour le proapoptotique *Bax*, de même que pour deux formes d'enzymes antioxydantes, la superoxyde dismutase mitochondriale ayant le manganèse comme co-facteur et l'époxyde hydrolase microsomale, quelques heures après la dernière injection (Springer *et al.*, 1996b). Après quinze jours d'exposition, les niveaux de protéines de l'antiapoptotique *Bcl-x<sub>L</sub>* et de *Bax* n'étaient pourtant pas changés, bien que davantage de protéines *Bad* (proapoptotique) aient été détectées dans les fractions de petits follicules préantraux des ovaires du groupe traité (Hu *et al.*, 2001a). Néanmoins, le ratio *Bax/Bcl-x<sub>L</sub>* dans les fractions mitochondriales de petits follicules serait augmenté par le traitement au VCD, ce qui concorderait avec l'idée d'un mécanisme apoptotique orchestré par *Bax* dans ces follicules (Hu *et al.*, 2001a). De l'immunomarquage cytoplasmique pour le cytochrome *c*, qui peut être relâché des mitochondries au cours de l'apoptose, a aussi été observé dans les cellules de la granulosa des petits follicules, mais pas dans leurs ovocytes (Hu *et al.*, 2001a). La méthode de la séparation des follicules par la taille utilisée pour ces études apporte malgré tout quelques difficultés d'interprétations; les types cellulaires de tous les stades folliculaires (de primordial à secondaire préantral) se retrouvent mélangés et les follicules qui constituent la plus grande proportion des échantillons analysés sont donc ceux qui ne montrent pas de signes morphologiques ou numériques d'atteinte (les plus grands).

Malgré tout, cette méthode a été utilisée pour caractériser le rôle de la cascade des caspases dans l'atrésie accélérée des petits follicules exposés au VCD. En contraste avec les grands follicules (non détruits par ce produit), les petits follicules préantraux prélevés au premier et au quinzième jours du dosage au VCD présentaient une activité cytosolique accrue de la caspase 3 (Hu *et al.*, 2001b). En plus d'une augmentation générale des niveaux de procaspase 3

et de caspase 3 activée dans les fractions cytosoliques, l'intensité de l'immunomarquage de cet effecteur central de l'apoptose était accrue dans les ovocytes et les cellules de la granulosa des petits follicules préantraux à différents stades, *in vivo* (Hu *et al.*, 2001b) et *in vitro* (Devine *et al.*, 2002). Par ailleurs, une augmentation de l'activité de la caspase 8 a été détectée au quinzième jour d'exposition au VCD, tandis que pour la caspase 9, ce fut au premier jour (Hu *et al.*, 2001b). Malgré ces données, la perte des follicules primordiaux par le VCD ne serait pas prévenue par l'inactivation complète des caspases 2 ou 3, tandis que l'absence de ces protéases atténuerait la dégénérescence des follicules primaires (Takai *et al.*, 2003). La destruction des follicules primordiaux et primaires induite par ce composé chez la souris était pourtant significativement, mais pas totalement, diminuée par l'inactivation du médiateur de l'apoptose *Bax* (Takai *et al.*, 2003).

### 3.4.2 Implication du récepteur de l'aryl hydrocarbure

L'étude des mécanismes de destruction des petits follicules préantraux s'est penchée sur le rôle du récepteur de l'aryl hydrocarbure (AHR). Il s'agit d'un des seuls récepteurs sur lesquels des études d'ovotoxicité ont porté et encore une fois, des différences entre les espèces et les souches de souris ont été rapportées.

D'abord, quelques évidences suggèrent que ce récepteur est fonctionnellement requis pour induire l'expression de *Bax* et engendrer l'apoptose dans les cellules germinales foetales (Matikainen *et al.*, 2002) et les ovocytes de petits follicules préantraux exposés aux HAPs (Matikainen *et al.*, 2001a). L'accumulation de ce facteur proapoptotique, qui a deux des éléments de réponse au AHR dans son promoteur, a été observée dans les ovocytes de follicules primordiaux et primaires à la suite d'une exposition au 9,10-DMBA, un HAP (Matikainen *et al.*, 2001a). De plus, cette accumulation de *Bax* et la dégénérescence subséquente de ces follicules en présence du métabolite du 9,10-DMBA n'a pas été démontrée dans des ovaires néonataux cultivés en présence d'ANF, un antagoniste de l'AHR (Matikainen *et al.*, 2001a). Dans des pièces corticales d'ovaires humains greffées sous la peau de souris subséquentement exposées au 9,10-DMBA, les mêmes effets quant à l'accumulation de *Bax* et à la survie des follicules ont été observés (Matikainen *et al.*, 2001a). Pourtant, les dioxines, qui lient l'AHR, ne seraient pas cytotoxiques pour les ovocytes au même titre que les HAPs. Une différence dans l'élément de

réponse à l'AHR du gène *Bax* lui conférant une capacité de liaison différente lorsque lié à une dioxine, expliquerait cet apparent paradoxe (Matikainen *et al.*, 2001a). La TCDD, un agoniste de l'AHR, agirait malgré tout à titre de perturbateur endocrinien sur le vieillissement ovarien, lorsqu'elle est utilisée à des doses ne détruisant pas les follicules (Franczak *et al.*, 2006).

Les études examinant le rôle de l'AHR dans l'ovotoxicité du VCD se sont révélées moins probantes. Chez la souris, l'inactivation du gène de l'AHR n'a pas entraîné d'amoinissement du pouvoir de destruction des follicules primordiaux et primaires du VCD (Takai *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2005). Chez le rat, en contraste, les niveaux d'ARN messenger de l'AHR étaient plus élevés dans les petits follicules après un traitement avec ce composé. *In vivo*, en co-exposition avec l'ANF, moins de petits follicules ont été détruits par le VCD, mais uniquement chez le rat. De plus, l'administration parallèle d'ANF a réduit la hausse d'activité de la caspase 3 observée dans les petits follicules de rats lors d'une simple exposition au VCD (Thompson *et al.*, 2005). En dépit de ces résultats suggérant que les effets du VCD sur les follicules primordiaux et primaires soient médiés par l'AHR chez le rat, l'expression d'ARNm de facteurs dont la régulation est connue pour être affectée par la liaison à ce récepteur (Sous-unités Ya1 et Ya2 de la GST, CYP 1A1 et 1A2) y est restée inchangée par le traitement au VCD, lorsque mesuré au quinzième jour d'exposition (Thompson *et al.*, 2005).

### **3.5 Apoptose dans les ovocytes ovulés après exposition à la doxorubicine**

Bien que la dégénérescence des ovocytes lors de l'atrésie semble différer de celle des ovocytes ovulés, plusieurs informations ont été récoltées sur la toxicité d'un agent de chimiothérapie, la doxorubicine, sur de tels ovocytes exposés *in vitro*. Dans ces cellules, la doxorubicine induit, en aval d'un efflux de KCl, la rétraction de la membrane de l'ovocyte par rapport à la zone pellucide, son bourgeonnement, le clivage de la chromatine et la formation de corps apoptotiques (Perez *et al.*, 2000). De plus, la culture de ces ovocytes en présence du métabolite antiapoptotique sphingosine-1-phosphate permet de suspendre la mort induite par cet anticancéreux (Morita *et al.*, 2000). Les ovocytes ovulés sont pareillement davantage résistants à la doxorubicine lorsque le gène codant pour l'acide sphingomyélinase, impliquée dans la production de la céramide, est inactivé (Morita *et al.*, 2000). Il semble que le signal de mort déclenché à la suite d'une telle exposition passerait encore une fois par le facteur *Bax*,

l'inactivation de ce gène conférant aux ovocytes une résistance face à la doxorubicine (Perez *et al.*, 1997). Toutefois, en contraste avec le paradigme de la nécessité de l'activation du facteur de transcription p53 pour la mort des cellules tumorales (Ding et Fisher, 1998), les ovocytes de souris *knock-out* pour p53 sont tout aussi sensibles à la doxorubicine que ceux des souris sauvages (Perez *et al.*, 1997).

Par ailleurs, les caspases semblent impliquées dans l'exécution de la mort de ces ovocytes exposés en culture. Celle-ci a été prévenue partiellement par l'inactivation du gène de la caspase 2 (Bergeron *et al.*, 1998) et l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de caspases (Perez *et al.*, 1999b). De plus, des essais d'activité de caspases ont suggéré qu'elles soient spécifiquement activées dans ces ovocytes, avant la cascade de changements morphologiques associés à l'apoptose induite par cet agent (Perez *et al.*, 1999b).

Ainsi, plusieurs xénobiotiques peuvent entraîner une perte accélérée de follicules ovariens. Bien que la voie de l'apoptose ait fait l'objet d'investigations qui suggèrent une implication importante de ce processus dans les cellules ovariennes, les mécanismes en amont qui la déclenchent ont été peu étudiés. Quoiqu'il en soit, une perte accrue de follicules peut avoir des conséquences importantes sur la fertilité de la femme. La quatrième section examinera comment se manifestent directement ces effets, particulièrement dans le contexte post-chimiothérapie.

## 4 Perturbation de la fonction reproductrice de la femme

La perturbation de la fonction reproductrice des femmes par les xénobiotiques est un enjeu amené à gagner en importance. En effet, deux tendances de fertilité se dessinent dans les sociétés occidentales du 21<sup>ème</sup> siècle : les femmes ont moins d'enfants et elles repoussent davantage le moment où elles auront leur premier, soit pour des motifs domestiques, professionnels ou pour l'éducation (Friedlander et Thewes, 2003). Or, avec l'âge, le nombre de follicules décroît tandis que la période pendant laquelle les ovaires peuvent subir des expositions néfastes s'allonge. La qualité des ovocytes, qui peuvent demeurer des dizaines d'années en dormance dans l'ovaire, constitue ainsi un souci important. Il est connu qu'elle se détériore avec l'âge, comme le dénote, par exemple, l'augmentation de l'incidence d'aneuploïdie chez les femmes plus âgées (Warburton, 2005). On s'attend donc à ce qu'un nombre croissant de femmes éprouve des problèmes de fertilité dans l'avenir (Singh *et al.*, 2005).

### 4.1 Insuffisance ovarienne (ménopause) précoce

Le nombre de follicules primordiaux au sein de l'ovaire constitue l'élément à la base de la durée de vie fonctionnelle de l'ovaire. La réserve qu'il contient est établie avant que ne s'amorce la vie reproductrice de la femme et ne serait pas renouvelable. Le nombre de follicules dormants décline donc progressivement, par atrésie et entrée régulière dans les vagues de croissance folliculaire, jusqu'à ce qu'il n'en reste plus suffisamment pour soutenir la fonction ovarienne. Cet épuisement se traduit naturellement par le phénomène de ménopause chez la femme, qui résulte donc de la sénescence isolée d'un organe. Mais des perturbations dans cette dynamique peuvent amener un déficit fonctionnel ovarien prématuré. Trois mécanismes sont possibles pour expliquer une accélération du vieillissement ovarien : une réduction initiale du nombre de follicules primordiaux, un dysfonctionnement folliculaire bloquant le processus de croissance et de maturation du follicule et simulant un épuisement ovarien, et une atrésie folliculaire accélérée (Letur *et al.*, 2004). Ces états peuvent se traduire par de l'insuffisance ovarienne précoce (IOP), ou ménopause précoce, ainsi désignée parce qu'il y a rupture de la fonction de l'ovaire et apparition des signes cliniques de la ménopause (arrêt des menstruations (aménorrhée) prolongé et augmentation des niveaux de FSH) plus tôt que prévu. On considère que la ménopause est précoce lorsqu'elle survient avant l'âge de 40 ans (Letur *et al.*, 2004; Fenichel, 2005).

#### **4.1.1 Conséquences de l'insuffisance ovarienne précoce sur la santé de la femme**

La qualité de vie et l'estime personnelle des femmes en âge de procréer peuvent être affectées de façon négative par l'apparition d'un état d'infertilité et spécialement s'il se manifeste de façon inattendue. La chute d'oestrogènes ayant lieu en cas d'insuffisance ovarienne, qu'elle survienne naturellement ou précocement, est accompagnée de plusieurs effets physiologiques. Ils incluent souvent des symptômes vasomoteurs (bouffées de chaleurs et sueurs nocturnes) et génitourinaires (vaginite, dysurie, dyspareunie) (Ganz et Greendale, 2001). Plusieurs femmes démontrent également des signes psychologiques compatibles avec le vieillissement général, notamment une détérioration de l'humeur et des connaissances, et une prédisposition à la dépression (Rehman et Masson, 2005) et à la maladie d'Alzheimer (Paganini-Hill et Henderson, 1994). De plus, la ménopause précoce a été associée avec un risque accru de problèmes cardiovasculaires (van der Schouw *et al.*, 1996) et d'ostéoporose (Kritz-Silverstein et Barrett-Connor, 1993; Osei-Hyiaman *et al.*, 1998; Shapiro *et al.*, 2001). Ainsi, la prolongation de la période où les risques de développer ces symptômes sont plus élevés est un enjeu particulier chez les femmes touchées par l'IOP.

#### **4.2 Facteurs de prédisposition à l'insuffisance ovarienne précoce**

L'incidence de l'insuffisance ovarienne précoce est estimée à un pourcent chez les femmes de moins de 40 ans et à 1/1000 chez celles n'ayant pas encore atteint la trentaine (Coulam *et al.*, 1986). Certains facteurs étiologiques de ce phénomène sont présentés dans le Tableau 2. Des mutations sur quelques gènes, dont ceux des récepteurs de la FSH et de l'inhibine, ont été reliées à l'apparition de ce phénomène (Kok *et al.*, 2005). Chez les individus souffrant du syndrome d'ataxie-télangiectasie, une mutation du gène ATM amène un déficit initial du stock de follicules primordiaux qui se traduit par de l'IOP (Barlow *et al.*, 1996). Un autre exemple provient des souris déficientes pour le récepteur 3 couplé à la protéine G, chez lesquelles on dénote une décroissance importante de fertilité avec l'âge (Ledent *et al.*, 2005). L'importance des facteurs génétiques dans l'explication de l'IOP se traduit par le fait que le groupe de femme qui est le plus à risque de développer de l'insuffisance précoce «naturellement» est celui où un historique familial de ménopause prématurée a été noté (Kok *et al.*, 2005). Par contre, des interventions médicales comme l'irradiation et la chimiothérapie sont également des facteurs d'importance associés à l'étiologie de ce phénomène (Anasti, 1998). Des formes moins

précoces d'insuffisance ovarienne sont aussi reliées à des facteurs environnementaux et habitudes de vie; la consommation de tabac figurerait parmi les plus probants (Augood *et al.*, 1998).

**Tableau 2 : Étiologie de l'insuffisance ovarienne précoce**  
Adapté de Pal et Santoro (2002)

---

Causes possibles d'insuffisance ovarienne précoce

Génétiques

Polymorphisme du récepteur à la FSH  
Galactosémie  
Polymorphisme de l'inhibine B  
Gonadotrophines anormales  
Déficit enzymatique : 17 $\alpha$  hydroxylase, 17-20 desmolase  
Défauts dans la signalisation cellulaire  
Prédisposition liée à l'antigène *HLA-DR3*  
Syndrome BPEI (*Blepharophimosis, Ptosis, Epicanthus inversis I*)

Non génétiques

Extirpation des gonades iatrogène : chirurgie / irradiation / chimiothérapie  
Toxines : tabagisme  
Oophoritis  
Maladies autoimmunes : p.ex. aplasie thymique congénitale

Idiopathique

---

### 4.3 Chimiothérapie et fonction reproductrice de la femme

L'utilisation des régimes intensifs de chimiothérapie et de radiothérapie dans le traitement de certaines maladies et de tumeurs s'est grandement raffinée au cours des 25 dernières années. Ainsi, l'efficacité croissante de cette thérapie est en grande partie responsable de l'amélioration considérable du taux de survie des jeunes patients la subissant (Boring *et al.*, 1994). Un exemple marquant est le taux de survie au-delà de cinq ans d'enfants leucémiques, qui a plus que doublé en passant de 33%, lors de la période 1971-1975, à 69% pour celle de 1986-1990 (McVie, 1999).

Dans les populations d'Angleterre et des Pays-Bas, la survie au-delà de cinq ans fut atteinte, pour la période 1986-1990, par au moins 50% des patients pour 80% des types de cancers infantiles et entre 15 et 45% des cancers diagnostiqués chez les adultes (McVie, 1999). De cette amélioration surgit le souci d'amoindrir les effets secondaires engendrés par l'exposition à des agents chimiothérapeutiques, des antracyclines aux agents alkylants en passant par les alkaloïdes, chez les survivants de cancers. Parmi les principaux effets non désirés de ces traitements figurent la toxicité dirigée vers le cœur (Simbre *et al.*, 2005), le système nerveux, le système urinaire (Misiura, 2006) et celle affectant les gonades, tant femelles (Falcone *et al.*, 2004) que mâles (Schradler *et al.*, 2001; Magelssen *et al.*, 2006; Chapman, 1982). La gonadotoxicité est une résultante importante et commune des cures de radio- et de chimiothérapie et, chez la femme, elle se manifeste principalement par l'IOP (Anasti, 1998; Falcone *et al.*, 2004).

C'est l'atrésie folliculaire accélérée qui semble être à la source du déficit fonctionnel ovarien prématuré causé par plusieurs composés utilisés en chimiothérapie et par la radiation ionisante. Les petits follicules ovariens apparaissent remarquablement vulnérables à ces agents, même si le mécanisme sous-jacent est encore incompris. De façon générale, la toxicité ovarienne est plus grande pour les agents alkylants, comme le CPA, que pour les agents dont l'action est dépendante du cycle cellulaire, comme le methotrexate ou le fluorouracil (Tableau 3). Ceux-ci affectent davantage la croissance et la maturation folliculaire qu'ils ne détruisent des ovocytes (Hensley et Reichman, 1998). La radiation ionisante possède également un pouvoir ovotoxique puissant, proportionnel à la dose, et une dose de 20 Gy administrée à une fillette se traduit toujours par de l'impubérisme, de par la destruction de la réserve de follicules (Thibaud *et al.*, 1992). Le risque de mutations chromosomiques potentiellement responsable de fausses couches, de malformations congénitales et de maladies génétiques affectant la progéniture, s'additionne à celui de l'IOP par l'usage de radiochimiothérapie, même si peu d'évidences d'anormalités génétiques existent dans la progéniture de personnes traitées (Chapman, 1982).



**Tableau 3 : Degré de risque d'insuffisance gonadique associé aux agents chimiothérapeutiques**  
Adapté de Sonmezer et Oktay (2006)

<b>Risque élevé</b>	<b>Risque intermédiaire</b>	<b>Risque faible</b>
Cyclophosphamide	Cisplatine	Methotrexate
Melphalan	Adriamycine	5-Fluorouracil
Busulfan	Paclitaxel (à confirmer)	Vincristine
Moutarde azotée		Bleomycine
Chlorambucil		Actinomycin-D
Procarbazine		

#### 4.3.1 Incidence des troubles de la fonction ovarienne après chimiothérapie

Pendant les traitements de chimiothérapie, les femmes d'âge reproducteur éprouvent très souvent des irrégularités menstruelles transitoires ou de l'aménorrhée. Cependant, une proportion de ces femmes retrouve généralement une cyclicité normale dans les six mois qui suivent les traitements. En effet, les follicules en croissance semblent invariablement affectés par ces agents et il faut attendre de 3 à 6 mois pour que leur pool se reconstitue à partir des follicules primordiaux épargnés par le traitement (Sonmezer et Oktay, 2006). Ultiment, si une quantité significative de follicules primordiaux a été détruite, une aménorrhée définitive apparaîtra. Cependant, plusieurs femmes avec une réserve folliculaire diminuée peuvent maintenir une cyclicité normale sur plusieurs années avant cette étape annonçant la transition vers la ménopause (Sonmezer et Oktay, 2006). Cela complique évidemment grandement l'évaluation des dommages car les études se fient en grande partie sur ce paramètre de fertilité pour évaluer la gonadotoxicité post-chimiothérapie.

On considère traditionnellement que l'ovaire prépubère tolère davantage la chimiothérapie que l'ovaire adulte. Cela pourrait traduire simplement l'état de la réserve de follicules, plus grande en bas âge. À certaines chimiothérapies administrées avant la puberté, en particulier celles impliquant des agents alkylants, sont malgré tout associées un risque important d'IOP (Ortin *et al.*, 1990). La différence majeure avec l'adulte réside dans le fait que l'IOP peut prendre davantage de temps à se manifester. D'un suivi, il est ressorti que 40% des femmes

ayant été traitées avec des agents alkylants dans l'enfance, ayant encore des règles normales à 21 ans, développaient quand même de l'aménorrhée définitive avant l'âge de 30 ans (Byrne *et al.*, 1987). Ainsi, la fertilité de ces femmes peut persister plusieurs années après le traitement, même si la fonction ovarienne est pour rompre prématurément.

La fertilité des enfants des deux sexes traités par radiochimiothérapie a fait l'objet de quelques études épidémiologiques. Des différences dans la combinaison d'agents curatifs, la durée du suivi des patients, les paramètres évalués et le nombre de patients inclus, chaque fois réparti en divers groupes, en compliquent l'interprétation. Certaines rapportent une incidence d'IOP plus élevée que d'autres. Par exemple, sur une quarantaine de survivantes traitées par chimiothérapie (chlorambucil, vinblastine, procarbazine et prednisolone) pour la maladie de Hodgkin avant et pendant la puberté, environ la moitié ont subi des perturbations dans les niveaux de gonadotrophines et d'estradiol. Parmi cette portion, des symptômes d'IOP ont été diagnostiqués dans 58 % des cas, à l'intérieur de cinq années suivant le traitement (Mackie *et al.*, 1996). Le risque de développer une ménopause précoce dans la vingtaine a été estimé être deux fois supérieur aux témoins chez les femmes traitées après l'apparition de la puberté (13 à 19 ans) par combinaison d'irradiation et de chimiothérapie (Byrne, 1999). Les agents alkylants, administrés en parallèle avec l'irradiation lors de traitements précédant l'âge de 20 ans, ont été associés à un déficit de fertilité modéré chez les femmes, mais cette estimation variait de façon importante selon le type de cancer, la combinaison du régime administré et le sexe (Byrne *et al.*, 1987). Chez 103 femmes qui furent traitées pour un lymphome de Hodgkin alors qu'elles avaient entre 13 et 40 ans, des grossesses n'ont été rapportées que pour 20% d'entre elles (Horning *et al.*, 1981). Par contre, un suivi comparant la fertilité entre les survivants de la leucémie et leurs frères et sœurs a conclu que les femmes ne montraient pas de déficit de fertilité après traitement avec des agents alkylants, contrairement aux hommes, lorsque traitées avant l'apparition de la puberté (Byrne, 1999). Une autre étude a rapporté que les chances d'avoir un enfant chez 299 survivants de la leucémie, étaient significativement moindres après combinaison d'irradiation et de chimiothérapie que par l'usage de chimiothérapie uniquement (Nygaard *et al.*, 1991).

Certaines études regardant les effets de la chimiothérapie chez les femmes plus âgées rapportent des effets davantage significatifs sur la fonction reproductrice, essentiellement parce

qu'ils se manifestent plus tôt et sont détectés plus aisément. L'apparition d'aménorrhée à l'intérieur des sept mois suivant la thérapie a été observée chez 18 des 34 femmes auxquelles on avait administré du CPA; parmi celles-ci, l'arrêt des menstruations s'est produit moins d'un mois après la fin du traitement et les menstruations sont revenues dans moins de 10% des cas (Uldall *et al.*, 1972). Une autre étude a fait le suivi pendant 16 mois de 41 femmes entre 21 et 51 ans, traitées par chimiothérapie de façon discontinue (10 à 78 mois) pour la maladie de Hodgkin (Chapman, 1982). De ces femmes, 26% ont été touchées d'irrégularités dans les menstruations (oligoménorrhé) et 62% d'aménorrhée; les biopsies ont d'autre part montré une réduction du nombre de follicules primordiaux. Un résumé des études ayant eu trait avec l'aménorrhée induite par le CPA dans le traitement du lupus érythémateux a aussi été effectué. Il en est ressorti que le taux d'IOP chez ces femmes de 28 ans en moyenne, exposées à des doses cumulatives de 12 à 25 g de CPA, variait entre 27 et 60%; l'aménorrhée définitive s'est manifestée en moyenne quatre mois après la fin du traitement, constitué de doses maximales de 1 g répétées (Wetzels, 2004).

En résumé, les conclusions des études ayant trait à la fertilité féminine post-chimiothérapie sont toujours délicates. Les femmes y prenant part présentent souvent des différences d'âge importantes, elles ne reçoivent pas toutes le même régime d'agents et la durée du suivi pour évaluer la fonction reproductrice post-traitement est variable d'une étude à l'autre. Or, il a déjà été décrit que l'IOP peut survenir brutalement après une période de cyclicité régulière se maintenant sur une période allant de quelques mois à quelques années, pendant laquelle la femme peut être fertile (Sonmezer et Oktay, 2006). Les quelques études ayant rapporté que l'emploi d'analogues de GnRH puisse protéger les ovaires lors de traitements chimiothérapeutiques présentent aussi plusieurs limitations qui les rendent difficiles à interpréter et qui empêchent d'utiliser potentiellement ce moyen à titre préventif (Sonmezer et Oktay, 2006). Par exemple, l'une d'elles a évalué la fonction ovarienne chez des femmes après traitement pour le lymphome non-Hodgkinien. Les patientes étaient au nombre de 13, avaient entre 18 et 40 ans, ont reçu des proportions variables de quatre agents chimiothérapeutiques et ont été suivies entre 23 et 99 mois à la suite du traitement (Dann *et al.*, 2005).

#### 4.3.2 Facteurs du pronostic de la fonction ovarienne après chimiothérapie

Des études rapportées ci-haut, il ressort quelques facteurs du pronostic de l'insuffisance ovarienne après traitement de chimiothérapie. L'un d'eux est l'âge des patientes au moment du traitement. De façon générale, l'incidence de la perturbation de la fonction ovarienne et de l'infertilité complète est plus importante chez les femmes plus âgées (Sanders *et al.*, 1996; Moore, 2000; Meirou, 2000). Par exemple, une étude a révélé une fréquence d'aménorrhée secondaire définitive de 21 à 71% avant 40 ans et de 49 à 100% après 40 ans (Blumenfeld *et al.*, 1999). La dose de CPA nécessaire pour induire l'arrêt des menstruations a fait l'objet d'une estimation; elle diminuerait en fonction de l'âge, passant de 20.4, 9.3 à 5.2 g pour les tranches d'âge de 20-29, 30-39 et plus de 40 ans, respectivement (Shalet, 1980). Ces résultats suggèrent que l'impact de la destruction d'une partie de la réserve de follicules dormants est plus grand lorsque le nombre restant de follicules est plus petit, comme chez les femmes plus âgées. En effet, l'insuffisance ovarienne est reliée assez directement au nombre de follicules présents dans l'ovaire. L'observation d'une incidence plus faible d'aménorrhée immédiate chez les jeunes femmes expliquerait pourquoi leurs ovaires ont été considérés comme «plus résistants» aux effets de la chimiothérapie. En fait, les jeunes femmes possèdent une réserve de follicules primordiaux plus importante et sont donc moins à même de la perdre complètement. Cependant, si elles en ont perdu une quantité significative, elles risquent quand même de développer de l'IOP, quoique plus tardivement que les femmes plus vieilles chez qui la réserve folliculaire est moins importante (Sonmezer et Oktay, 2006).

Le régime thérapeutique utilisé affecte le niveau de risque d'IOP. Le taux d'échec de la fonction ovarienne a été évalué chez des jeunes femmes traitées pour différents types de cancer (moyenne d'âge de 29 ans) avec différentes combinaisons d'agents chimiothérapeutiques (Meirou, 1999). Dans cette étude, ce taux variait selon la maladie soignée, probablement parce que les doses et la nature des agents utilisés différaient; il était de 15% pour la leucémie myéloïde aiguë, 44% pour le lymphome non Hodgkinien, 32% pour le lymphome de Hodgkin et 50% pour le cancer du sein. On y a par ailleurs évalué le risque de développer de l'insuffisance ovarienne en fonction de la composition du régime thérapeutique administré. Il a été estimé que la présence d'agents alkylants dans le régime multipliait par 3,98 ce risque, conférant ainsi à ce type d'agents une action stérilisante supérieure aux autres agents antimitotiques analysés (dérivés de platine,

antimétaboliques, alcaloïdes de plantes et antibiotiques) (Meirow, 1999). Le risque de ménopause précoce a aussi été évalué comme étant directement proportionnel à la dose d'agent alkylant administré (Chiarelli *et al.*, 1999) ou de CPA, lorsque cet agent est employé (Manger *et al.*, 2006).

#### 4.3.3 Évaluation clinique de la réserve folliculaire

À l'heure actuelle, à la suite d'une exposition potentiellement gonadotoxique, l'évaluation directe de l'état de la réserve de follicules primordiaux ne peut être effectuée précisément car celle-ci nécessite l'emploi d'un moyen invasif, le comptage direct des follicules. L'évaluation de la fonction ovarienne générale s'effectue avec des tests se basant sur la mesure d'hormones de l'axe HHO, la FSH et la LH, ou encore sur des hormones provenant de l'ovaire, telles l'estradiol, l'AMH et l'inhibine (Singh *et al.*, 2005). Quant à elles, les mesures directes de volume ovarien par sonographie ne permettent que l'estimation du nombre des plus gros follicules, ceux au stade antral (Flaws *et al.*, 2001b; Flaws *et al.*, 2000). La portée de l'ensemble de ces tests demeure limitée car en plus de montrer une variabilité considérable et d'avoir tendance à surestimer le pool folliculaire total, aucun ne reflète directement le nombre de follicules primordiaux (Baird *et al.*, 2005). Ainsi, la prédiction de la durée de la vie fonctionnelle de l'ovaire et du potentiel de fertilité des femmes ayant été exposées à des agents de chimiothérapie ou à d'autres xénobiotiques ovotoxiques demeure très difficile à établir, car ces paramètres sont plutôt reliés au nombre de follicules primordiaux restants. De surcroît, aucun des signes évalués ne traduit la qualité des ovocytes survivants (Baird *et al.*, 2005)

Les autres indicateurs de fertilité utilisés, comme l'historique des menstruations ou le taux de grossesse, n'indiquent pas directement si les ovaires sont demeurés non affectés après le traitement. En effet, la fonction ovarienne peut persister longtemps après une réduction du nombre de follicules primordiaux s'il en reste suffisamment pour reconstituer le pool de follicules en croissance. D'ailleurs, différentes études rapportent que de nombreuses patientes ont montré une cyclicité menstruelle normale après de la chimiothérapie avant de tomber en ménopause prématurément, quelques années seulement après le traitement (Byrne *et al.*, 1992; Wallace *et al.*, 1993). Une étude chez des souris qui furent soumises à différentes doses de CPA supporte également ces observations cliniques. Elle a montré que l'administration de cet agent à une dose

en mesure de détruire 50% de la réserve de follicules primordiaux n'affectait pas la performance reproductrice après le traitement, telle que mesurée par l'évaluation des taux d'ovulation, d'accouplement et de grossesse (Meirow *et al.*, 1999). Par contre, le taux de malformations au sein de la progéniture des femelles exposées augmentait lorsqu'elles étaient accouplées quelques semaines après le traitement, suggérant une atteinte directe des ovocytes en croissance au moment de l'exposition (Meirow *et al.*, 1999, 2001).

#### **4.4 Pathophysiologie des dommages ovariens causés par la chimiothérapie**

L'analyse de l'histologie ovarienne après des traitements de radiochimiothérapie a été effectuée dans quelques études. Dans des biopsies d'ovaires humains, l'atrophie du tissu, découlant d'un nombre réduit de follicules, est l'observation la plus commune; elle a été décrite après des traitements avec plusieurs agents de chimiothérapie, notamment le CPA, la vinblastine et le busulfan (Himelstein-Braw *et al.*, 1978; Marcello *et al.*, 1990; Familiari *et al.*, 1993; Damewood et Grochow, 1986). Une action directe du CPA et du chlorambucil sur les ovocytes a été suggérée après analyse de spécimens d'ovaires de femmes y ayant été exposées (Warne *et al.*, 1973; Damewood et Grochow, 1986). Après une exposition à la cisplatine *in vitro*, les follicules primordiaux de pièces corticales d'ovaires humains présentaient des cellules de la prégranulosa tumescentes et une architecture folliculaire perturbée, de par la disparition de l'ovocyte (Meirow et Nugent, 2001). Pareillement, au niveau de l'ultrastructure, les modifications des follicules après chimiothérapie incluaient le gonflement du noyau des cellules de la prégranulosa, l'atteinte des ovocytes et l'épaississement de la lame basale autour de certains follicules primordiaux (Familiari *et al.*, 1993).

Ainsi, les traitements de chimiothérapie sont associés à des troubles de la fonction ovarienne qui découlent de la destruction de follicules. En particulier, l'utilisation d'agents alkylants engendre un risque plus élevé d'anomalie de la fertilité féminine. La prochaine section survolera les caractéristiques de l'un d'eux, le CPA, ainsi que les effets directs qu'il engendre sur l'ovaire.

## **5 Usage du cyclophosphamide et effets sur la fonction ovarienne**

### **5.1 Utilisation du cyclophosphamide**

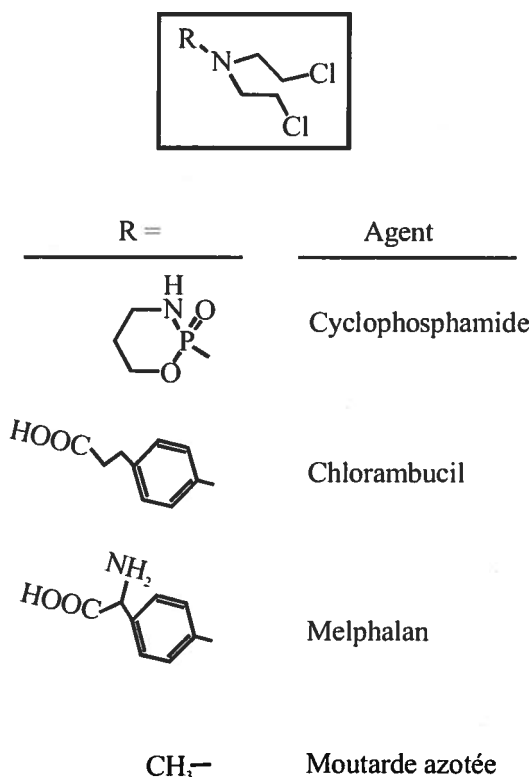
Le CPA est agent alkylant de la classe de moutardes azotées reconnu pour affecter la fonction ovarienne. Il est l'un des médicaments les plus actifs dans le traitement des cancers du sein, du poumon, de l'ovaire, de la maladie de Hodgkin et d'autres lymphomes, des myélomes, des neuroblastomes et des tumeurs de Wilm. Ses propriétés immunosuppressives sont également exploitées notamment dans le traitement de maladies comme l'arthrite, le lupus, la sclérose en plaque, ainsi que lors de transplantations d'organes (Moore, 1991).

Le CPA consiste en un cycle phosphoramidate auquel est reliée une moitié bifonctionnelle constituée de deux groupements chloroéthyl. Les autres membres du groupe des moutardes azotées partagent aussi ces deux groupements qui confèrent à ces molécules un pouvoir bis alkylant (Figure 5). Leur mécanisme principal d'action implique la création de ponts interbrins sur l'ADN, ce qui prévient sa réplication, et est justement fondé sur cette propriété bifonctionnelle (Colvin *et al.*, 1976). Le CPA lui-même est cependant sans effet thérapeutique; il doit être activé métaboliquement pour générer des métabolites aux propriétés alkylantes.

### **5.2 Paramètres de la pharmacocinétique du cyclophosphamide**

La posologie du CPA varie selon le type de maladie traitée. Il peut être administré quotidiennement à des doses de 100 à 200 mg par voie orale. Lorsque de plus fortes doses sont requises, des injections intraveineuses multiples de 600 à 100 mg/m<sup>2</sup> peuvent être administrées, à des intervalles de quelques semaines (Moore, 1991). Pour une même dose, peu importe la route d'absorption, la concentration plasmatique maximale ne diffère pas significativement (Struck *et al.*, 1987) et serait atteinte environ quatre heures après l'administration. Dans les différents tissus, comme dans le plasma, environ 20% du CPA et 67% de ses différents métabolites sont liés à des protéines (Moore, 1991). Le temps d'action du CPA serait relativement rapide puisque sa demie-vie tourne autour de 5 à 8 h (Momerency *et al.*, 1994). Cependant, son aire-sous-la-courbe de disparition plasmatique pourrait être modifiée par des interactions médicamenteuses; chez le rat, elle fut augmentée de 50% par l'administration concomitante de methotrexate et de fluorouracil, possiblement de par une réduction de sa clairance rénale (De Bruijn *et al.*, 1990), qui

atteint normalement 5.4 L. L'élimination du CPA s'effectuerait principalement via le métabolisme hépatique (Moore, 1991). Seulement 10% du CPA est retrouvé tel quel dans l'urine, la plupart étant excrété sous forme de métabolites inactifs (Bagley *et al.*, 1973). Il a par ailleurs été suggéré que ce produit était soumis de façon importante à de la recirculation entérohépatique (Dooley *et al.*, 1982).



**Figure 5 :** Différents représentants des moutardes azotées.

L'encadré illustre leur groupement commun.

Adapté de Moore (1991)

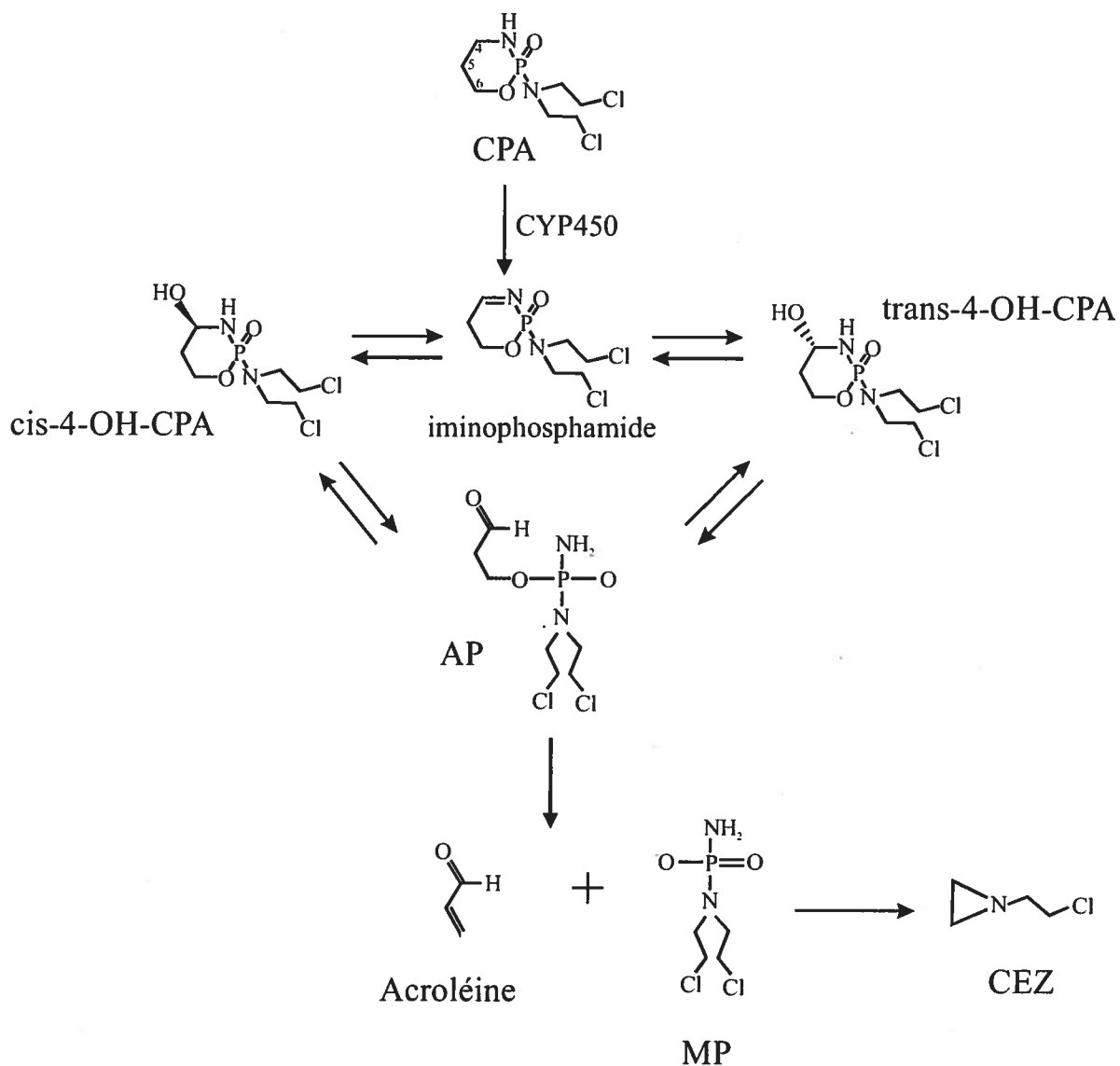
### 5.3 Métabolisme du cyclophosphamide

L'activation métabolique du CPA nécessaire à son action est initiée dans le foie par plusieurs isoformes du cytochrome P450 (Yu et Waxman, 1996). Il semble même que les niveaux protéiques de certaines isoformes (CYP3A4, CYP2C8 et CYP2C9) catalysant cette réaction d'oxydation puissent être augmentés par une exposition préalable au CPA ou à un autre oxazaphorine, l'ifosfamide, tel que démontré sur des hépatocytes en culture (Chang *et al.*, 1997).



Quoiqu'il en soit, cette oxydation sur le quatrième carbone du cycle aboutit à la formation de 4-hydroxycyclophosphamide (4-OH-CPA; Figure 6). La déshydrogénation du CPA, qui n'est pas nécessairement le résultat de l'action directe de P450, peut pour sa part générer un métabolite transitoire, l'imino-phosphamide, qui peut à son tour générer du 4-OH-CPA (*cis* ou *trans*). Le 4-OH-CPA est sujet à l'ouverture de son cycle de carbone, ce qui permet la formation du tautomère acyclique appelé aldophosphamide (AP). L'AP peut facilement être hydraté et est sujet à une réaction de  $\alpha$ - $\beta$ -élimination qui scinde la molécule en acroléine et en moutarde phosphoramidée (MP). La MP peut éventuellement générer une autre molécule au pouvoir alkylant, la chloroéthylaziridine (CEZ), par hydrolyse du lien entre les atomes d'azote et de phosphore. Dans cette cascade, seule la réaction d'oxydation initiale nécessite l'implication d'une enzyme, le reste ayant lieu spontanément (Ludeman, 1999).

Les métabolites intermédiaires du CPA (AP, 4-OH-CPA, imino-phosphamide) participent à un ensemble de réactions d'interconversion (Ludeman, 1999). Ces réactions aboutissent inéluctablement vers la formation de MP, l'agent reconnu pour exercer l'effet thérapeutique (Colvin *et al.*, 1976). Le pseudo-équilibre dans lequel ces métabolites se maintiennent se met ainsi à diminuer à mesure que la production de MP s'effectue. Cette balance des diverses formes en conversion peut être affectée par la présence de substances nucléophiles avec des groupements thiols. En ce qui concerne la MP, la conjugaison avec de tels agents est considérée comme irréversible et agit comme mécanisme de détoxification. Par contre, la liaison d'AP ou de 4-OH-CPA avec des groupes thiols amène la formation de conjugués labiles, qui contribuent à repousser la production des métabolites actifs. Ces deux intermédiaires se lient notamment avec le glutathion, mais la stabilité des complexes dépendrait de la concentration de ce nucléophile (Ludeman, 1999).

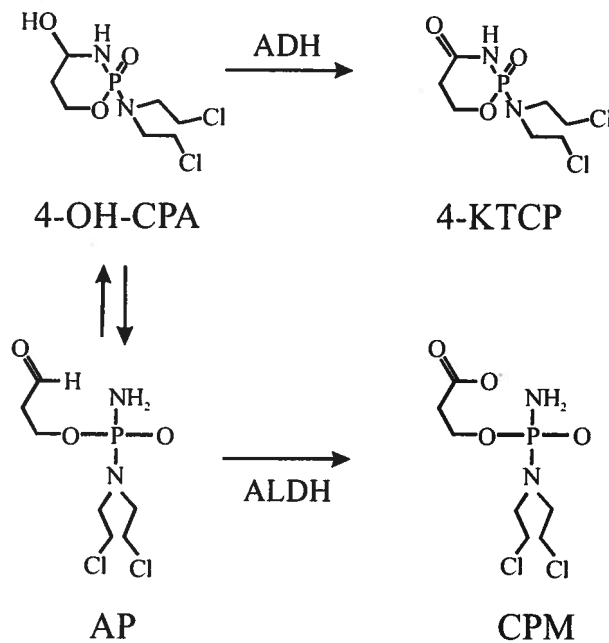


**Figure 6 :** Principaux événements impliqués dans le métabolisme du cyclophosphamide

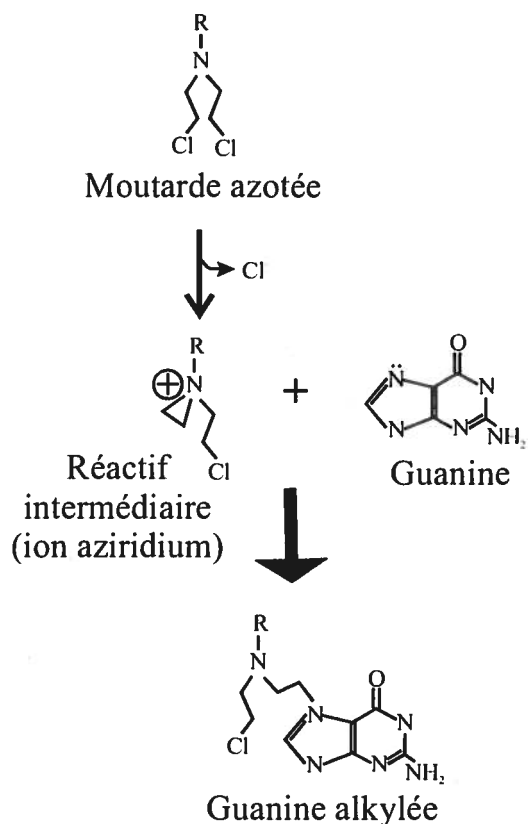
Adapté de Ludeman (1999)

Bien que la cascade amenant la formation du composé actif du CPA ne nécessite qu'une seule réaction enzymatique, plusieurs réactions catalysées par des enzymes impliquent ses métabolites (Ludeman, 1999). L'oxydation de la molécule de CPA par le P450 peut parfois s'effectuer sur le groupement méthyle de l'azote du groupe moutarde. Ce processus de déchloroéthylation mène à la formation de chloroacétylacide, un agent monoalkylant pouvant générer de la toxicité secondaire. L'oxydation de l'AP est aussi opérée enzymatiquement et constitue un mécanisme de détoxification important du CPA. La résultante de cette réaction

catalysée par une aldéhyde déshydrogénase (ALDH) est la production de carboxyphosphamide (CPM), un métabolite dont la décomposition ne mène pas à la production de MP (Figure 7). Une teneur élevée en ALDH est d'ailleurs considérée comme étant un mécanisme important de résistance des cellules cancéreuses face au CPA (Gamcsik *et al.*, 1999). Deux autres voies mineures de détoxication, en comparaison avec la production de CPM, sont l'oxydation du 4-HO-CPA en 4-ketocyclophosphamide (4-KTCP) par une alcool déshydrogénase (ADH) et l'oxydation de l'AP en alcophosphamide, qui est catalysée par une alcool déshydrogénase ou une aldo-kéto-réductase (Zhang *et al.*, 2005).



**Figure 7 :** Deux voies de détoxication du cyclophosphamide  
Adapté de Ludeman (1999)



**Figure 8 :** Alkylation d'une guanine par une moutarde azotée  
Adapté de Moore (1991)

Il est généralement accepté que la MP serait l'agent qui se lierait de façon covalente à l'ADN pour exercer l'action cytotoxique recherchée. Il s'agit d'une molécule au potentiel bis-alkylant qui réagit par un processus divisé en plusieurs étapes (Ludeman, 1999). Ce processus est initié par une attaque nucléophile intra-moléculaire de l'atome d'azote sur le carbone  $\beta$  d'une chaîne chloroéthyl; cela aboutit à la formation d'un ion aziridium (Figure 8). Ensuite, le processus nécessite une attaque inter-moléculaire par un nucléophile sur l'ion aziridium intermédiaire; cela mène à l'ouverture du cycle et à l'alkylation du nucléophile. La bis-alkylation est possible grâce à la répétition de cette séquence sur l'autre groupement chloroéthyl de la molécule de MP. La formation de ponts interbrins sur l'ADN s'effectue en général lorsque les deux nucléophiles sont sur la position N7 de résidus de déoxyguanosine sur des brins complémentaires. De tels adduits peuvent entraîner des cassures du brin d'ADN. L'acroléine, qui est produite en quantité équimolaire à la MP, peut également former des adduits avec l'ADN. Bien que ces adduits puissent être réparés par l'enzyme O<sup>6</sup>-alkylguanine-ADN-alkyltransférase

(AGT), contrairement à ceux causés par la MP (Cai *et al.*, 2000, 1999), l'acroléine pourrait être responsable de certains effets secondaires du traitement au CPA, comme des cystites hémorragiques (Batista *et al.*, 2006).

#### **5.4 Toxicité ovarienne du cyclophosphamide**

La toxicité ovarienne du CPA a été relativement bien caractérisée chez les rongeurs. Une étude regardant les effets sur la structure et la fonction ovarienne chez la souris C57BL/6N a montré une relation dépendante de la concentration et du temps entre la toxicité ovarienne et le CPA (Plowchalk et Mattison, 1992). Une seule injection de cet agent a causé une diminution significative des nombres de follicules primordiaux et antraux à des doses de 75 à 200 mg/kg. Le CPA a par ailleurs détruit totalement les follicules primordiaux lorsqu'il fut administré à 300 mg/kg et ce, à l'intérieur de 72 h. Ce stade folliculaire s'est montré comme le plus sensible car 50% étaient perdus à 122 mg/kg tandis que ce taux de perte n'était atteint qu'à 200 mg/kg pour les follicules antraux. Quant au nombre des autres follicules en croissance, il fut diminué seulement à plus long terme (7 jours) à la dose la plus forte (500 mg/kg), vraisemblablement à cause de la destruction des follicules primordiaux observée aux points de temps précédents (1 et 3 jours). À l'intérieur de 24 à 72 h après le traitement, plusieurs follicules primordiaux montraient une symétrie distordue entre l'ovocyte et son noyau, aboutissant à une condensation et au marquage plus foncé du matériel nucléaire. Malgré cela, les cellules de la granulosa de ces follicules maintenaient une apparence saine. Puisque des signes histologiques proches de l'atrésie ont quand même été observés chez ces follicules en croissance, les auteurs ont suggéré qu'une grande proportion serait en mesure de recouvrer face aux effets de cet agent; en effet leur nombre était rétabli 14 jours après l'exposition, une période trop courte pour suggérer leur remplacement par des follicules primordiaux (Plowchalk et Mattison, 1992). Dans une autre étude, le nombre de follicules primordiaux de souris Balb/c s'est vu affecté de façon dépendante à la dose de CPA à partir d'une concentration aussi faible que 20 mg/kg, lorsque compté sept jours suivant une injection simple (Meirow *et al.*, 1999). Il est connu que la sensibilité des follicules primordiaux au CPA varie entre les souches de souris et entre les espèces (Shiromizu et Mattison, 1984).

Chez le rat, la sévérité des dommages folliculaires semblerait directement corrélée à l'activité proliférative des cellules de la granulosa au moment de l'exposition. En effet, l'observation des dommages ovariens à la suite d'une exposition aiguë à cet agent jusqu'à 200 mg/kg chez des rats Sprague-Dawley n'a pas révélé une diminution du nombre de follicules primordiaux. Seul le nombre de follicules antraux sains ont été diminué, et seulement à partir de 150 mg/kg (Jarrell *et al.*, 1987, 1991; Davis et Heindel, 1998). À cette dose, d'ailleurs, davantage de dégradation nucléaire (TUNEL et gel d'agarose) a été observée dans les cellules de la granulosa au stade antral, 24 h après l'injection du produit (Lopez et Luderer, 2004). Par contre, dans les follicules préovulatoires, les cellules de la granulosa différenciées présentaient peu de dommages (Davis et Heindel, 1998). À partir de 200 mg/kg, des signes d'altération des cellules de la granulosa ont cependant été repérés dans tous les follicules plus avancés qu'au stade primaire (Davis et Heindel, 1998). La viabilité et la capacité de production de stéroïdes de cellules de la granulosa (récoltées à partir des plus grands follicules) de rat s'étaient déjà avérées pouvoir être diminuées lorsque ces cellules étaient exposées *in vitro* à une forme activée de CPA, le 4-hydroperoxycyclophosphamide (4HC; Ramahi-Ataya *et al.*, 1988).

De façon concomitante avec l'altération de la fonction/survie des cellules de granulosa dans les follicules antraux, une chute des niveaux d'estradiol et de progestérone a été observée à court terme après l'exposition *in vivo* chez le rat. Ces baisses étaient également associées à une hausse de la FSH et à une diminution du nombre de corps jaunes résultant de la réduction des ovulations et la perturbation de la cyclicité vaginale (Jarrell *et al.*, 1991; Davis et Heindel, 1998). Malgré tout, la performance reproductrice des rates à long terme ne semble pas être diminuée par une exposition simple au CPA (Jarrell *et al.*, 1991), ce qui supporte l'idée que les effets d'une altération des follicules antraux sur la fonction ovarienne sont temporaires.

Chez le rat, le déséquilibre du nombre de follicules sains sur le nombre total de follicules provoqué par le CPA serait compensé par un recrutement plus important de follicules, avec pour conséquence de rehausser ce ratio 24 à 72 h post-injection (Davis et Heindel, 1998). Ainsi, bien que les follicules primordiaux de rats ne soient pas détruits directement par le CPA, leur recrutement serait accru après une exposition à cet agent, et en définitive, la diminution de la réserve folliculaire pourrait aussi être accélérée (Davis et Heindel, 1998).

Il a été proposé que l'ovaire ne puisse pas métaboliser directement le CPA et que la toxicité induite dans cet organe soit due essentiellement à l'entrée des métabolites en provenance du sang (Ataya *et al.*, 1990). Une étude *in vivo* a cherché à déterminer directement le rôle relatif de deux métabolites du CPA dans la toxicité ovarienne chez la souris (Plowchalk et Mattison, 1992). Parmi les produits utilisés, aucun des deux composés générant de l'acroléine sans produire de MP n'a affecté le nombre des follicules primordiaux, en croissance ou antraux. Pour leur part, les composés générant la MP se sont avérés en mesure de diminuer les nombres de follicules primordiaux et antraux. Contrairement au CPA seul, ces produits ont également entraîné la baisse du nombre des autres follicules en croissance (Plowchalk et Mattison, 1992). Cette étude suggère donc que la MP serait le métabolite ultime qui, après avoir pénétré dans l'ovaire, détruirait les follicules.

## 6 Objectifs

Les effets rapportés du CPA dans l'ovaire font état de variations en fonction du type cellulaire, du type folliculaire et, de surcroît, entre les espèces. Ces éléments suggèrent qu'il puisse exister des différences dans le métabolisme systémique et/ou ovarien du CPA et dans la capacité de réaction des cellules ovariennes aux atteintes que ce composé peut leur porter. Une compréhension plus approfondie des bases physiologiques de ces différences est donc nécessaire afin de pouvoir mieux évaluer les risques que courent les femmes exposées à cet agent ovotoxique et à d'autres.

L'étude des mécanismes de destruction des petits follicules ovariens est limitée par l'accès à ces follicules au stade adulte. Les conclusions ayant trait aux follicules préantraux sont rarement concluantes de par l'impossibilité à isoler des fractions pures de ce type de follicule et de par le fait qu'ils ne représentent, à cause de leur taille, qu'une très petite portion du tissu ovarien au stade adulte. De ces limitations surgit la pertinence d'établir les conditions pour étudier la toxicité dirigée vers ces petits follicules dans un contexte où ils sont prédominants. Un système de culture d'ovaires néonataux offre cet avantage en plus de permettre le maintien de l'intégrité du tissu et des follicules qu'il contient, qui sont des unités fonctionnelles complexes et multicellulaires.

Les présents travaux poursuivaient le but d'étudier la toxicité des métabolites du CPA sur les follicules préantraux dans un système de culture d'ovaires néonataux. En premier lieu, ils visaient à déterminer les concentrations toxiques effectives de différents métabolites du CPA sur des ovaires de souris *in vitro* et à ultimement effectuer la comparaison avec les ovaires de rat. Ensuite, l'objectif était de caractériser dans le temps la destruction folliculaire et les différents types cellulaires entraînés vers la dégénérescence par le CPA dans les ovaires cultivés. Enfin, l'investigation de la voie de mort cellulaire par laquelle les cellules ovariennes sont éliminées par le CPA a été amorcée, en tentant de localiser *in situ* des marqueurs de dégradation nucléaire et d'apoptose.



## Section II: Article

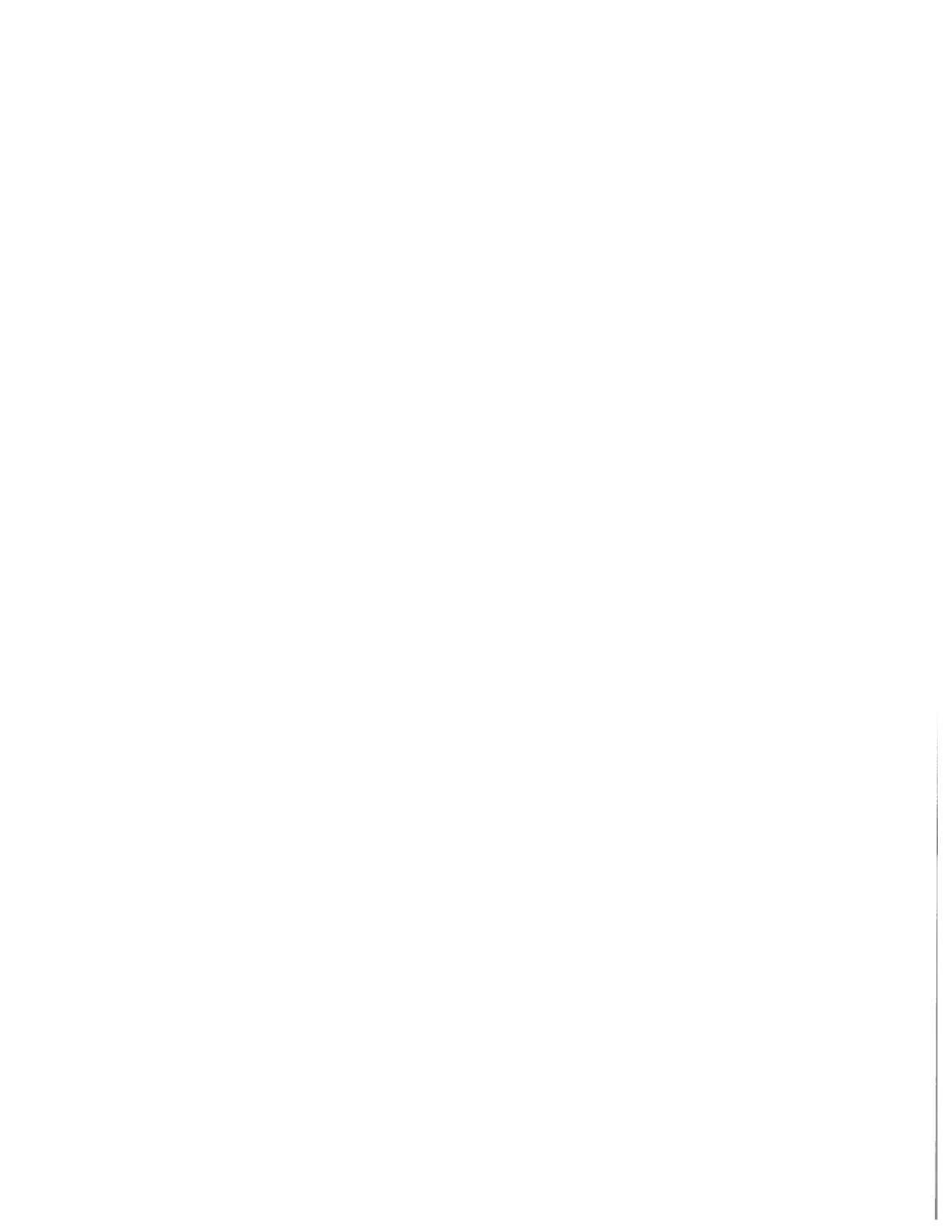
*Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.*

Desmeules P. et Devine P.J., 2006. Characterizing the ovotoxicity of cyclophosphamide metabolites on cultured mouse ovaries. *Toxicological sciences* 90(2): 500-509.

doi: 10.1093/toxsci/kfj086

### Résumé en français de l'article

Le cyclophosphamide (CPA), un agent alkylant utilisé en chimiothérapie, est connu pour avoir un pouvoir de destruction élevé des follicules ovariens primordiaux chez les rongeurs et l'humain. Malgré que la toxicité ovarienne du CPA soit assez bien décrite, le mécanisme de destruction de ces follicules dormants demeure incompris. Ce manque de connaissances réside en partie dans la structure complexe de l'ovaire, qui restreint l'accès à ces follicules. Nous présentons ici la caractérisation de la sensibilité ovarienne à différents métabolites du CPA et le rythme des altérations morphologiques induites par la moutarde phosphoramidée (MP, un métabolite actif du CPA) *in vitro* sur des ovaires néonataux, qui donne accès à de nombreux follicules primordiaux. Des ovaires intacts de souris prélevés au jour post-natal 4 ont été placés en culture et exposés à différents produits de dégradation du CPA au jour 0 de culture. Après une culture allant jusqu'à 8 jours, les tissus ont été récoltés pour effectuer le comptage de follicules après histologie classique ou immunohistochimie. Le 4-hydroperoxy-CPA (4-HC), un précurseur de métabolite activé du CPA, et la MP ont entraîné une diminution significative du nombre de follicules primordiaux et primaires à des concentrations supérieures ou égales à 1 et 3 JJ.M, respectivement ( $p > 0.05$ ). L'acroléine a affecté le nombre de follicules seulement après des expositions répétées pour une concentration au-delà de 30 JJ.M. Le carboxyCPA et le 4-ketoCPA ont pour leur part causé une réduction du nombre de follicules primordiaux et primaires petits seulement à la concentration la plus élevée (100 JJ.M). La perte de follicules induite par la MP est devenue significative après 1 ou 2 jour(s) d'exposition après des expositions à 10 ou 3 JJ.M, respectivement, tel que déterminée par le comptage des follicules présentant des signes de pycnose et un marquage de dégradation nucléaire (TUNEL). Les types cellulaires pycnotiques

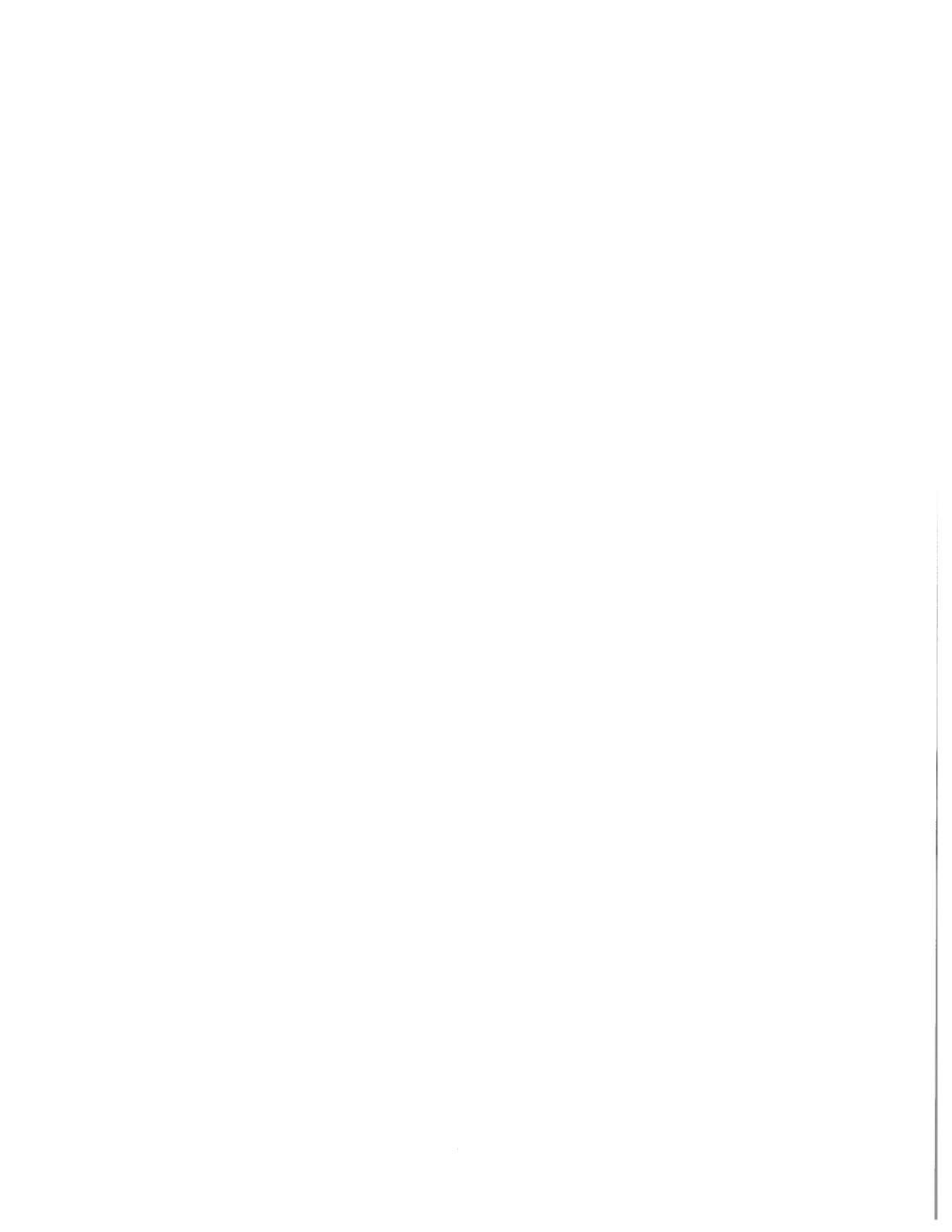


variaient selon le stade folliculaire, à savoir les ovocytes dans les plus petits follicules et les cellules de la granulosa dans les follicules primaires grands. Le marquage au TUNEL a été observé dans les deux types cellulaires, mais la caspase 3 activée, qui peut être présente lorsque l'apoptose est enclenchée, n'a pas été détectée dans les cellules des follicules primordiaux. De plus, l'administration d'un inhibiteur de caspases pan-spécifique parallèlement à la MP n'a pas prévenu la perte de follicules induite par cet agent. Ainsi, de brèves expositions à la MP ou au 4-HC peuvent induire des pertes de follicules permanentes dans les ovaires, et la MP est vraisemblablement le métabolite du CPA ultimement ovotoxique. Par ailleurs, il semble que la voie de mort cellulaire empruntée par les follicules primordiaux à la suite d'une exposition à cet agent et à ces concentrations soit indépendante des caspases.

#### **Contribution des co-auteurs**

L'étudiant a effectué la totalité des travaux présentés dans cet article. Le professeur Devine a participé en développant les bases du projet, en effectuant les comptages en double des nombres de follicules, le suivi de certaines cultures d'ovaires et enfin, en contribuant significativement à la rédaction et à la correction du manuscrit.

NOTE : Dans la partie Résultats de l'article, à la page 59 de ce mémoire, des inversions dans les références à la figure 4 sont présentes. On devrait lire 4A, 4B et 4C au lieu de 4B, 4C et 4E, respectivement, et une référence à la figure 4E devrait être rajoutée à la fin de la phrase: <<Large primary follicles with pyknotic[...] than in control ovaries (4E). In para/le/, [...]»



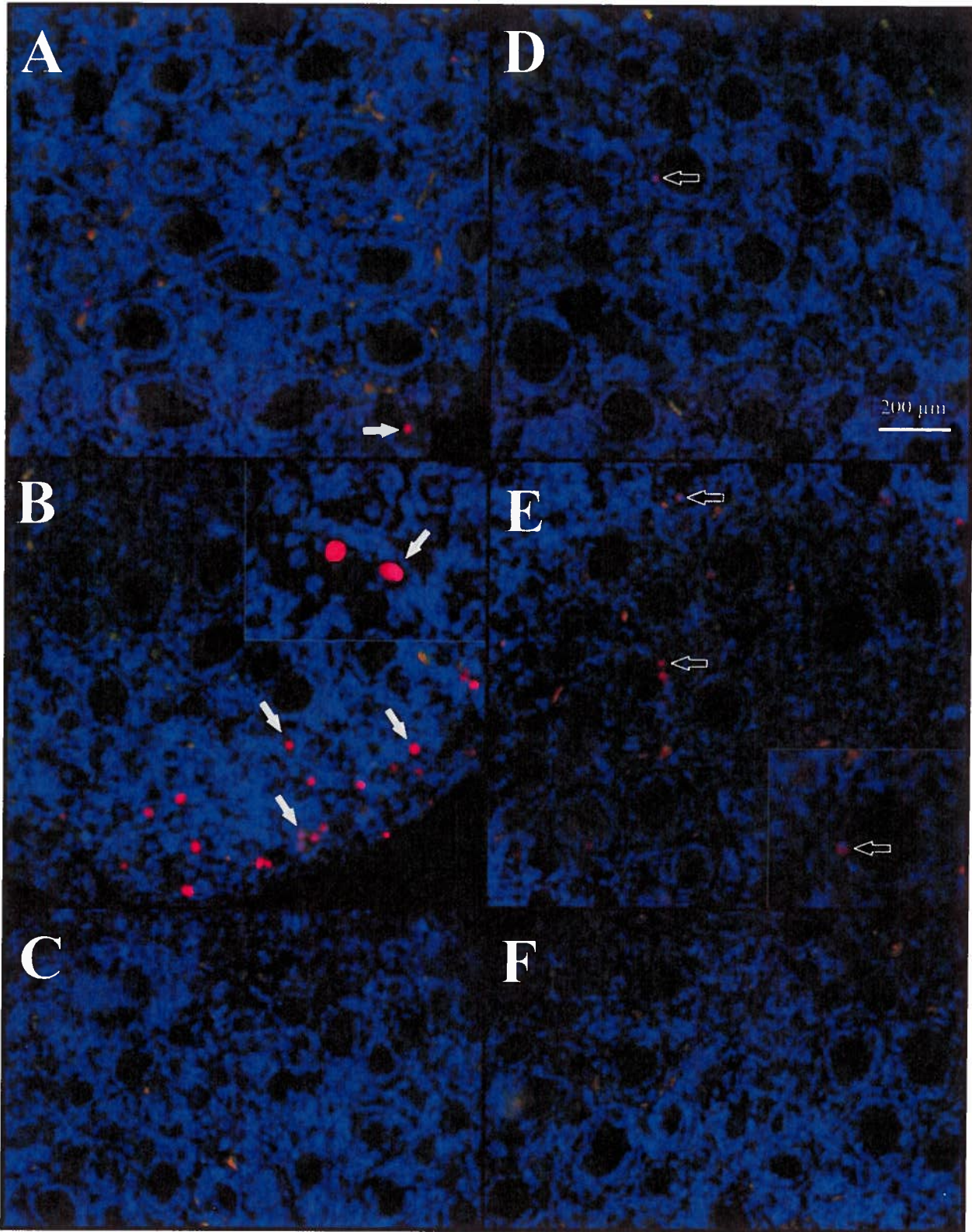
TUNEL

CASPASE-3

Control 24h

10 $\mu$ M PM 24h

Negative control



## **SUPPLEMENTARY DATA**

**Supplementary Figure 1:** Fluorescent immunohistochemical staining of cultured PND4 CD-1 mouse ovaries with or without PM. Red staining shows TUNEL (A-C) or cleaved Caspase-3 (D-F) staining in untreated ovaries (A, D), ovaries exposed 24 h to 10 $\mu$ M PM (B, E), and negative controls (C, F). Staining of nuclei (Hoechst) is in blue. Green/grey structures are red blood cells. Representative images of ovarian sections (n = 5-8 ovaries per condition) from 3-4 experiments are shown. Arrows show stained oocytes (solid arrows) or granulosa cells (hollow arrows).

## Discussion générale et conclusions

La présente étude a permis de tester le potentiel d'un système de culture d'ovaires néonataux pour étudier la toxicité ovarienne du CPA. Les concentrations nécessaires pour générer de la toxicité ovarienne avec différents métabolites du CPA ont été déterminées, mais davantage dans le but de valider le système que pour mimer les effets rapportés *in vivo*. Toutefois, les effets connus de cet agent sur les petits follicules préantraux de souris y ont été reproduits. En utilisant directement la MP, ou un composé la générant, les types cellulaires affectés et le moment d'apparition des signes de dégénérescence se sont révélés identiques à ce qui fut observé *in vivo* après exposition au CPA (Plowchalk et Mattison, 1991, 1992). Les métabolites de cet agent entraînent la pycnose de l'ovocyte des follicules aux stades primordial et primaire petit et peut induire l'apoptose des cellules de la granulosa aux stades plus avancés du développement folliculaire.

Les résultats obtenus lors de cette étude montrent qu'il est possible d'utiliser directement la MP pour reproduire la toxicité ovarienne du CPA sur les petits follicules préantraux *in vitro*. Par ailleurs, le rôle potentiel d'un autre métabolite (volatile) a aussi été soulevé. On soupçonne que ce métabolite est la chloroéthylaziridine (CEZ) parce que cette molécule constitue le produit majeur de décomposition de la MP *in vitro* et qu'à pH physiologique, très peu de moutarde norazotée est générée à partir de la MP (Lu et Chan, 2006; Watson *et al.*, 1985). Une récente étude rapporte que chez le rat, la CEZ possède une demie-vie et un volume de distribution supérieurs au 4-OH-CPA et à la MP (Lu et Chan, 2006), suggérant qu'elle puisse être plus largement distribuée dans les tissus que ses précurseurs; ces paramètres ont incité ces auteurs à suggérer que la CEZ puisse contribuer de façon significative à l'action antitumorale du CPA. La puissance observée du métabolite volatile dans notre étude et la charge de la MP à pH physiologique, ce qui sème le doute quant à sa capacité de gagner adéquatement le milieu intracellulaire, fait surgir la question de l'importance relative de ces deux molécules dans la toxicité ovarienne du CPA. *In vitro*, la fraction de MP convertie en CEZ a déjà été estimée à 32 % (Lu et Chan, 2006) et la demie-vie de ce produit de dégradation serait plus longue (Engle *et al.*, 1982) que celle de la molécule mère. Dans ce contexte, la possibilité, dans le système de culture utilisé, que la faible pénétrance de la MP la compartimente à l'extérieur de l'ovaire et que les effets toxiques observés soient

principalement dus à la génération de CEZ ne peut être exclue. Ainsi, une investigation approfondie des effets directs de la CEZ sur l'ovaire sera nécessaire pour clarifier ce point.

Cette étude a par ailleurs révélé que deux métabolites du CPA considérés comme non toxiques (CPM et 4-KTCP) ont généré dans l'ovaire, à forte concentration, des effets similaires à ceux des agents plus puissants. Ces métabolites ne sont pas connus pour générer de la MP, mais l'étude de la structure de ces molécules révèle la présence de groupements chloroéthyl (Ludeman, 1999). Il serait pertinent de se demander si ces groupements pourraient leur conférer un certain pouvoir alkylant, très faible en comparaison à la MP, ne se manifestant qu'à de très fortes concentrations. Un pouvoir mutagène de ces deux métabolites sur *Escherichia coli* avait déjà été soulevé et s'était là aussi révélé largement inférieur à celui de la MP ou de l'acroléine (Ellenberg, 1977). Par ailleurs, une réversion potentielle de la réaction d'oxydation nécessaire pour générer ces métabolites pourrait s'opérer partiellement, à fortes doses, régénérant de l'AP ou du 4-OH-CPA; l'occurrence de cette réaction n'a toutefois pas encore été décrite. Malgré tout, les fortes doses requises pour détruire les ovocytes avec ces deux composés sont probablement largement supérieures à celles auxquelles l'ovaire pourrait être exposé *in vivo*.

L'évaluation de l'ovotoxicité de l'acroléine au moyen de ce système *in vitro* s'est avérée moins probante. La plus faible concentration nécessaire pour diminuer le nombre de follicules primordiaux avec l'acroléine peut plus difficilement être comparée directement à celle de la MP ou du 4HC, parce que ce produit est plus volatile (Ghilarducci et Tjeerdema, 1995). L'acroléine est pourtant connue pour exercer des effets cytotoxiques à 30 µM sur des cellules CHO en culture après une exposition aussi courte qu'une heure (Cai *et al.*, 1999). Malgré tout, un système de culture fermé pourrait s'avérer nécessaire pour mieux caractériser, sur l'ovaire, la toxicité de ce produit auquel l'humain peut être exposé par de multiples sources, comme la fumée de cigarette et les gaz d'échappement automobile (Ghilarducci et Tjeerdema, 1995). Dans le système ouvert utilisé ici, l'emploi de cette substance volatile s'est probablement traduit par une exposition excessivement courte du tissu ovarien. L'ovotoxicité de l'acroléine après de multiples expositions à fortes doses suggère quand même qu'elle puisse jouer un rôle direct dans la toxicité ovarienne du CPA. On s'attend d'ailleurs à ce qu'elle soit produite en fraction équimolaire à la MP (Ludeman, 1999) au site d'action lorsque le 4-OH-CPA (ou le 4HC, *in vitro*) pénètre dans



l'ovaire et qu'il puisse moduler la cytotoxicité de cet autre métabolite actif (Blomgren et Hallstrom, 1991; Wilmer *et al.*, 1990). L'acroléine possède aussi la capacité d'interagir avec l'ADN, mais les lésions qu'elle engendre seraient apparemment réparées par l'enzyme de réparation de l'ADN O<sup>6</sup>-alkylguanine-ADN-alkyltransférase, contrairement à celles occasionnées par la MP (Cai *et al.*, 1999, 2000). Toutefois, l'activité de cette enzyme dans l'ovaire et les ovocytes demeure inconnue. Par ailleurs, l'acroléine pourrait jouer un rôle indirect dans la toxicité ovarienne du CPA, car il a été fait mention qu'elle puisse inhiber certaines formes de l'ALDH, enzymes impliquées dans la détoxification du CPA (Rekha et Sladek, 1997; Ren *et al.*, 1999).

La sensibilité aux effets du CPA diffère entre les espèces de mammifères et même à travers les souches. Il a été proposé que des variations dans la bioactivation puissent être à la source de ces différences (Anderson *et al.*, 1995). Au niveau des follicules primordiaux ovariens, la sensibilité au CPA des rats est de beaucoup inférieure à la souris et cette différence a également été attribuée à des variations dans le métabolisme extraovarien (Davis et Heindel, 1998). En effet, on suppose que les métabolites ovotoxiques exercent leurs effets après pénétration dans l'ovaire via la circulation sanguine (Ataya *et al.*, 1989). Leur cinétique modulerait donc leur pouvoir ovotoxique. La possibilité d'éviter le métabolisme extraovarien dans le système *in vitro* a donc été exploitée pour montrer que le nombre de follicules primordiaux est diminué seulement à partir de 30 µM de MP dans des ovaires de rats néonataux, en contraste avec les 3 µM nécessaires chez la souris (Voir Annexe 1). Ces résultats suggèrent donc que les follicules primordiaux de rats présentent une résistance intrinsèque à la MP supérieure par rapport aux souris. Ainsi, les différences inter-espèces observées pourraient reposer davantage sur des bases cellulaires que sur le métabolisme général du CPA, tel que déjà proposé d'ailleurs (Fleming, 1997). Il n'en demeure pas moins que les réactions de bioactivation du CPA peuvent clairement affecter la production de métabolites qui atteindront l'ovaire. Ces réactions varieraient même selon le stade de développement de l'organisme; le métabolisme global du CPA, *in vivo*, serait en effet plus rapide chez l'enfant que chez l'adulte (Tasso *et al.*, 1992). Ainsi, d'autres expériences seraient nécessaires pour effectuer une transposition directe des résultats obtenus des ovaires néonataux vers l'ovaire adulte; l'investigation de la toxicité de

la MP sur l'ovaire adulte devrait être entreprise sur des pièces corticales ovariennes de rongeurs pour pouvoir effectuer cette comparaison.

Les différences importantes de toxicité ovarienne du CPA entre les rongeurs compliquent l'extrapolation chez les humains des résultats obtenus à partir d'autres espèces. Le recours à des systèmes *in vitro* sera nécessaire pour évaluer directement la résistance des follicules primordiaux humains puisque les moyens techniques actuels ne permettent pas d'évaluer précisément les nombres exacts de follicules primordiaux chez la femme (Singh *et al.*, 2005). Plusieurs rapports suggèrent que l'IOP est une conséquence directe des traitements de chimiothérapie avec le CPA (Anasti, 1998; Meirou et Nugent, 2001; Falcone *et al.*, 2004; Sonmezer et Oktay, 2006). Cependant, son pronostic dépend partiellement de l'âge et certaines études ne montrent pas de relations directes entre les traitements de chimiothérapie et l'IOP (Byrne, 1999). Les faibles effectifs et les expositions à des régimes d'agents variés au cours des traitements compliquent l'interprétation des résultats de ces études. Néanmoins, l'absence de marqueurs de la réserve de follicules primordiaux implique que les changements dans ce pool folliculaire ne peuvent être détectés avant qu'ils ne disparaissent entièrement et que la ménopause survienne (Singh *et al.*, 2005). Le rapport de plusieurs cas d'IOP chez des travailleuses de Corée exposées professionnellement au 2-bromopropane (Koh *et al.*, 1998) traduit bien le manque actuel de moyens pour évaluer et prévenir les dommages ovariens avant que des effets irréversibles ne se manifestent.

Cette étude a par ailleurs permis de soulever la délicatesse de la caractérisation temporelle de la dynamique folliculaire dans les ovaires cultivés. Dans les ovaires témoins, le nombre de follicules primordiaux sains a diminué au huitième jour de culture tandis qu'aucune augmentation du nombre de follicules atrétiques de ce stade n'a été décelée (Tableau 1 de l'article). Le nombre de follicules primaires sains (petits et grands) a quant à lui stagné, tandis que plus de follicules atrétiques de ce stade ont été observés à partir du quatrième jour de culture (Fig. 2 et 4 de l'article). Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que pendant la période de culture, des follicules primordiaux ont été recrutés et que les follicules primaires qu'ils sont devenus ont contribué à remplacer les follicules de ce stade ayant dégénéré. Cependant, la durée du processus de dégénérescence des follicules préantraux est inconnue, particulièrement *in vitro*. La latence

des follicules en dégénérescence dans le tissu cultivé et leur addition dans les comptes effectués au fil du temps est également probable, particulièrement à la lumière de la comparaison du déroulement dans le temps des nombres de follicules pycnotiques et sains (Fig. 2 et 4 et Tableau 1 de l'article). Le processus d'atrésie dans les follicules antraux pourrait s'échelonner sur plus de 48 h (Osman, 1985) mais le développement des petits follicules est excessivement lent, et tel pourrait être leur dégénérescence, *in vitro* ou même *in vivo*.

Le phénomène d'atrésie des petits follicules préantraux est mal compris et peu étudié. Cependant, il a été suggéré qu'il s'initierait dans l'ovocyte dans les plus petits follicules et dans la granulosa aux stades plus avancés de développement folliculaire (Reynaud et Driancourt, 2000; Morita et Tilly, 1999; Matikainen *et al.*, 2001b). Dans les plus petits follicules, le maintien d'une apparence saine des cellules de la granulosa alors que l'ovocyte montre des signes de dégénérescence donne à penser que la MP déclencherait un processus de mort semblable à celui mis en branle au cours de l'atrésie dans ces follicules; cela reste cependant à confirmer.

Quant à elle, l'atteinte des cellules de la granulosa des follicules primaires grands constitue un signe de dégénérescence plus ressemblant à ce qui est observé dans les follicules des derniers stades préantraux au stade préovulatoire. Ces cellules sont en division, malgré que ce processus puisse y être très lent par rapport aux stade antral (Hirshfield, 1991; Meredith *et al.*, 2000). Le CPA est reconnu pour affecter les cellules avec un index mitotique plus élevé (Ataya *et al.*, 1989; Colvin *et al.*, 1976) parce que comme les autres agents alkylants, ses métabolites bloquent la réplication de l'ADN en y formant des ponts intermoléculaires pouvant générer des cassures (Fritz *et al.*, 1997). Il apparaît donc normal que la MP entraîne la mort des cellules de la granulosa au stade primaire (grand) plutôt que dans les follicules primordiaux, où les cellules de la prégranulosa sont quiescentes (Hirshfield, 1991). Dans les follicules antraux affectés par le CPA, des cellules de la granulosa avec une taille plus grande ont été observés et cette réaction serait attribuable à un blocage au stade G2 du cycle cellulaire (Pendse *et al.*, 2004).

Nos résultats suggèrent par ailleurs que la prolifération de cellules dans la granulosa pourrait possiblement contribuer en à remplacer certaines tuées par le CPA et permettre au follicule primaire grand de se maintenir en vie, du moins à court terme. En effet, la présence de

plus de follicules primaires grands avec des cellules pycnotiques dans la couche de granulosa au jour 2 d'exposition à 3  $\mu$ M de MP (Fig 4-e de l'article) ne s'est pas soldée par une diminution significative du nombre de ces follicules après huit jours de culture (Données non montrées). Cette idée nécessite toutefois plus d'investigations.

À l'inverse des cellules de la granulosa, la plupart des ovocytes exposés à la MP ont dégénéré aux stades primordial et primaire petit, tandis que beaucoup d'entre eux ont maintenu une apparence normale au stade primaire grand, au moment où le maximum de pycnose a été observé. Ces observations opposées concernant les deux types cellulaires compliquent l'élucidation des mécanismes d'ovotoxicité, mais elles se rejoignent au moins sur le point que les différences physiologiques y étant à la base sont présentement inconnues dans l'ovaire. Dans les cellules germinales mâles, où les effets du CPA sont aussi intimement reliés au stade de la spermatogenèse (Trasler *et al.*, 1986), une exposition aiguë au CPA peut nuire à la progression méiotique des spermatocytes au stade pachytène (Aguilar-Mahecha *et al.*, 2005). Cependant, les ovocytes demeurent bloqués au même stade de la méiose tout le long de la folliculogenèse (Hirshfield, 1991), ce qui limite en partie la comparaison des effets du CPA chez les gamètes entre les deux sexes.

Les différences de réaction au CPA des ovocytes en fonction du stade folliculaire pourraient simplement être de nature physique. La capacité de ces composés à pénétrer les cellules pourrait en effet être limitée par les différences de taille entre les structures et la synthèse de la *zona pellucida* à partir du stade primaire (Hirshfield, 1991). Par contre, l'utilisation d'un marqueur de cassures d'ADN a révélé la présence de foyers nucléaires dans les ovocytes, de façon assez uniforme dans le tissu et au sein des plus grands follicules primaires (Voir l'Annexe 2). Cela suggère que le métabolite causant ces effets diffuse bien dans l'ovaire et dans tous les types cellulaires et folliculaires.

Au niveau des cellules tumorales, les mécanismes identifiés de résistance au CPA incluent des variations à la hausse de niveaux de molécules de détoxification comme le glutathion, de l'activité d'enzymes de détoxification comme l'ALDH (Bunting et Townsend, 1996 a,b) ou des mécanismes de réparation de l'ADN, notamment celui basé sur l'excision de nucléotides

(Andersson *et al.*, 1996; Gamcsik *et al.*, 1999). Bien qu'il semble plausible que de telles différences soient présentes en fonction du type folliculaire et entre les cellules ovariennes, qui traversent de nombreux états de différenciation, elles ne sont présentement pas identifiées.

Les niveaux de glutathion ou d'autres molécules de détoxification dans l'ovaire pourraient varier d'une espèce à l'autre et être dépendants du stade folliculaire et du type cellulaire. En ce qui concerne le glutathion, il semble son niveau, dans l'ovaire entier, ne varieraient que très peu entre les espèces et les souches de souris (Mattison *et al.*, 1983b). Par contre, il serait plus faible au stade néonatal (Mattison *et al.*, 1983b), mais cette différence pourrait être attribuable à l'absence de *corpus luteum*, où l'expression des enzymes le produisant pourrait être plus importante (Eliasson *et al.*, 1999). Chez le rat, la déplétion du glutathion *in vivo* n'a cependant pas entraîné de changements dans le nombre de follicules antraux détruits par le CPA (Lopez et Luderer, 2004); on ne sait pas quel a été l'effet de ce traitement sur le nombre de petits follicules car ils n'ont pas été comptés dans cette étude. La mesure des différences de niveau de tels agents dans les petits follicules est compliquée par la difficulté à en isoler des fractions pures. Elle pourrait être facilitée par le recours au système de culture utilisé ici, contenant des populations folliculaires un peu plus homogènes.

Quant à elle, la capacité à réparer les dommages à l'ADN engendrés par le CPA constitue un enjeu important pour les cellules germinales. Chez le mâle, l'expression de gènes impliqués dans la réparation d'ADN semble altérée par le CPA dans les cellules germinales, et différemment en fonction de la phase de la spermatogenèse (Aguilar-Mahecha *et al.*, 2001, 2002). La hausse de l'expression de certains de ces gènes dans les spermatides et les spermatozoïdes après une exposition aiguë suggère que ces processus soient impliqués dans la réponse au CPA (Aguilar-Mahecha *et al.*, 2001). L'importance de la capacité à réparer l'ADN dans la résistance au CPA est également traduite par l'observation que l'inhibition de PARP, une enzyme de réparation de l'ADN dont la suractivation peut mener à la nécrose par déplétion d'ATP (Virag et Szabo, 2002), rehausse le pouvoir délétère de cet agent alkylant sur des cellules CHO (Tatsumi-Miyajima *et al.*, 1999). Dans les petits follicules préantraux, la détection du polymère synthétisé par cette enzyme pourrait être entreprise à la suite d'expositions *in vitro* à la MP. Il serait

également intéressant de tester si son inhibition entraîne une sensibilisation de ces petits follicules face à la MP.

En utilisant un marqueur de cassures d'ADN double brin dans des ovaires exposés *in vitro* à la MP, nous avons observé des proportions significativement élevées d'ovocytes de follicules primordiaux et primaires marqués (Annexe 2). Or, bien que l'on ait pu observer de nombreux foyers de la forme phosphorylée de l'histone H2AX dans une grande proportion d'entre eux, la plupart des ovocytes des follicules primaires grands maintiennent une apparence saine après ces expositions. Cette observation suggère que des différences dans la réponse ou la capacité de réparation face à ce type de lésion puissent exister en fonction de l'état d'avancement du follicule ou de l'ovocyte. Elle ouvre ainsi la voie à une investigation plus approfondie des événements en aval de la phosphorylation de H2AX dans les ovocytes, notamment le recrutement des facteurs de réparation d'ADN qui s'effectue au niveau des foyers (Paull *et al.*, 2000).

L'atteinte de l'intégrité de l'ADN des mitochondries pourrait aussi s'avérer une piste de recherche intéressante pour tenter d'expliquer la différence de réaction des ovocytes de différents stades folliculaires au CPA. Moins de mitochondries sont retrouvées dans les ovocytes de follicules primordiaux par rapport aux primaires (Jansen et de Boer, 1998) et cet état pourrait contribuer à les sensibiliser face à un tel type de dommage. Il a déjà été proposé que l'atrésie est un moyen évolutif d'éliminer les ovocytes dont la qualité des mitochondries est atteinte (Krakauer et Mira, 1999). De plus, l'injection de mitochondries purifiées dans des ovocytes ovulés en culture en diminuait le nombre en apoptose (Perez *et al.*, 2000). Enfin, bien que plusieurs mécanismes de réparation de l'ADN mitochondrial aient été identifiés dans les cellules eucaryotes, il semble que la capacité à effectuer de la réparation de l'ADN par recombinaison, processus nécessaire pour réparer certaines lésions engendrées par le CPA, puisse varier d'un tissu à l'autre (Stuart et Brown, 2006) et ainsi, pourrait potentiellement être moindre dans l'ovaire. Le rôle que joue la préservation de la qualité et de la quantité des mitochondries dans la différence de sensibilité des ovocytes aux xénobiotiques demeure encore à établir. Parmi le type d'expériences qui pourraient être réalisées dans l'ovaire figurent le suivi de l'expression de gènes mitochondriaux ou l'évaluation directe de la morphologie et du nombre de ces structures au moyen de la microscopie électronique après une exposition à la MP.

La localisation *in situ* de la fragmentation nucléaire dans les ovaires exposés à la MP a présenté quelques limites. L'utilisation du marquage au TUNEL s'est révélée moins sensible que l'identification des cellules pycnotiques en histologie classique pour détecter les cellules ovariennes en dégénérescence, tel que déjà soulevé ailleurs (Davis et Heindel, 1998). On peut supposer qu'il existe des différences dans l'état de progression de la voie de mort cellulaire à travers toutes les cellules en dégénérescence d'une section ovarienne donnée. Le TUNEL présente la limite de ne pouvoir repérer que celles où des fragments d'ADN sont présents, donc celles à un état avancé du processus de mort cellulaire. Il a déjà été observé qu'une séparation temporelle importante pourrait avoir lieu entre les signes nucléaires morphologiques et la fragmentation nucléaire détectable avec cette technique (Collins *et al.*, 1997). Néanmoins, ce type de marquage a permis de confirmer que la MP engendre de la dégradation nucléaire dans les types cellulaires pycnotiques, même s'il ne permet pas de discriminer entre l'apoptose et la nécrose (Stadelmann et Lassmann, 2000; Blagosklonny, 2000).

La voie de mort cellulaire induite par le CPA dans l'ovaire n'a d'ailleurs pas fait l'objet d'investigations approfondies. Dans différents types cellulaires, plusieurs études suggèrent que le CPA induit l'activation de la voie apoptotique en se basant sur l'observation de changements membranaires concordants, de la dégradation nucléaire et de l'activation de caspases (Bullock *et al.*, 1993; Story *et al.*, 1999; Mirkes et Little, 2000; Schwartz et Waxman, 2001; Chen *et al.*, 1994). Par contre, certaines études ont observé un rôle mineur ou secondaire de l'apoptose dans la mort de souches cellulaires induite par des agents de chimiothérapie (Tannock et Lee, 2001), tandis que d'autres rappellent que la nécrose peut aussi être impliquée de façon importante dans ce processus (Karle *et al.*, 2001).

Dans les cellules somatiques ovariennes que le CPA détruit, la caspase 3 activée a été détectée. L'implication de cette importante caspase effectrice concorde donc avec certaines données sur les autres types cellulaires et avec celles concernant la mort des cellules de la granulosa dans le contexte d'atrésie (Tilly *et al.*, 1991; Asselin *et al.*, 2000). En ce qui a trait à l'exécution de la mort des ovocytes, la caspase 3 ne semble pas y être essentielle, qu'elle soit naturelle (Matikainen *et al.*, 2001b) ou induite par les xénobiotiques (Takai *et al.*, 2003). Bien que son activité et sa présence aient été détectées dans les fractions et les cellules de petits

follicules préantraux d'ovaires de rats traités au VCD (Hu *et al.*, 2001b), sa déficience dans un modèle murin ne conférait pas de protection aux follicules primordiaux et ne prévenait que partiellement la mort des follicules primaires causée par cette substance (Takai *et al.*, 2003). Or, cette caspase y a été localisée principalement dans les cellules de la granulosa, du moins chez le rat (Devine *et al.*, 2002). Dans l'étude de Takai *et al.* (2003), les follicules primaires ont été comptés sans égard au stade petit ou grand, comme dans la nôtre. Sans cette classification, il est impossible de spécifier si, en l'absence de cette caspase, la mort des follicules primaires grands (marquant pour la caspase 3) a été prévenue de façon plus importante que les primaires petits (dans lesquels c'est l'ovocyte qui présente des signes de dégénérescence). Ces données nous incitent à poursuivre nos études en maintenant l'attention sur les stades folliculaires spécifiques.

L'utilisation d'un inhibiteur de caspases n'a pas permis de prévenir la mort des follicules détruits par la MP. Ces données tendent à appuyer l'idée que les caspases ne jouent qu'un rôle limité et facultatif dans l'exécution de la mort des follicules préantraux. Cependant, il se peut que l'inhibiteur n'ait pas suffisamment réduit l'activité des caspases dans le tissu cultivé. Malgré tout, la possibilité que les métabolites du CPA induisent des voies de mort cellulaire à la fois dépendantes et indépendantes des caspases a déjà été proposée (Huang et Hales, 2002). Au niveau des follicules ovariens, l'incapacité à observer des signes classiques d'apoptose en microscopie électronique dans les ovocytes de follicules en dégénérescence naturelle chez le rat (Devine *et al.*, 2000) ou induite par le CPA *in vitro* chez l'humain (Raz *et al.*, 2002) a également été rapportée. Le fait que l'inactivation parallèle du proapoptotique *Bax* ou de la caspase 2 ne réussisse pas à prévenir la mort des ovocytes murins provoquée par l'inactivation d'une kinase essentielle dans la réponse à l'endommagement de l'ADN, l'*ataxia telangiectasia-mutated* (ATM), supporte l'idée que plus d'une voie, et potentiellement différents effecteurs, assurent l'élimination des cellules germinales dans l'ovaire (Morita *et al.*, 2001; Tilly, 2001).

Il serait judicieux de considérer l'utilisation d'ovaires néonataux cultivés comme ici pour examiner l'ultrastructure des cellules folliculaires à la suite d'exposition à la MP. En effet, ils contiennent d'abondants follicules primordiaux et primaires dont les cellules pourraient être scrutées pour tenter d'y repérer des signes de nécrose ou d'apoptose. La compréhension de la voie impliquée dans la mort de ces follicules pourrait permettre de la prévenir pour préserver la



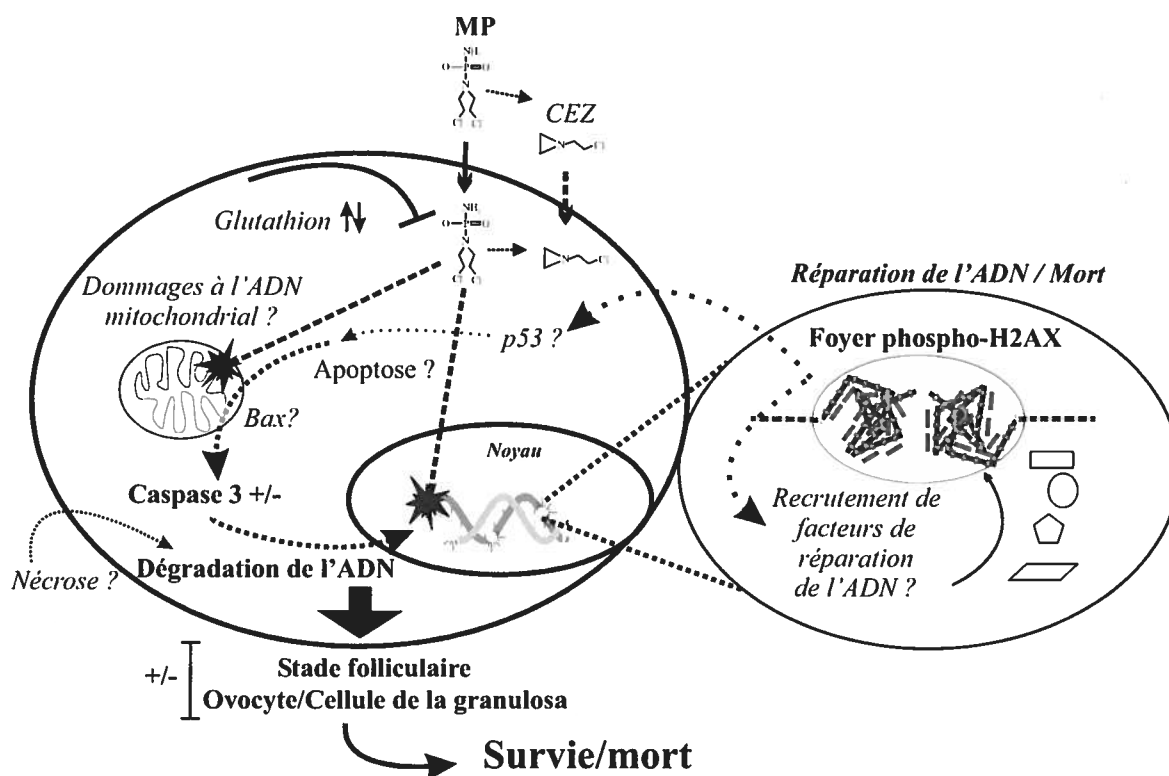
fonction reproductrice de la femme sur une période allongée après des traitements de radiochimiothérapie. Ce système de culture offre également d'autres avantages. Il ouvre la porte à une meilleure manipulation du tissu et des populations de follicules, notamment par l'usage contrôlé d'inhibiteurs spécifiques et d'ARN inhibiteurs. De plus, la culture d'ovaires néonataux est plus simple que celle de pièces corticales d'ovaires adultes et le nombre de follicules primordiaux qui s'y trouvent n'en peut qu'être supérieur et moins variable. L'accès à une grande proportion de follicules primordiaux est avantageux, car la dispersion de ces follicules dans le tissu ovarien adulte est un critère souvent limitant dans les études mécanistes *in vivo*.

Les ovaires néonataux montrent aussi certaines limites. Ils contiennent peu de grands follicules préantraux, à cause de la courte durée de culture employée et de l'absence de gonadotrophines dans le milieu de culture. Cela limite l'évaluation des paramètres sur les follicules primaires grands et les petits secondaires, de par leur faible nombre. Cela coupe aussi les petits follicules de l'influence des plus grands follicules et des *corpus luteum*, qui produisent des facteurs intraovariens et qui sont des voisins à l'intérieur desquels certains processus de détoxification pourraient s'opérer de façon prédominante (Toft *et al.*, 1997). Dans le contexte *in vitro*, l'ovaire se retrouve aussi en dehors des contrôles hormonaux extraovariens. L'impact de cet état sur la réponse des ovaires néonataux au CPA est toutefois difficile à établir, ces ovaires ne contenant pas de follicules dépendants des gonadotrophines au départ de la culture. Celles-ci pourraient toutefois agir en régulant l'activité d'enzymes de détoxification (Bengtsson et Rydstrom, 1983), ou encore la communication entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa (Granot et Dekel, 1998). La rupture de ces liens pourrait affecter le destin du follicule entier, compliquant ainsi l'identification du type cellulaire et folliculaire le plus sensible aux xénobiotiques.

La pénétration des composés dans l'ovaire cultivé s'effectue par l'épithélium de surface et non par le sang, comme c'est le cas *in vivo*. La régulation du flux sanguin à l'ovaire est considérée capable de jouer un rôle dans la modulation de la toxicité ovarienne du CPA (Danforth *et al.*, 2005). L'impact de cette différence sur la dynamique de distribution des composés à l'intérieur du tissu cultivé demeure inconnu, mais puisque les effets de la MP ont été observés jusqu'au centre du tissu cultivé, ceci suggère qu'elle y pénètre adéquatement. De plus,

dans le système *in vitro*, la latence des produits avec une demie-vie plus longue constitue sûrement une différence importante avec le contexte *in vivo*, où la circulation et l'excrétion peuvent limiter l'exposition du tissu ovarien à ces métabolites.

Finalement, il faut rappeler que les conditions pour étudier la toxicité ovarienne du CPA et d'autres composés *in vitro* a été entreprise à travers ces travaux dans le but de permettre de conduire des investigations plus approfondies sur les mécanismes d'ovotoxicité. Il existe présentement beaucoup plus d'interrogations que d'éléments de réponses par rapport à ces mécanismes, tel que schématiquement résumés à la figure 9. Leur compréhension est nécessaire pour pouvoir éventuellement prévenir la destruction des cellules germinales lors de traitements de chimiothérapie ou d'expositions à d'autres contaminants présents dans l'environnement de la femme et créer de nouveaux médicaments sans cet effet secondaire important. Il est également important de comprendre davantage la nature même des dommages causés par cet agent génotoxique dans les ovocytes afin de mieux conseiller les femmes qui souhaiteraient enfanter après des cures de chimiothérapie. En effet, des traitements qui viseraient à prévenir la mort des follicules, soit par l'inhibition de l'apoptose ou par l'administration parallèle d'agonistes de gonadotrophines (Danforth *et al.*, 2005; Meirou *et al.*, 2004), pourraient laisser des cellules germinales au bagage génétique endommagé. La santé des gamètes survivants après ces traitements demeure un souci particulièrement important chez la femme, car les ovocytes peuvent persister très longtemps à l'état dormant dans l'ovaire et accumuler des dommages avant d'être ovulés. Un exemple inquiétant des dommages entraînés par le CPA provient de l'observation qu'une reprogrammation épigénétique aberrante des génomes paternel et maternel semble s'opérer après fertilisation par des spermatozoïdes y ayant été exposés (Barton *et al.*, 2005; Hales *et al.*, 2005). Ainsi, il est important d'établir des conditions qui permettront de mieux évaluer les dommages causés aux gamètes femelles par cet agent et par d'autres.



**Figure 9 :** Schéma d'effets observés et d'interrogations concernant l'action de la MP dans les follicules ovariens.

En contexte *in vitro*, l'exposition d'ovaires à la MP s'est avérée en mesure de causer des dommages aux petits follicules préantraux. Cependant, l'implication d'un de ses produits de dégradation volatile, potentiellement la CEZ, a été soulevée. Quel qu'il soit, l'agent ultimement ovotoxique peut générer des cassures d'ADN dans les ovocytes (Annexe 2), mais les follicules préantraux réagissent différemment face à ces insultes en fonction du stade de développement. Les divergences à cet égard pourraient résider dans la capacité de réparation des dommages à l'ADN, notamment au niveau du recrutement des facteurs de réparation de l'ADN aux sites de phosphorylation d'H2AX. L'altération de l'intégrité de l'ADN mitochondrial et des variations dans le niveau d'agents de détoxification comme le glutathion sont deux autres facteurs proposés pour être investigués. Les ovocytes et les cellules de granulosa atteints par la MP ont montré des signes de dégradation de l'ADN même si la caspase 3 activée n'a pas été détectée dans les ovocytes. Ainsi, la voie de mort cellulaire empruntée dans ces cellules suite à une exposition à la MP pourrait s'écarter du patron classique de l'apoptose. L'évaluation de l'implication de facteurs plus en amont dans la cascade apoptotique, comme *Bax*, ou de ceux faisant le lien entre les dommages à l'ADN et l'apoptose, comme *p53*, serait utile pour clarifier ce point.

## Références

- Aguilar-Mahecha, A., Hales, B. F., et Robaire, B. (2001). Acute cyclophosphamide exposure has germ cell specific effects on the expression of stress response genes during rat spermatogenesis. Mol Reprod Dev 60, 302-11.
- Aguilar-Mahecha, A., Hales, B. F., et Robaire, B. (2002). Chronic cyclophosphamide treatment alters the expression of stress response genes in rat male germ cells. Biol Reprod 66, 1024-32.
- Aguilar-Mahecha, A., Hales, B. F., et Robaire, B. (2005). Effects of acute and chronic cyclophosphamide treatment on meiotic progression and the induction of DNA double-strand breaks in rat spermatocytes. Biol Reprod 72, 1297-304.
- Alarid, E. T., Rubin, J. S., Young, P., Chedid, M., Ron, D., Aaronson, S. A., et Cunha, G. R. (1994). Keratinocyte growth factor functions in epithelial induction during seminal vesicle development. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 1074-8.
- Anasti, J. N. (1998). Premature ovarian failure: an update. Fertil Steril 70, 1-15.
- Anderson, D., Bishop, J. B., Garner, R. C., Ostrosky-Wegman, P., et Selby, P. B. (1995). Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. Mutat Res 330, 115-81.
- Andersson, B. S., Sadeghi, T., Siciliano, M. J., Legerski, R., et Murray, D. (1996). Nucleotide excision repair genes as determinants of cellular sensitivity to cyclophosphamide analogs. Cancer Chemother Pharmacol 38, 406-16.
- Asselin, E., Xiao, C. W., Wang, Y. F., et Tsang, B. K. (2000). Mammalian follicular development and atresia: role of apoptosis. Biol Signals Recept 9, 87-95.
- Ataya, K., Pydyn, E., Young, J., et Struck, R. (1990). The uptake and metabolism of cyclophosphamide by the ovary. Sel Cancer Ther 6, 83-92.
- Ataya, K. M., Valeriote, F. A., et Ramahi-Ataya, A. J. (1989). Effect of cyclophosphamide on the immature rat ovary. Cancer Res 49, 1660-4.
- Augood, C., Duckitt, K., et Templeton, A. A. (1998). Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod 13, 1532-9.
- Bagley, C. M. Jr, Bostick, F. W., et DeVita, V. T. Jr (1973). Clinical pharmacology of cyclophosphamide. Cancer Res 33, 226-33.
- Baird, D. T., Collins, J., Egozcue, J., Evers, L. H., Gianaroli, L., Leridon, H., Sunde, A., Templeton, A., Van Steirteghem, A., Cohen, J., Crosignani, P. G., Devroey, P., Diedrich, K., Fauser, B. C., Fraser, L., Glasier, A., Liebaers, I., Mautone, G., Penney, G., et Tarlatzis, B. (2005). Fertility and ageing. Hum Reprod Update 11, 261-76.

Baker, T. G. (1963). A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. Proc R Soc Lond B Biol Sci 158, 417-33.

Barlow, C., Hirotsune, S., Paylor, R., Liyanage, M., Eckhaus, M., Collins, F., Shiloh, Y., Crawley, J. N., Ried, T., Tagle, D., et Wynshaw-Boris, A. (1996). Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. Cell 86, 159-71.

Barton, T. S., Robaire, B., et Hales, B. F. (2005). Epigenetic programming in the preimplantation rat embryo is disrupted by chronic paternal cyclophosphamide exposure. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 7865-70.

Batista, C. K., Mota, J. M., Souza, M. L., Leitao, B. T., Souza, M. H., Brito, G. A., Cunha, F. Q., et Ribeiro, R. A. (2006). Amifostine and glutathione prevent ifosfamide- and acrolein-induced hemorrhagic cystitis. Cancer Chemother Pharmacol. DOI 10.1007/s00280-006-0248-z

Becedas, L. et Bengtson Ahlberg, M. (1995). Hormonal influences of detoxication in the rat ovary on enzymes in comparison with the liver. Biochem Pharmacol 49, 503-9.

Bengtsson, M., Dong, Y., Mattison, D. R., et Rydstrom, J. (1987). Mechanisms of regulation of rat ovarian 7,12-dimethylbenz[a]anthracene hydroxylase. Chem Biol Interact 63, 15-27.

Bengtsson, M., Reinholt, F. P., et Rydstrom, J. (1992). Cellular localization and hormonal regulation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene mono-oxygenase activity in the rat ovary. Toxicology 71, 203-22.

Bengtsson, M. et Rydstrom, J. (1983). Regulation of carcinogen metabolism in the rat ovary by the estrous cycle and gonadotropin. Science 219, 1437-8.

Bergeron, L., Perez, G. I., Macdonald, G., Shi, L., Sun, Y., Jurisicova, A., Varmuza, S., Latham, K. E., Flaws, J. A., Salter, J. C., Hara, H., Moskowitz, M. A., Li, E., Greenberg, A., Tilly, J. L., et Yuan, J. (1998). Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. Genes Dev 12, 1304-14.

Blagosklonny, M. V. (2000). Cell death beyond apoptosis. Leukemia 14, 1502-8.

Blomgren, H. et Hallstrom, M. (1991). Possible role of acrolein in 4-hydroperoxycyclophosphamide-induced cell damage in vitro. Methods Find Exp Clin Pharmacol 13, 11-4.

Blumenfeld, Z., Avivi, I., Ritter, M., et Rowe, J. M. (1999). Preservation of fertility and ovarian function and minimizing chemotherapy-induced gonadotoxicity in young women. J Soc Gynecol Investig 6, 229-39.

Boring, C. C., Squires, T. S., Tong, T., et Montgomery, S. (1994). Cancer statistics, 1994. CA Cancer J Clin 44, 7-26.

Borman, S. M., Christian, P. J., Sipes, I. G., et Hoyer, P. B. (2000). Ovotoxicity in female Fischer rats and B6 mice induced by low-dose exposure to three polycyclic aromatic hydrocarbons: comparison through calculation of an ovotoxic index. Toxicol Appl Pharmacol 167, 191-8.

Bullock, G., Tang, C., Tourkina, E., Ibrado, A. M., Lutzky, J., Huang, Y., Mahoney, M. E., et Bhalla, K. (1993). Effect of combined treatment with interleukin-3 and interleukin-6 on 4-hydroperoxycyclo-phosphamide-induced programmed cell death or apoptosis in human myeloid leukemia cells. Exp Hematol 21, 1640-7.

Bunting, K. D. et Townsend, A. J. (1996a). De novo expression of transfected human class 1 aldehyde dehydrogenase (ALDH) causes resistance to oxazaphosphorine anti-cancer alkylating agents in hamster V79 cell lines. Elevated class 1 ALDH activity is closely correlated with reduction in DNA interstrand cross-linking and lethality. J Biol Chem 271, 11884-90.

Bunting, K. D. et Townsend, A. J. (1996b). Protection by transfected rat or human class 3 aldehyde dehydrogenase against the cytotoxic effects of oxazaphosphorine alkylating agents in hamster V79 cell lines. Demonstration of aldophosphamide metabolism by the human cytosolic class 3 isozyme. J Biol Chem 271, 11891-6.

Byrne, J. (1999). Infertility and premature menopause in childhood cancer survivors. Med Pediatr Oncol 33, 24-8.

Byrne, J., Fears, T. R., Gail, M. H., Pee, D., Connelly, R. R., Austin, D. F., Holmes, G. F., Holmes, F. F., Latourette, H. B., Meigs, J. W. (1992). Early menopause in long-term survivors of cancer during adolescence. Am J Obstet Gynecol 166, 788-93.

Byrne, J., Mulvihill, J. J., Myers, M. H., Connelly, R. R., Naughton, M. D., Krauss, M. R., Steinhorn, S. C., Hassinger, D. D., Austin, D. F., Bragg, K (1987). Effects of treatment on fertility in long-term survivors of childhood or adolescent cancer. N Engl J Med 317, 1315-21.

Cai, Y., Wu, M. H., Ludeman, S. M., Grdina, D. J., et Dolan, M. E. (1999). Role of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in protecting against cyclophosphamide-induced toxicity and mutagenicity. Cancer Res 59, 3059-63.

Cai, Y., Wu, M. H., Xu-Welliver, M., Pegg, A. E., Ludeman, S. M., et Dolan, M. E. (2000). Effect of O6-benzylguanine on alkylating agent-induced toxicity and mutagenicity. In Chinese hamster ovary cells expressing wild-type and mutant O6-alkylguanine-DNA alkyltransferases. Cancer Res 60, 5464-9.

Cannady, E. A., Dyer, C. A., Christian, P. J., Sipes, I. G., et Hoyer, P. B. (2002). Expression and activity of microsomal epoxide hydrolase in follicles isolated from mouse ovaries. Toxicol Sci 68, 24-31.

Cannady, E. A., Dyer, C. A., Christian, P. J., Sipes, I. G., et Hoyer, P. B. (2003). Expression and activity of cytochromes P450 2E1, 2A, and 2B in the mouse ovary: the effect of 4-vinylcyclohexene and its diepoxide metabolite. Toxicol Sci 73, 423-30.

Carlsson, I. B., Scott, J. E., Visser, J. A., Ritvos, O., Themmen, A. P., et Hovatta, O. (2006). Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. Hum Reprod. May 23

Chang, T. K., Yu, L., Maurel, P., May 23 Waxman, D. J. (1997). Enhanced cyclophosphamide and ifosfamide activation in primary human hepatocyte cultures: response to cytochrome P-450 inducers and autoinduction by oxazaphosphorines. Cancer Res 57, 1946-54.

Chapman, R. M. (1982). Effect of cytotoxic therapy on sexuality and gonadal function. Semin Oncol 9, 84-94.

Chen, B., Cyr, D. G., et Hales, B. F. (1994). Role of apoptosis in mediating phosphoramidate mustard-induced rat embryo malformations in vitro. Teratology 50, 1-12.

Chiarelli, A. M., Marrett, L. D., et Darlington, G. (1999). Early menopause and infertility in females after treatment for childhood cancer diagnosed in 1964-1988 in Ontario, Canada. Am J Epidemiol 150, 245-54.

Collins, J. A., Schandi, C. A., Young, K. K., Vesely, J., et Willingham, M. C. (1997). Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. J Histochem Cytochem 45, 923-34.

Colvin, M., Brundrett, R. B., Kan, M. N., Jardine, I., et Fenselau, C. (1976). Alkylating properties of phosphoramidate mustard. Cancer Res 36, 1121-6.

Cooke, P. S., Young, P. F., et Cunha, G. R. (1987). A new model system for studying androgen-induced growth and morphogenesis in vitro: the bulbourethral gland. Endocrinology 121, 2161-70.

Coucovanis, E. C., Sherwood, S. W., Carswell-Crumpton, C., Spack, E. G., et Jones, P. P. (1993). Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. Exp Cell Res 209, 238-47.

Coulam, C. B., Adamson, S. C., et Annegers, J. F. (1986). Incidence of premature ovarian failure. Obstet Gynecol 67, 604-6.

Damewood, M. D. et Grochow, L. B. (1986). Prospects for fertility after chemotherapy or radiation for neoplastic disease. Fertil Steril 45, 443-59.

Danforth, D. R., Arbogast, L. K., et Friedman, C. I. (2005). Acute depletion of murine primordial follicle reserve by gonadotropin-releasing hormone antagonists. Fertil Steril 83, 1333-8.

Dann, E. J., Epelbaum, R., Avivi, I., Ben Shahar, M., Haim, N., Rowe, J. M., et Blumenfeld, Z. (2005). Fertility and ovarian function are preserved in women treated with an intensified regimen of cyclophosphamide, adriamycin, vincristine and prednisone (Mega-CHOP) for non-Hodgkin lymphoma. Hum Reprod 20, 2247-9.

Davis, B.J. et Heindel, J.J. (1998). Ovarian toxicants: Multiple mechanisms of action. In Reproductive and developmental toxicology pp. 373-395. Korach, K.S. Ed., Dekker, New York .

Davis, B. J., Maronpot, R. R., et Heindel, J. J. (1994). Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. Toxicol Appl Pharmacol 128, 216-23.

De Bruijn, E. A., Geng, Y., Hermans, J., et Driessen, O. (1990). The CMF-regimen. Modulation of cyclophosphamide uptake and clearance by methotrexate and fluorouracil. Int J Cancer 45, 935-9.

De Pol, A., Marzona, L., Vaccina, F., Negro, R., Sena, P., et Forabosco, A. (1998). Apoptosis in different stages of human oogenesis. Anticancer Res 18, 3457-61.

De Pol, A., Vaccina, F., Forabosco, A., Cavazzuti, E., et Marzona, L. (1997). Apoptosis of germ cells during human prenatal oogenesis. Hum Reprod 12, 2235-41.

Depalo, R., Nappi, L., Loverro, G., Bettocchi, S., Caruso, M. L., Valentini, A. M., et Selvaggi, L. (2003). Evidence of apoptosis in human primordial and primary follicles. Hum Reprod 18, 2678-82.

Desmeules, P. et Devine, P. J. (2006). Characterizing the ovotoxicity of cyclophosphamide metabolites on cultured mouse ovaries. Toxicol Sci 90, 500-9.

Devine, P.J. et Hoyer, P.B. (2004). Ovotoxic Environmental Chemicals: Indirect Endocrine Disruptors. In Endocrine Disruptors: Effects on Male and Female Reproductive Systems pp. 67-101. Taylor & Francis.

Devine, P. J., Payne, C. M., McCuskey, M. K., et Hoyer, P. B. (2000). Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. Biol Reprod 63, 1245-52.

Devine, P. J., Sipes, I. G., Skinner, M. K., et Hoyer, P. B. (2002). Characterization of a rat in vitro ovarian culture system to study the ovarian toxicant 4-vinylcyclohexene diepoxide. Toxicol Appl Pharmacol 184, 107-15.

Diawara, M. M., Chavez, K. J., Hoyer, P. B., Williams, D. E., Dorsch, J., Kulkosky, P., et Franklin, M. R. (1999). A novel group of ovarian toxicants: the psoralens. J Biochem Mol Toxicol 13, 195-203.

Ding, H. F. et Fisher, D. E. (1998). Mechanisms of p53-mediated apoptosis. Crit Rev Oncog 9, 83-98.

Dobson, R. L. et Felton, J. S. (1983). Female germ cell loss from radiation and chemical exposures. Am J Ind Med 4, 175-90.

Doerr, J. K., Hollis, E. A., et Sipes, I. G. (1996). Species difference in the ovarian toxicity of 1,3-butadiene epoxides in B6C3F1 mice and Sprague-Dawley rats. Toxicology 113, 128-36.

Dooley, J. S., James, C. A., Rogers, H. J., et Stuart-Harris, R. (1982). Biliary elimination of cyclophosphamide in man. Cancer Chemother Pharmacol 9, 26-9.



Durlinger, A. L., Gruijters, M. J., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H. A., Nachtigal, M. W., Uilenbroek, J. T., Grootegoed, J. A., et Themmen, A. P. (2002). Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. Endocrinology 143, 1076-84.

Eliasson, M., Stark, T., et DePierre, J. W. (1999). Expression of glutathione transferase isoenzymes in the porcine ovary in relationship to follicular maturation and luteinization. Chemico-biological interactions 38-45.

Ellenbergen, J. (1977). Mutagenic activity of major mammalian metabolites of cyclophosphamide toward several genes of *Escherichia coli*. J Toxicol Environ Health 3, 637-50.

Engle, T. W., Zon, G., et Egan, W. (1982). <sup>31</sup>P NMR kinetic studies of the intra- and intermolecular alkylation chemistry of phosphoramidate mustard and cognate N-phosphorylated derivatives of N,N-bis(2-chloroethyl)amine. J Med Chem 25, 1347-57.

Exley, G. E., Tang, C., McElhinny, A. S., et Warner, C. M. (1999). Expression of caspase and BCL-2 apoptotic family members in mouse preimplantation embryos. Biol Reprod 61, 231-9.

Faddy, M. J. et Gosden, R. G. (1995). A mathematical model of follicle dynamics in the human ovary. Hum Reprod 10, 770-5.

Faddy, M. J. et Gosden, R. G. (1996). A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women. Hum Reprod 11, 1484-6.

Faddy, M. J., Gosden, R. G., Gougeon, A., Richardson, S. J., et Nelson, J. F. (1992). Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. Hum Reprod 7, 1342-6.

Faddy, M. J., Telfer, E., et Gosden, R. G. (1987). The kinetics of pre-antral follicle development in ovaries of CBA/Ca mice during the first 14 weeks of life. Cell Tissue Kinet 20, 551-60.

Fainstat, T. (1968). Organ culture of postnatal rat ovaries in chemically defined medium. Fertil Steril 19, 317-38.

Falcone, T., Attaran, M., Bedaiwy, M. A., et Goldberg, J. M. (2004). Ovarian function preservation in the cancer patient. Fertil Steril 81, 243-57.

Familiari, G., Caggiati, A., Nottola, S. A., Ermini, M., Di Benedetto, M. R., et Motta, P. M. (1993). Ultrastructure of human ovarian primordial follicles after combination chemotherapy for Hodgkin's disease. Hum Reprod 8, 2080-7.

Fenichel, P. (2005). Medical preservation of ovarian function before and during radiochemotherapy. Gynecol Obstet Fertil 33, 610-4.

Fenwick, M. A. et Hurst, P. R. (2002). Immunohistochemical localization of active caspase-3 in the mouse ovary: growth and atresia of small follicles. Reproduction 124, 659-65.

Flaws, J. A., Hirshfield, A. N., Hewitt, J. A., Babus, J. K., et Furth, P. A. (2001a). Effect of bcl-2 on the primordial follicle endowment in the mouse ovary. Biol Reprod 64, 1153-9.

Flaws, J. A., Langenberg, P., Babus, J. K., Hirshfield, A. N., et Sharara, F. I. (2001b). Ovarian volume and antral follicle counts as indicators of menopausal status. Menopause 8, 175-80.

Flaws, J. A., Rhodes, J. C., Langenberg, P., Hirshfield, A. N., Kjerulff, K., et Sharara, F. I. (2000). Ovarian volume and menopausal status. Menopause 7, 53-61.

Flaws, J. A., Salyers, K. L., Sipes, I. G., et Hoyer, P. B. (1994). Reduced ability of rat preantral ovarian follicles to metabolize 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide in vitro. Toxicol Appl Pharmacol 126, 286-94.

Fleming, R. A. (1997). An overview of cyclophosphamide and ifosfamide pharmacology. Pharmacotherapy 17, 146S-154S.

Fortune, J. E. (2002). Activation of primordial follicles. Ernst Schering Res Found Workshop 11-21.

Franczak, A., Nynca, A., Valdez, K. E., Mizinga, K. M., et Petroff, B. K. (2006). Effects of acute and chronic exposure to the aryl hydrocarbon receptor agonist 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the transition to reproductive senescence in female Sprague-Dawley rats. Biol Reprod 74, 125-30.

Friedlander, M. et Thewes, B. (2003). Counting the costs of treatment: the reproductive and gynaecological consequences of adjuvant therapy in young women with breast cancer. Intern Med J 33, 372-9.

Fritz, G., Hengstler, J. G., et Kaina, B. (1997). High-dose selection with mafosfamide results in sensitivity to DNA cross-linking agents: characterization of hypersensitive cell lines. Cancer Res 57, 454-60.

Fulton, N., Martins da Silva, S. J., Bayne, R. A., et Anderson, R. A. (2005). Germ cell proliferation and apoptosis in the developing human ovary. J Clin Endocrinol Metab. May

Gamcsik, M. P., Dolan, M. E., Andersson, B. S., et Murray, D. (1999). Mechanisms of resistance to the toxicity of cyclophosphamide. Curr Pharm Des 5, 587-605.

Ganz, P. A. et Greendale, G. A. (2001). Menopause and breast cancer: addressing the secondary health effects of adjuvant chemotherapy. J Clin Oncol 19, 3303-5.

Ghilarducci, D. P. et Tjeerdema, R. S. (1995). Fate and effects of acrolein. Rev Environ Contam Toxicol 144, 95-146.

Gosden, R. G. (2004). Germline stem cells in the postnatal ovary: is the ovary more like a testis? Hum Reprod Update 10, 193-5.

Gosden, R. G., Laing, S. C., Felicio, L. S., Nelson, J. F., et Finch, C. E. (1983). Imminent oocyte exhaustion and reduced follicular recruitment mark the transition to acyclicity in aging C57BL/6J mice. Biol Reprod 28, 255-60.

Gougeon, A. (1998). Ovarian follicular growth in humans: ovarian ageing and population of growing follicles. Maturitas 30, 137-42.

Gougeon, A. (2005). Neo-oogenesis in the postnatal ovary: fantasy or reality?. Gynecol Obstet Fertil 33, 819-23.

Gougeon, A., Ecochard, R., et Thalabard, J. C. (1994). Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. Biol Reprod 50, 653-63.

Gow, S. M., Turner, E. I., et Glasier, A. (1994). The clinical biochemistry of the menopause and hormone replacement therapy . Ann Clin Biochem 31 ( Pt 6), 509-28.

Granot, I. et Dekel, N. ( 1998). Cell-to-cell communication in the ovarian follicle: developmental and hormonal regulation of the expression of connexin43. Hum Reprod 13 Suppl 4, 85-97.

Greenfeld, C. et Flaws, J. A. (2004). Renewed debate over postnatal oogenesis in the mammalian ovary. Bioessays 26, 829-32.

Grizzle, T. B., George, J. D., Fail, P. A., Seely, J. C., et Heindel, J. J. (1994). Reproductive effects of 4-vinylcyclohexene in Swiss mice assessed by a continuous breeding protocol. Fundam Appl Toxicol 22, 122-9.

Gulyas, B. J. et Mattison, D. R. (1979). Degeneration of mouse oocytes in response to polycyclic aromatic hydrocarbons. Anat Rec 193, 863-82.

Hales, B. F., Barton, T. S., et Robaire, B. (2005). Impact of paternal exposure to chemotherapy on offspring in the rat. J Natl Cancer Inst Monogr 28-31.

Hartley, P. S., Bayne, R. A., Robinson, L. L., Fulton, N., et Anderson, R. A. (2002). Developmental changes in expression of myeloid cell leukemia-1 in human germ cells during oogenesis and early folliculogenesis. J Clin Endocrinol Metab 87, 3417-27.

Hensley, M. L. et Reichman, B. S. (1998). Fertility and pregnancy after adjuvant chemotherapy for breast cancer. Crit Rev Oncol Hematol 28, 121-8.

Himmelstein-Braw, R., Peters, H., et Faber, M. (1978). Morphological study of the ovaries of leukaemic children. Br J Cancer 38, 82-7.

Hirshfield, A. N. (1989). Granulosa cell proliferation in very small follicles of cycling rats studied by long-term continuous tritiated-thymidine infusion. Biol Reprod 41, 309-16.

Hirshfield, A. N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. Int Rev Cytol 124, 43-101.

Hirshfield, A. N. (1994). Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. Biol Reprod 50, 421-8.

Hirshfield, A. N. (1997). Overview of ovarian follicular development: considerations for the toxicologist. Environ Mol Mutagen 29, 10-5.

Horning, S. J., Hoppe, R. T., Kaplan, H. S., et Rosenberg, S. A. (1981). Female reproductive potential after treatment for Hodgkin's disease. N Engl J Med 304, 1377-82.

Rajapaksa K. S., Sipes I. G. et Hoyer P. B., 2007. Involvement of Microsomal Epoxide Hydrolase (mEH) Enzyme in Ovotoxicity Caused by 7, 12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA): ROLE OF MEH IN OVOTOXICITY CAUSED BY DMBA. Toxicol Sci, sortie avant impression.

Hoyer, P. B. (2005). Damage to ovarian development and function. Cell Tissue Res 322, 99-106.

Hoyer, P. B. et Sipes, I. G. (1996). Assessment of follicle destruction in chemical-induced ovarian toxicity. Annu Rev Pharmacol Toxicol 36, 307-31.

Hsu, S. Y., Lai, R. J., Finegold, M., et Hsueh, A. J. (1996). Targeted overexpression of Bcl-2 in ovaries of transgenic mice leads to decreased follicle apoptosis, enhanced folliculogenesis, and increased germ cell tumorigenesis. Endocrinology 137, 4837-43.

Hu, X., Christian, P., Sipes, I. G., et Hoyer, P. B. (2001a). Expression and redistribution of cellular Bad, Bax, and Bcl-X(L) protein is associated with VCD-induced ovotoxicity in rats. Biol Reprod 65, 1489-95.

Hu, X., Christian, P. J., Thompson, K. E., Sipes, I. G., et Hoyer, P. B. (2001b). Apoptosis induced in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide is associated with activation of the caspase cascades. Biol Reprod 65, 87-93.

Huang, C. et Hales, B. F. (2002). Role of caspases in murine limb bud cell death induced by 4-hydroperoxycyclophosphamide, an activated analog of cyclophosphamide. Teratology 66, 288-99.

Huang, X., Kurose, A., Tanaka, T., Traganos, F., Dai, W., et Darzynkiewicz, Z. (2006). Sequential phosphorylation of Ser-10 on histone H3 and ser-139 on histone H2AX and ATM activation during premature chromosome condensation: relationship to cell-cycle phase and apoptosis. Cytometry A 69, 222-9.

Inoue, S., Watanabe, H., Saito, H., Hiroi, M., et Tonosaki, A. (2000). Elimination of atretic follicles from the mouse ovary: a TEM and immunohistochemical study in mice. J Anat 196 ( Pt 1), 103-10.

Jansen, R. P. et de Boer, K. (1998). The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. Mol Cell Endocrinol 145, 81-8.

Jarrell, J., Lai, E. V., Barr, R., McMahon, A., Belbeck, L., et O'Connell, G. (1987). Ovarian toxicity of cyclophosphamide alone and in combination with ovarian irradiation in the rat. Cancer Res 47, 2340-3.

Jarrell, J., YoungLai, E. V., Barr, R., O'Connell, G., Belbeck, L., et McMahon, A. (1986). An analysis of the effects of increasing doses of ionizing radiation to the exteriorized rat ovary on follicular development, atresia, and serum gonadotropin levels. Am J Obstet Gynecol 154, 306-9.

Jarrell, J. F., Bodo, L., YoungLai, E. V., Barr, R. D., et O'Connell, G. J. (1991). The short-term reproductive toxicity of cyclophosphamide in the female rat. Reprod Toxicol 5, 481-5.

Johnson, J., Bagley, J., Skaznik-Wikiel, M., Lee, H. J., Adams, G. B., Niikura, Y., Tschudy, K. S., Tilly, J. C., Cortes, M. L., Forkert, R., Spitzer, T., Iacomini, J., Scadden, D. T., et Tilly, J. L. (2005). Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. Cell 122, 303-15.

Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K., et Tilly, J. L. (2004). Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. Nature 428, 145-50.

Kao, S. W., Sipes, I. G., et Hoyer, P. B. (1999). Early effects of ovotoxicity induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide in rats and mice. Reprod Toxicol 13, 67-75 .

Karle, P., Renner, M., Salmons, B., et Gunzburg, W. H. (2001). Necrotic, rather than apoptotic, cell death caused by cytochrome P450-activated ifosfamide. Cancer Gene Ther 8, 220-30.

Keren-Tal, I., Suh, B. S., Dantes, A., Lindner, S., Oren, M., et Amsterdam, A. (1995). Involvement of p53 expression in cAMP-mediated apoptosis in immortalized granulosa cells. Exp Cell Res 218, 283-95.

Kezele, P. et Skinner, M. K. (2003). Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. Endocrinology 144, 3329-37.

Kim, Y., Jung, K., Hwang, T., Jung, G., Kim, H., Park, J., Kim, J., Park, J., Park, D., Park, S., Choi, K., et Moon, Y. (1996). Hematopoietic and reproductive hazards of Korean electronic workers exposed to solvents containing 2-bromopropane. Scand J Work Environ Health 22, 387-91.

Knudson, C. M., Tung, K. S., Tourtellotte, W. G., Brown, G. A., et Korsmeyer, S. J. (1995). Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. Science 270, 96-9.

Koh, J. M., Kim, C. H., Hong, S. K., Lee, K. U., Kim, Y. T., Kim, O. J., and Kim, G. S. (1998). Primary ovarian failure caused by a solvent containing 2-bromopropane. Eur J Endocrinol 138, 554-6.

Kok, H. S., van Asselt, K. M., van der Schouw, Y. T., Peeters, P. H., et Wijmenga, C. (2005). Genetic studies to identify genes underlying menopausal age. Hum Reprod Update 11, 483-93.

- Krakauer, D. C. et Mira, A. (1999). Mitochondria and germ-cell death. Nature 400, 125-6.
- Kritz-Silverstein, D. et Barrett-Connor, E. (1993). Bone mineral density in postmenopausal women as determined by prior oral contraceptive use. Am J Public Health 83, 100-2.
- Ledent, C., Demeestere, I., Blum, D., Petermans, J., Hamalainen, T., Smits, G., et Vassart, G. (2005). Premature ovarian aging in mice deficient for Gpr3. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 8922-6.
- Lee, C. J. et Yoon, Y. D. (2005). Gamma-radiation-induced follicular degeneration in the prepubertal mouse ovary. Mutat Res 578, 247-55.
- Letur, H., Martin-Pont, B., et Fenichel, P. (2004). Spontaneous pregnancies and premature menopause. Gynecol Obstet Fertil 32, 748-55.
- Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W. T., et Wang, X. (1998). The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 8461-6.
- Lopez, S. G. et Luderer, U. (2004). Effects of cyclophosphamide and buthionine sulfoximine on ovarian glutathione and apoptosis. Free Radic Biol Med 36, 1366-77.
- Lovekamp-Swan, T. et Davis, B. J. (2003). Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. Environ Health Perspect 111, 139-45.
- Lu, H. et Chan, K. K. (2006). Pharmacokinetics of N-2-chloroethylaziridine, a volatile cytotoxic metabolite of cyclophosphamide, in the rat. Cancer Chemother Pharmacol Feb. 1-8.
- Ludeman, S. M. (1999). The chemistry of the metabolites of cyclophosphamide. Curr Pharm Des 5, 627-43.
- MacKenzie, K. M. et Angevine, D. M. (1981). Infertility in mice exposed in utero to benzo(a)pyrene. Biol Reprod 24, 183-91.
- Mackie, E. J., Radford, M., et Shalet, S. M. (1996). Gonadal function following chemotherapy for childhood Hodgkin's disease. Med Pediatr Oncol 27, 74-8.
- Magelssen, H., Brydoy, M., et Fossa, S. D. (2006). The effects of cancer and cancer treatments on male reproductive function. Nat Clin Pract Urol 3, 312-322.
- Manger, K., Wildt, L., Kalden, J. R., et Manger, B. (2006). Prevention of gonadal toxicity and preservation of gonadal function and fertility in young women with systemic lupus erythematosus treated by cyclophosphamide: The PREGO-Study. Autoimmun Rev 5, 269-272.
- Maravei, D. V., Trbovich, A. M., Perez, G. I., Tilly, K. I., Banach, D., Talanian, R. V., Wong, W. W., et Tilly, J. L. (1997). Cleavage of cytoskeletal proteins by caspases during ovarian cell death: evidence that cell-free systems do not always mimic apoptotic events in intact cells. Cell Death Differ 4, 707-12.

Marcello, M. F., Nuciforo, G., Romeo, R., Di Dino, G., Russo, I., Russo, A., Palumbo, G., et Schiliro, G. (1990). Structural and ultrastructural study of the ovary in childhood leukemia after successful treatment. Cancer 66, 2099-104.

Matikainen, T., Perez, G. I., Jurisicova, A., Pru, J. K., Schlezinger, J. J., Ryu, H. Y., Laine, J., Sakai, T., Korsmeyer, S. J., Casper, R. F., Sherr, D. H., et Tilly, J. L. (2001a). Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. Nat Genet 28, 355-60.

Matikainen, T., Perez, G. I., Zheng, T. S., Kluzak, T. R., Rueda, B. R., Flavell, R. A., et Tilly, J. L. (2001b). Caspase-3 gene knockout defines cell lineage specificity for programmed cell death signaling in the ovary. Endocrinology 142, 2468-80.

Matikainen, T. M., Moriyama, T., Morita, Y., Perez, G. I., Korsmeyer, S. J., Sherr, D. H., et Tilly, J. L. (2002). Ligand activation of the aromatic hydrocarbon receptor transcription factor drives Bax-dependent apoptosis in developing fetal ovarian germ cells. Endocrinology 143, 615-20.

Mattison, D. R. (1979). Difference in sensitivity of rat and mouse primordial oocytes to destruction by polycyclic aromatic hydrocarbons. Chem Biol Interact 28, 133-7.

Mattison, D. R., Shiromizu, K., et Nightingale, M. S. (1983a). Oocyte destruction by polycyclic aromatic hydrocarbons. Am J Ind Med 4, 191-202.

Mattison, D. R., Shiromizu, K., Pendergrass, J. A., et Thorgeirsson, S. S. (1983b). Ontogeny of ovarian glutathione and sensitivity to primordial oocyte destruction by cyclophosphamide. Pediatr Pharmacol (New York) 3, 49-55.

Mattison, D. R. et Thorgeirsson, S. S. (1979). Ovarian aryl hydrocarbon hydroxylase activity and primordial oocyte toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in mice. Cancer Res 39, 3471-5.

Mattison, D. R., West, D. M., et Menard, R. H. (1979). Differences in benzo(a)pyrene metabolic profile in rat and mouse ovary. Biochem Pharmacol 28, 2101-4.

Mayer, L. P., Pearsall, N. A., Christian, P. J., Devine, P. J., Payne, C. M., McCuskey, M. K., Marion, S. L., Sipes, I. G., et Hoyer, P. B. (2002). Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. Reprod Toxicol 16, 775-81.

McKinlay, S. M. (1996). The normal menopause transition: an overview. Maturitas 23, 137-45.

McVie, J. G. (1999). Cancer treatment: the last 25 years. Cancer Treat Rev 25, 323-31.

Meirow, D. (1999). Ovarian injury and modern options to preserve fertility in female cancer patients treated with high dose radio-chemotherapy for hemato-oncological neoplasias and other cancers. Leuk Lymphoma 33, 65-76.

Meirow, D. (2000). Reproduction post-chemotherapy in young cancer patients. Mol Cell Endocrinol 169, 123-31.

Meirow, D., Assad, G., Dor, J., et Rabinovici, J. (2004). The GnRH antagonist cetrorelix reduces cyclophosphamide-induced ovarian follicular destruction in mice. Hum Reprod 19, 1294-9.

Meirow, D., Lewis, H., Nugent, D., et Epstein, M. (1999). Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool. Hum Reprod 14, 1903-7.

Meirow, D. et Nugent, D. (2001). The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. Hum Reprod Update 7, 535-43.

Meredith, S., Dudenhoefter, G., et Jackson, K. (2000). Classification of small type B/C follicles as primordial follicles in mature rats. J Reprod Fertil 119, 43-8 .

Mirkes, P. E. et Little, S. A. (2000). Cytochrome c release from mitochondria of early postimplantation murine embryos exposed to 4-hydroperoxycyclophosphamide, heat shock, and staurosporine. Toxicol Appl Pharmacol 162, 197-206.

Misiura, K. (2006). Ifosfamide. Metabolic studies, new therapeutic approaches and new analogs. Mini Rev Med Chem 6, 395-400.

Momerency, G., Van Cauwenberghe, K., Slee, P. H., Van Oosterom, A. T., et De Bruijn, E. A. (1994). The determination of cyclophosphamide and its metabolites in blood plasma as stable trifluoroacetyl derivatives by electron capture chemical ionization gas chromatography/mass spectrometry. Biol Mass Spectrom 23, 149-58.

Montano, M. M., Welshons, W. V., et vom Saal, F. S. (1995). Free estradiol in serum and brain uptake of estradiol during fetal and neonatal sexual differentiation in female rats. Biol Reprod 53, 1198-207.

Moore, H. C. (2000). Fertility and the impact of systemic therapy on hormonal status following treatment for breast cancer. Curr Oncol Rep 2, 587-93.

Moore, M. J. (1991). Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. Clin Pharmacokinet 20, 194-208.

Morita, Y., Maravei, D. V., Bergeron, L., Wang, S., Perez, G. I., Tsutsumi, O., Taketani, Y., Asano, M., Horai, R., Korsmeyer, S. J., Iwakura, Y., Yuan, J., et Tilly, J. L. (2001). Caspase-2 deficiency prevents programmed germ cell death resulting from cytokine insufficiency but not meiotic defects caused by loss of ataxia telangiectasia-mutated (Atm) gene function. Cell Death Differ 8, 614-20.

Morita, Y., Perez, G. I., Maravei, D. V., Tilly, K. I., et Tilly, J. L. (1999). Targeted expression of Bcl-2 in mouse oocytes inhibits ovarian follicle atresia and prevents spontaneous and chemotherapy-induced oocyte apoptosis in vitro. Mol Endocrinol 13, 841-50.



Morita, Y., Perez, G. I., Paris, F., Miranda, S. R., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., Xie, Z., Reed, J. C., Schuchman, E. H., Kolesnick, R. N., et Tilly, J. L. (2000). Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. Nat Med 6, 1109-14.

Morita, Y. et Tilly, J. L. (1999). Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. Dev Biol 213, 1-17.

Morrison, L. J. et Marcinkiewicz, J. L. (2002). Tumor necrosis factor alpha enhances oocyte/follicle apoptosis in the neonatal rat ovary. Biol Reprod 66, 450-7.

Mukherjee, B., Kessinger, C., Kobayashi, J., Chen, B. P., Chen, D. J., Chatterjee, A., et Burma, S. (2006). DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. DNA Repair (Amst) 5, 575-90.

Niedernhofer, L. J., Odijk, H., Budzowska, M., van Drunen, E., Maas, A., Theil, A. F., de Wit, J., Jaspers, N. G., Beverloo, H. B., Hoeijmakers, J. H., et Kanaar, R. (2004). The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. Mol Cell Biol 24, 5776-87.

Nilsson, E., Parrott, J. A., et Skinner, M. K. (2001). Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. Mol Cell Endocrinol 175, 123-30.

Nygaard, R., Clausen, N., Siimes, M. A., Marky, I., Skjeldestad, F. E., Kristinsson, J. R., Vuoristo, A., Wegelius, R., et Moe, P. J. (1991). Reproduction following treatment for childhood leukemia: a population-based prospective cohort study of fertility and offspring. Med Pediatr Oncol 19, 459-66.

O'Brien, M. J., Pendola, J. K., et Eppig, J. J. (2003). A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. Biol Repro 68, 1682-6.

Ortin, T. T., Shostak, C. A., et Donaldson, S. S. (1990). Gonadal status and reproductive function following treatment for Hodgkin's disease in childhood: the Stanford experience. Int J Radiat Oncol Biol Phys 19, 873-80.

Osei-Hyiaman, D., Satoshi, T., Ueji, M., Hideto, T., et Kano, K. (1998). Timing of menopause, reproductive years, and bone mineral density: a cross-sectional study of postmenopausal Japanese women. Am J Epidemiol 148, 1055-61.

Osman, P. (1985). Rate and course of atresia during follicular development in the adult cyclic rat. J Reprod Fertil 73, 261-70.

Paganini-Hill, A. et Henderson, V. W. (1994). Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. Am J Epidemiol 140, 256-61.

Parrott, J. A. et Skinner, M. K. (1999). Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. Endocrinology 140, 4262-71.

- Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M., et Bonner, W. M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. Curr Biol 10, 886-95.
- Pedersen, T. (1970). Determination of follicle growth rate in the ovary of the immature mouse. J Reprod Fertil 21, 81-93.
- Pendse, S., Ginsburg, E., et Singh, A. K. (2004). Strategies for preservation of ovarian and testicular function after immunosuppression. Am J Kidney Dis 43, 772-81.
- Pepling, M. E. et Spradling, A. C. (2001). Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. Dev Biol 234, 339-51.
- Perez, G. I., Knudson, C. M., Leykin, L., Korsmeyer, S. J., et Tilly, J. L. (1997). Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. Nat Med 3, 1228-32.
- Perez, G. I., Maravei, D. V., Trbovich, A. M., Cidlowski, J. A., Tilly, J. L., et Hughes, F. M. Jr (2000). Identification of potassium-dependent and -independent components of the apoptotic machinery in mouse ovarian germ cells and granulosa cells. Biol Reprod 63, 1358-69.
- Perez, G. I., Robles, R., Knudson, C. M., Flaws, J. A., Korsmeyer, S. J., et Tilly, J. L. (1999a). Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. Nat Genet 21, 200-3.
- Perez, G. I., Tao, X. J., et Tilly, J. L. (1999b). Fragmentation and death (a.k.a. apoptosis) of ovulated oocytes. Mol Hum Reprod 5, 414-20.
- Perez, G. I., Trbovich, A. M., Gosden, R. G., et Tilly, J. L. (2000). Mitochondria and the death of oocytes. Nature 403, 500-1.
- Peters, H. (1969). The development of the mouse ovary from birth to maturity. Acta Endocrinol (Copenh) 62, 98-116.
- Plowchalk, D. R. et Mattison, D. R. (1991). Phosphoramidate mustard is responsible for the ovarian toxicity of cyclophosphamide. Toxicol Appl Pharmacol 107, 472-81.
- Plowchalk, D. R. et Mattison, D. R. (1992). Reproductive toxicity of cyclophosphamide in the C57BL/6N mouse: 1. Effects on ovarian structure and function. Reprod Toxicol 6, 411-21.
- Quenby, S. M., Gazvani, M. R., Brazeau, C., Neilson, J., Lewis-Jones, D. I., et Vince, G. (1999). Oncogenes and tumour suppressor genes in first trimester human fetal gonadal development. Mol Hum Reprod 5, 737-41.
- Ramahi-Ataya, A. J., Ataya, K. M., Subramanian, M. G., et Struck, R. F. (1988). The effect of "activated" cyclophosphamide on rat granulosa cells in vitro. Reprod Toxicol 2, 99-103.

Ratts, V. S., Flaws, J. A., Kolp, R., Sorenson, C. M., et Tilly, J. L. (1995). Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. Endocrinology 136, 3665-8.

Raz, A., Fisch, B., Okon, E., Feldberg, D., Nitke, S., Raanani, H., et Abir, R. (2002). Possible direct cytotoxicity effects of cyclophosphamide on cultured human follicles: an electron microscopy study. J Assist Reprod Genet 19, 500-6.

Rehman, H. U. et Masson, E. A. (2005). Neuroendocrinology of female aging. Gend Med 2, 41-56.

Rekha, G. K. et Sladek, N. E. (1997). Inhibition of human class 3 aldehyde dehydrogenase, and sensitization of tumor cells that express significant amounts of this enzyme to oxazaphosphorines, by the naturally occurring compound gossypol. Adv Exp Med Biol 414, 133-46.

Ren, S., Kalhorn, T. F., et Slattery, J. T. (1999). Inhibition of human aldehyde dehydrogenase 1 by the 4-hydroxycyclophosphamide degradation product acrolein. Drug Metab Dispos 27, 133-7.

Reynaud, K. et Driancourt, M. A. (2000). Oocyte attrition. Mol Cell Endocrinol 163, 101-8.

Richardson, S. J., Senikas, V., et Nelson, J. F. (1987). Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. J Clin Endocrinol Metab 65, 1231-7.

Riedl, S. J. et Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol 5, 897-907.

Robles, R., Tao, X. J., Trbovich, A. M., Maravel, D. V., Nahum, R., Perez, G. I., Tilly, K. I., et Tilly, J. L. (1999). Localization, regulation and possible consequences of apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1) expression in granulosa cells of the mouse ovary. Endocrinology 140, 2641-4.

Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., et Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. J Biol Chem 273, 5858-68.

Rucker, E. B. 3rd, Dierisseau, P., Wagner, K. U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A., Flaws, J. A., et Hennighausen, L. (2000). Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis. Mol Endocrinol 14, 1038-52.

Russell, L. B., Stelzner, K. F., et Russell, W. L. (1959). Influence of dose rate on radiation effect on fertility of female mice. Proc Soc Exp Biol Med 102, 471-9.

Sakahira, H., Enari, M., et Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. Nature 391, 96-9.

Sanders, J. E., Hawley, J., Levy, W., Gooley, T., Buckner, C. D., Deeg, H. J., Doney, K., Storb, R., Sullivan, K., Witherspoon, R., et Appelbaum, F. R. (1996). Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulfan or total-body irradiation and bone marrow transplantation. Blood 87, 3045-52.

Scherrer, B. (1984). Biostatistique. Montréal. Gaëtan Morin Éd.

Schrader, M., Heicappell, R., Muller, M., Straub, B., et Miller, K. (2001). Impact of chemotherapy on male fertility. Onkologie 24, 326-30.

Schwartz, P. S. et Waxman, D. J. (2001). Cyclophosphamide induces caspase 9-dependent apoptosis in 9L tumor cells. Mol Pharmacol 60, 1268-79.

Shalet, S. M. (1980). Effects of cancer chemotherapy on gonadal function of patients. Cancer Treat Rev 7, 141-52.

Shapiro, C. L., Manola, J., et Leboff, M. (2001). Ovarian failure after adjuvant chemotherapy is associated with rapid bone loss in women with early-stage breast cancer. J Clin Oncol 19, 3306-11.

Shiromizu, K. et Mattison, D. R. (1984). The effect of intraovarian injection of benzo(a)pyrene on primordial oocyte number and ovarian aryl hydrocarbon. Toxicol Appl Pharmacol 76, 18-25.

Simbre, V. C., Duffy, S. A., Dadlani, G. H., Miller, T. L., et Lipshultz, S. E. (2005). Cardiotoxicity of cancer chemotherapy: implications for children. Paediatr Drugs 7, 187-202.

Singh, D. et Pandey, R. S. (1996). Glutathione-S-transferase in rat ovary: its changes during estrous cycle and increase in its activity by estradiol-17 beta. Indian J Exp Biol 34, 1158-60.

Singh, K. L., Davies, M., et Chatterjee R. (2005). Fertility in cancer survivors: pathophysiology, preservation and the role of ovarian testing. Human reproduction update 11, 69-89.

Skinner, M. K. (2005). Regulation of primordial follicle assembly and development. Hum Reprod Update 11, 461-71.

Smith, B. J., Mattison, D. R., et Sipes, I. G. (1990). The role of epoxidation in 4-vinylcyclohexene-induced ovarian toxicity. Toxicol Appl Pharmacol 105, 372-81.

Sonmezer, M. et Oktay, K. (2006). Fertility preservation in young women undergoing breast cancer therapy. Oncologist 11, 422-34.

Springer, L. N., McAsey, M. E., Flaws, J. A., Tilly, J. L., Sipes, I. G., et Hoyer, P. B. (1996a). Involvement of apoptosis in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in rats. Toxicol Appl Pharmacol 139, 394-401.

Springer, L. N., Tilly, J. L., Sipes, I. G., et Hoyer, P. B. (1996b). Enhanced expression of bax in small preantral follicles during 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in the rat. Toxicol Appl Pharmacol 139, 402-10.

Stadelmann, C. et Lassmann, H. (2000). Detection of apoptosis in tissue sections. Cell Tissue Res 301, 19-31.

Story, M. D., Mirkovic, N., Hunter, N., et Meyn, R. E. (1999). Bcl-2 expression correlates with apoptosis induction but not tumor growth delay in transplantable murine lymphomas treated with different chemotherapy drugs. Cancer Chemother Pharmacol 44, 367-71.

Struck, R. F., Alberts, D. S., Horne, K., Phillips, J. G., Peng, Y. M., et Roe, D. J. (1987). Plasma pharmacokinetics of cyclophosphamide and its cytotoxic metabolites after intravenous versus oral administration in a randomized, crossover trial. Cancer Res 47, 2723-6.

Stuart, J. A. et Brown, M. F. (2006). Mitochondrial DNA maintenance and bioenergetics. Biochim Biophys Acta 1757, 79-89.

Sullivan, M. W., Stewart-Akers, A., Krasnow, J. S., Berga, S. L., et Zeleznik, A. J. (1999). Ovarian responses in women to recombinant follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone (LH): a role for LH in the final stages of follicular maturation. J Clin Endocrinol Metab 84, 228-32.

Takai, Y., Canning, J., Perez, G. I., Pru, J. K., Schlezinger, J. J., Sherr, D. H., Kolesnick, R. N., Yuan, J., Flavell, R. A., Korsmeyer, S. J., et Tilly, J. L. (2003). Bax, caspase-2, and caspase-3 are required for ovarian follicle loss caused by 4-vinylcyclohexene diepoxide exposure of female mice in vivo. Endocrinology 144, 69-74.

Tannock, I. F. et Lee, C. (2001). Evidence against apoptosis as a major mechanism for reproductive cell death following treatment of cell lines with anti-cancer drugs. Br J Cancer 84, 100-5.

Tasso, M. J., Boddy, A. V., Price, L., Wyllie, R. A., Pearson, A. D., et Idle, J. R. (1992). Pharmacokinetics and metabolism of cyclophosphamide in paediatric patients. Cancer Chemother Pharmacol 30, 207-11.

Tatsumi-Miyajima, J., Kupper, J. H., Takebe, H., et Burkle, A. (1999). Trans-dominant inhibition of poly(ADP-ribosylation) potentiates alkylation-induced shuttle-vector mutagenesis in Chinese hamster cells. Mol Cell Biochem 193, 31-5.

Telfer, E. E., Gosden, R. G., Byskov, A. G., Spears, N., Albertini, D., Andersen, C. Y., Anderson, R., Braw-Tal, R., Clarke, H., Gougeon, A., McLaughlin, E., McLaren, A., McNatty, K., Schatten, G., Silber, S., et Tsafiriri, A. (2005). On regenerating the ovary and generating controversy. Cell 122, 821-2.

Thibaud, E., Ramirez, M., Brauner, R., Flamant, F., Zucker, J. M., Fekete, C., et Rappaport, R. (1992). Preservation of ovarian function by ovarian transposition performed before pelvic irradiation during childhood. J Pediatr 121, 880-4.

Thompson, K. E., Bourguet, S. M., Christian, P. J., Benedict, J. C., Sipes, I. G., Flaws, J. A., et Hoyer, P. B. (2005). Differences between rats and mice in the involvement of the aryl hydrocarbon receptor in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovarian follicle loss. Toxicol Appl Pharmacol 203, 114-23.

Tilly, J. L. (1996). The molecular basis of ovarian cell death during germ cell attrition, follicular atresia, and luteolysis. Front Biosci 1, d1-11.

Tilly, J. L. (2001). Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. Nat Rev Mol Cell Biol 2, 838-48.

Tilly, J. L. et Hsueh, A. J. (1993). Microscale autoradiographic method for the qualitative and quantitative analysis of apoptotic DNA fragmentation. J Cell Physiol 154, 519-26.

Tilly, J. L., Kowalski, K. I., Johnson, A. L., et Hsueh, A. J. (1991). Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. Endocrinology 129, 2799-801.

Tilly, J. L., Tilly, K. I., Kenton, M. L., et Johnson, A. L. (1995). Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong messenger ribonucleic acid levels. Endocrinology 136, 232-41.

Toft, E., Becedas, L., Soderstrom, M., Lundqvist, A., et Depierre, J. W. (1997). Glutathione transferase isoenzyme patterns in the rat ovary. Chem Biol Interact 108, 79-93.

Trasler, J. M., Hales, B. F., et Robaire, B. (1986). Chronic low dose cyclophosphamide treatment of adult male rats: effect on fertility, pregnancy outcome and progeny. Biol Reprod 34, 275-83.

Uldall, P. R., Kerr, D. N., et Tacchi, D. (1972). Sterility and cyclophosphamide. Lancet 1, 693-4.

Van Blerkom, J. et Davis, P. W. (1998). DNA strand breaks and phosphatidylserine redistribution in newly ovulated and cultured mouse and human oocytes: occurrence and relationship to apoptosis. Hum Reprod 13, 1317-24.

van der Schouw, Y. T., van der Graaf, Y., Steyerberg, E. W., Eijkemans, J. C., et Banga, J. D. (1996). Age at menopause as a risk factor for cardiovascular mortality. Lancet 347, 714-8.

Vaskivuo, T. E., Anttonen, M., Herva, R., Billig, H., Dorland, M., te Velde, E. R., Stenback, F., Heikinheimo, M., et Tapanainen, J. S. (2001). Survival of human ovarian follicles from fetal to adult life: apoptosis, apoptosis-related proteins, and transcription factor GATA-4. J Clin Endocrinol Metab 86, 3421-9.

Virag, L. et Szabo, C. (2002). The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. Pharmacol Rev 54, 375-429.

Wallace, W. H., Shalet, S. M., Tetlow, L. J., et Morris-Jones, P. H. (1993). Ovarian function following the treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia. Med Pediatr Oncol 21, 333-9.

Wandji, S. A., Srsen, V., Nathanielsz, P. W., Eppig, J. J., et Fortune, J. E. (1997). Initiation of growth of baboon primordial follicles in vitro. Hum Reprod 12, 1993-2001.

Wandji, S. A., Srsen, V., Voss, A. K., Eppig, J. J., et Fortune, J. E. (1996). Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. Biol Reprod 55, 942-8 .

Warburton, D. (2005). Biological aging and the etiology of aneuploidy. Cytogenet Genome Res 111, 266-72.

Warne, G. L., Fairley, K. F., Hobbs, J. B., et Martin, F. I. (1973). Cyclophosphamide-induced ovarian failure. N Engl J Med 289, 1159-62.

Watson, E., Dea, P., et Chan, K. K. (1985). Kinetics of phosphoramidate mustard hydrolysis in aqueous solution. J Pharm Sci 74, 1283-92.

Wetzels, J. F. (2004). Cyclophosphamide-induced gonadal toxicity: a treatment dilemma in patients with lupus nephritis? Neth J Med 62, 347-52.

Wilmer, J. L., Erexson, G. L., et Kligerman, A. D. (1990). Effect of acrolein on phosphoramidate mustard-induced sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. Cancer Res 50, 4635-8.

Wordinger, R., Sutton, J., et Brun-Zinkernagel, A. M. (1990). Ultrastructure of oocyte migration through the mouse ovarian surface epithelium during neonatal development. Anat Rec 227, 187-98.

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

Yoshida, M., Watanabe, G., Shirota, M., Maekawa, A., et Taya, K. (2005). Reduction of primordial follicles caused by maternal treatment with busulfan promotes endometrial adenocarcinoma development in donryu rats. J Reprod Dev 51, 707-14.

Yu, L. et Waxman, D. J. ( 1996). Role of cytochrome P450 in oxazaphosphorine metabolism. Deactivation via N-dechloroethylation and activation via 4-hydroxylation catalyzed by distinct subsets of rat liver cytochromes P450. Drug Metab Dispos 24, 1254-62.

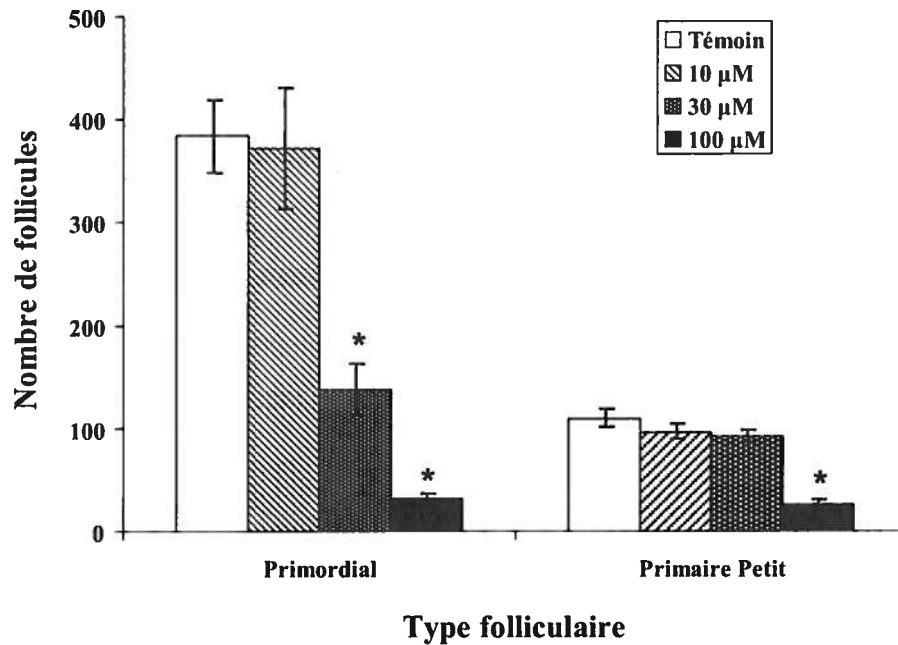
Yu, X., Kamijima, M., Ichihara, G., Li, W., Kitoh, J., Xie, Z., Shibata, E., Hisanaga, N., et Takeuchi, Y. (1999). 2-Bromopropane causes ovarian dysfunction by damaging primordial follicles and their oocytes in female rats. Toxicol Appl Pharmacol 159, 185-93.

Zhang, J., Tian, Q., Yung Chan, S., Chuen Li, S., Zhou, S., Duan, W., et Zhu, Y. Z. (2005). Metabolism and transport of oxazaphosphorines and the clinical implications. Drug Metab Rev 37, 611-703.

## **Annexe 1 : Effets de la Moutarde Phosphoramidée sur le nombre de follicules préantraux d'ovaires néonataux cultivés de rat**

La sensibilité des follicules primordiaux au CPA diffère largement entre le rat et la souris (Plowchalk et Mattison, 1992; Mattison *et al.*, 1983b; Jarrell *et al.*, 1987, 1991; Davis et Heindel, 1998). Il a été supposé que cette différence entre espèces était attribuable au métabolisme général du CPA (Ataya *et al.*, 1990), qui amènerait la production de quantités différentes de métabolites actifs à l'ovaire. Pour évaluer directement la sensibilité des follicules primordiaux de rat à la MP, le métabolite actif du CPA, des ovaires néonataux y ont été exposés *in vitro* tel que décrit dans l'article (Desmeules et Devine, 2006). Les résultats montrent que comme *in vivo* pour le CPA, la dose de MP nécessaire pour induire une diminution du nombre de follicules primordiaux est beaucoup plus élevée chez le rat. À 30  $\mu\text{M}$  de MP, significativement moins de follicules primordiaux et primaires grands (non montré) furent comptés tandis que le nombre de follicules primaires petits demeura semblable à celui des témoins (Figure 10). À la concentration la plus forte, 100  $\mu\text{M}$ , la MP entraîna une diminution du nombre de tous les stades folliculaires présents, mais aussi une altération générale du tissu. Ces résultats montrent que la résistance des follicules primordiaux de rat à la MP n'est pas attribuable totalement à une détoxification plus efficace du CPA. Ils suggèrent que des variations physiologiques tissulaires ou cellulaires soient à la base de cette différence entre les deux espèces.





**Figure 10** : Nombre de petits follicules d’ovaires de rat cultivés 8 jours après une exposition à différentes concentrations de moutarde phosphoramidée (MP). Des ovaires de rats Sprague-Dawley ont été prélevés sur des nouveaux-nés de 2 à 4 jours et isolés avant d’être mis en culture et exposés à la MP une fois au jour 0 de culture. Le nombre de follicules ovariens sains a été compté à chaque douzième section tel que décrit dans l’article. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  erreur standard sur la moyenne. L’astérisque rapporte une différence significative d’avec les témoins,  $p < 0.05$ , ANOVA,  $n = 10$  à  $12$  ovaires par condition dans 3-4 expériences différentes.

## **Annexe 2 : Détection de la forme phosphorylée de H2AX dans des ovaires exposés à la Moutarde Phosphoramidée *in vitro***

### **Introduction**

Plusieurs agents qui endommagent l'ADN sont en mesure de détruire les ovocytes des follicules primordiaux ovariens. Le cyclophosphamide (CPA) et la radiation ionisante en sont des exemples (Hoyer et Sipes, 1996). Le CPA est un agent bis alkylant qui est connu pour générer des ponts inter- et intrabrin sur l'ADN (Ludeman, 1999); ce type d'adduits peut générer des cassures du brin d'ADN, des lésions qui sont critiques pour la survie des cellules. Chez la souris, la dégénérescence des ovocytes causée par le CPA semble plus facilement induite au stade primordial, où l'ovocyte est dormant (Plowchalk et Mattison, 1992; Desmeules et Devine, 2006), qu'à d'autres stades folliculaires. Une efficacité variable des mécanismes de réparation d'ADN dans l'ovocyte à travers différents stades folliculaires pourrait être avancée pour expliquer ces différences. Afin de savoir si le CPA induit des cassures d'ADN dans les ovocytes des petits follicules préantraux, nous avons cherché à repérer un événement cellulaire impliqué dans la reconnaissance de ce type de dommage. Nous avons tenté de localiser les foyers de la forme phosphorylée de l'histone H2AX ( $\gamma$ -H2AX), qui se forment aux sites de cassures double brin d'ADN (Rogakou *et al.*, 1998), dans des ovaires néonataux exposés au métabolite actif du CPA *in vitro*.

### **Méthodologie**

Des ovaires de souris CD-1 ont été prélevés sur des jeunes au jour post-natal 4 et mis en culture pour être exposés à la moutarde phosphoramidée (MP, un métabolite actif du CPA) tel que décrit dans l'article (Desmeules et Devine, 2006), l'exposition ayant été effectuée au jour 4 de culture. Les tissus récoltés à différents points de temps après l'exposition (3, 6, 9, 12, 18, 24, et 48 h) ont été traités pour l'immunohistochimie comme dans l'article, sauf que l'anticorps primaire ( $\gamma$ -H2AX, Upstate, CA) a été dilué à 1:50 et l'anticorps secondaire biotinylé de lapin à 1:75. Les foyers nucléaires de  $\gamma$ -H2AX présents dans les ovocytes de chaque stade folliculaire ont été comptés, manuellement, sur des photos numériques prises sur un microscope à fluorescence standard (grossissement de 64 fois). Les comptes de foyers ont été regroupés dans trois classes : de 0 à 4, de 5 à 10, et plus de 10 foyers par ovocyte.

## *-Statistiques*

Pour comparer les distributions d'ovocytes marqués entre les concentrations pour chaque point de temps, les deux classes de plus de 5 foyers ont été fusionnées pour pouvoir utiliser la méthode exacte de Fischer; trop de proportions étaient près de 0 ou 1 pour effectuer un Chi-carré. Pour une même concentration de MP, l'homogénéité des distributions au fil du temps a été investiguée par un test de G de vraisemblance. Les groupes homogènes ont ensuite été regroupés manuellement en faisant un test de comparaison multiple basé sur des tests de Chi-carré (Scherrer, 1984) avec l'aide du logiciel JMP® (Version 5.1, SAS Institute Inc, Cary, NC).

## **Résultats**

L'immunomarquage effectué pour localiser  $\gamma$ -H2AX dans des ovaires néonataux après exposition à la MP a révélé la présence de foyers nucléaires. De tels foyers ont été observés dans les ovocytes de follicules de tous les stades présents (Fig. 11) après traitement à la MP, mais très peu étaient présents dans les ovaires témoins (Tableau 4); certaines cellules de la granulosa présentaient aussi des foyers (non montré). Les follicules marqués étaient distribués assez uniformément dans le tissu mais le nombre de foyers par ovocyte était variable; seulement certains d'entre eux étaient discernables dans quelques ovocytes tandis qu'ils étaient très abondants et parfois même accompagnés d'un bruit de fond dans d'autres (Fig. 1-A).

La comparaison des distributions du nombre de foyers par ovocyte a été effectuée entre les témoins et chacune des concentrations de MP utilisées pour chaque type folliculaire. Chez les follicules primordiaux et primaires petits, une plus grande proportion d'ovocytes avec plus de 5 foyers de  $\gamma$ -H2AX par rapport aux témoins a été observée à partir de 9 h aux deux concentrations testées (Tableau 4), sauf chez les follicules primaires petits à 3  $\mu$ M (Tableau 4, Fig. 2-C). À l'exception des follicules primordiaux exposés à 10  $\mu$ M, une plus grande proportion de foyers a été observée jusqu'à 48 h après l'exposition dans les ovocytes de tous les types folliculaires aux deux concentrations testées. Par ailleurs, hormis les follicules primaires petits 48 h après l'exposition, la proportion d'ovocytes avec un plus grand nombre de foyers s'est révélée plus importante à 10  $\mu$ M qu'à 3  $\mu$ M à tous les points de temps où une plus grande présence de foyers par rapport aux témoins a été rapportée (Tableau 4).

Pour mieux caractériser l'apparition des foyers de  $\gamma$ -H2AX dans les ovocytes de follicules primordiaux et primaires, la comparaison des distributions de foyers a été effectuée entre les points de temps pour chaque concentration. Dans tous les cas où la détection d'une proportion de foyers supérieure aux témoins a été observée 9 h après l'exposition, la proportion de follicules avec plus de foyers s'est accrue davantage à 12 h (Fig. 12, A-B-D). Dans les follicules primordiaux, les distributions de nombre de foyers observés dans les ovocytes étaient homogènes de 12 à 24 h à 10  $\mu$ M de MP ( $\chi^2 = 2.26$ ;  $P = 0.31$ ; Fig. 2, B) contrairement à la même période à 3  $\mu$ M de MP ( $\chi^2$ ,  $P < 0.05$ ; Fig. 2, A), où le nombre d'ovocytes avec plus de 10 foyers s'est accru. Dans les follicules primaires petits, le pic d'ovocytes contenant le plus grand nombre de foyers a été atteint 18 h après l'exposition aux deux concentrations testées; les distributions de nombre de foyers se sont révélées similaires, à l'intérieur de chaque concentration, entre les points de temps 12 et 24 h (3 $\mu$ M :  $\chi^2 = 1.84$ ;  $P = 0.40$ ; 10 $\mu$ M :  $\chi^2 = 0,19$ ;  $P = 0.90$ ; Fig. 2, C-D).

Le nombre de follicules primaires grands présents dans les tissus analysés s'est avéré trop faible pour effectuer une analyse statistique semblable, mais plusieurs de ces follicules présentaient des ovocytes avec des foyers de  $\gamma$ -H2AX (Fig. 1-C). Par exemple, la distribution d'ovocytes marqués (de 0 à 4 : de 5 à 10 : plus de 10) était de 7 : 3 : 2 et 6 : 3 : 4 à 3  $\mu$ M et 2 : 1 : 13 et 6 : 0 : 9 à 10  $\mu$ M, 18 et 24 h après l'exposition, respectivement.

## Discussion

Les résultats obtenus lors de cette étude suggèrent que la MP induit des cassures d'ADN double brin dans les ovocytes de petits follicules préantraux. En effet, des foyers d'un facteur considéré comme spécifique à ce type de lésions,  $\gamma$ -H2AX (Rogakou *et al.*, 1998), y a été immunolocalisé après exposition d'ovaires à la MP *in vitro*. Cette observation est plausible compte tenu qu'il est connu que les effets cytotoxiques du CPA sur les cellules germinales peuvent passer par la formation d'adduits sur l'ADN (Anderson *et al.*, 1995). Les adduits formés par le CPA sur l'ADN pourraient résulter en des cassures d'ADN directement ou indirectement, notamment par des tentatives de réparation des ponts inter- et intrabrin générés sur l'ADN (Niedernhofer *et al.*, 2004). De hauts niveaux de foyers de  $\gamma$ -H2AX ont d'ailleurs été observés dans des spermatocytes de stade pachytène après une exposition aiguë au CPA chez le rat (Aguilar-Mahecha *et al.*, 2005).

L'apparition de foyers de  $\gamma$ -H2AX dans les ovocytes des follicules primordiaux et primaires s'est révélée être dépendante du temps. Une proportion supérieure de follicules marqués pour  $\gamma$ -H2AX n'est apparue que 9 ou 12 h après l'exposition. Cette présence accrue de cassures d'ADN apparaît tardive, considérant la demie-vie très courte de la MP dans les conditions de culture (environ 18 min (Engle *et al.*, 1982)). En comparaison, des foyers de  $\gamma$ -H2AX ont été observés dans ces tissus aussi tôt que 1,5 h après une exposition à 0,5 Gy de radiation ionisante (Communication personnelle). Ce délai de quelques heures entre l'exposition à la MP et l'apparition de cassures d'ADN pourrait être attribuable au temps nécessaire pour que le produit pénètre en profondeur dans les ovaires et/ou les ovocytes. Il est aussi possible que les cassures ne soient causées qu'après une tentative de réparation des adduits formés par la MP sur l'ADN. Ainsi, le temps requis pour que les processus de réparation d'ADN se mettent en branle pourrait expliquer partiellement le délai observé.

Quoiqu'il en soit, ces données suggèrent que l'apparition des foyers de  $\gamma$ -H2AX puisse précéder quelque peu l'apparition des signes de dégénérescence des ovocytes. À 3 $\mu$ M de MP, il faut attendre 24 ou 48 h dans les follicules primordiaux et primaires petits pour qu'un nombre significatif d'ovocytes pycnotiques soit observé (Figure 4 de l'article). Pourtant, dans ces follicules, au-delà de 50% d'ovocytes présentaient des foyers de  $\gamma$ -H2AX aussi tôt que 18 h après l'exposition à cette concentration. La comparaison directe entre ces données est toutefois limitée parce que les deux critères mentionnés ne peuvent être observés en même temps avec les méthodes utilisées.

Par ailleurs, la persistance de plusieurs ovocytes avec des foyers de  $\gamma$ -H2AX aussi tard que 48 h après l'exposition dans ces follicules laisse supposer que la phosphorylation de H2AX est maintenue pendant leur dégénérescence. Cela serait supporté par des rapports précédents suggérant que la phosphorylation de H2AX puisse se maintenir pendant le déroulement de l'apoptose et même au cours de la fragmentation nucléaire (Mukherjee *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006). L'observation de plusieurs ovocytes marqués pour  $\gamma$ -H2AX avec un bruit de fond important à 24 et 48 h après l'exposition pourrait correspondre à un état avancé de

dégénérescence révélé par un marquage pour la fragmentation nucléaire à ces points de temps (Figure 5 de l'article).

Ainsi, les résultats obtenus lors de cette expérience suggèrent que l'induction de cassures d'ADN double brin par le CPA dans les ovocytes de petits follicules préantraux puisse jouer un rôle important dans leur dégénérescence. Cependant, l'observation parallèle de foyers d'H2AX dans une grande proportion d'ovocytes de follicules primaires grands, dont la plupart maintiennent une apparence saine après exposition à la MP aux points de temps examinés ici (données non montrées), laisse supposer que des différences de réaction des ovocytes face à ce type de dommage puissent exister entre les stades folliculaires. Ainsi, l'efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN pourrait s'avérer une piste intéressante à étudier en vue d'expliquer les différences de sensibilité des follicules ovariens au CPA. Le recrutement de facteurs de réparation d'ADN aux sites de  $\gamma$ -H2AX pourrait varier en nature ou en efficacité d'un type cellulaire/folliculaire à l'autre.

**Tableau 4<sup>a</sup>** : Proportion de follicules présentant des ovocytes avec plus de 5 foyers de  $\gamma$ -H2AX en fonction de la concentration et du temps après des expositions de Moutarde Phosphoramidée (MP) à des ovaires néonataux en culture

Temps après l'exposition (h)	Primordiaux						Primaires petits					
	Témoins		MP 3 $\mu$ M		MP 10 $\mu$ M		Témoins		MP 3 $\mu$ M		MP 10 $\mu$ M	
	% plus de 5 foyers	n <sup>b</sup>	% plus de 5 foyers	n	% plus de 5 foyers	n	% plus de 5 foyers	n	% plus de 5 foyers	n	% plus de 5 foyers	n
3	0	27	1.2	85	7.5	40	0	17	4	25	0	12
6	0.8	125	4.6	175	3.9	179	12.8	39	19.6	51	10	40
9	3	166	18.9*	111	48.9*. <sup>§</sup>	243	0	28	15.6	45	31.5*	73
12	1.2	85	32.7*	98	80*. <sup>§</sup>	140	2.3	44	39.5*	42	80*. <sup>§</sup>	72
18	0	15	55.6*	169	78.1*. <sup>§</sup>	140	0	16	59*	61	98.5*. <sup>§</sup>	67
24	3.9	178	58.4*	137	73.2*. <sup>§</sup>	151	3.6	56	44.4*	72	82.8*. <sup>§</sup>	93
48	0	68	39.4*	33	8.7	69	0	12	51.2*. <sup>§</sup>	43	22.6*	31

a : De 2 à 4 ovaires par expérience dans 2 à 3 expériences différentes ont été analysés

b : n représente le nombre de *follicules* inclus dans l'analyse

\* représente une différence significative avec les témoins,  $P < 0.05$

§ représente une différence significative avec l'autre concentration de MP,  $P < 0.05$

**Figure 11**

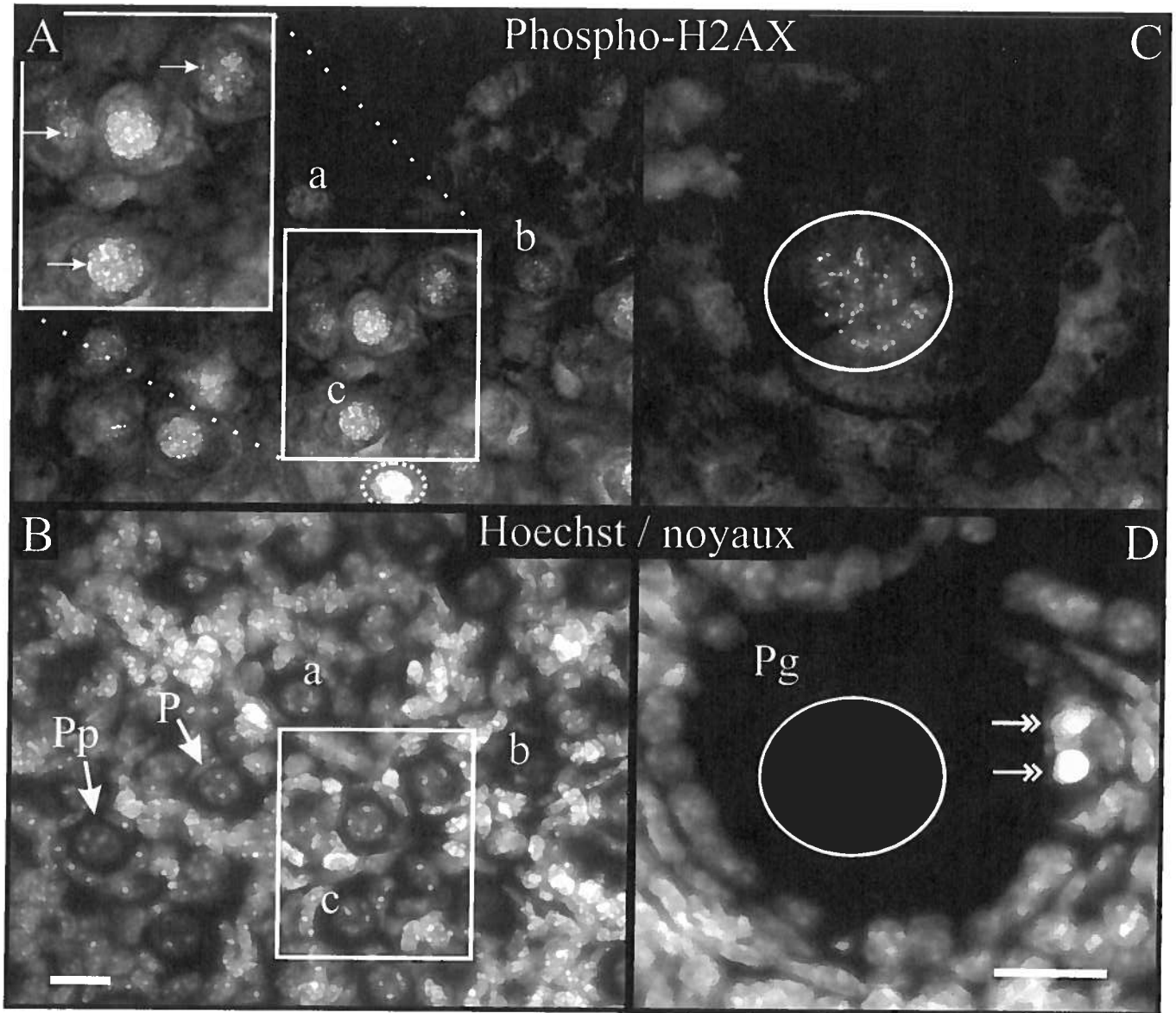




Figure 12

