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

L'HORMONE ANTI-MÜLLERIENNE : EXPRESSION, REGULATION ET BIOMARQUEUR DES FOLLICULES OVARIENS.

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maîtrise en sciences expérimentales de la santé

Par

THÉRÉSA JESSY CHOISI

Jury d'évaluation

Président du Jury et examinateur interne
Dr J. Thomas Sanderson
INRS-Institut Armand Frappier

Examinateur externe
Dr Christopher A. Price
Faculté de médecine vétérinaire
Université de Montréal

Directeur de recherche:
Dr Patrick J. Devine
INRS-Institut Armand Frappier

AVANT-PROPOS

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été effectués dans le cadre de ma maîtrise en sciences expérimentales de la santé. Mon projet de recherche était en partie basé sur des résultats obtenus par la Dre Sukhdeep Kaur Sahambi et Catherine Ferland. Les dosages sériques de l'hormone anti-Müllerienne présentés dans l'article ont été effectués au Pays-Bas dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe des Dre Jenny Visser et Dr Axel P. N. Themmen. J'ai réalisé la majorité des expériences et toutes les analyses de résultats présentés dans l'article. J'ai effectué toutes les expériences et analyses de résultats présentées en annexe.

Les résultats de mes travaux ont fait l'objet de différentes présentations par affiches et/ou orale au congrès Armand Frappier (2007, 3e prix), au colloque du Réseau Québécois en Reproduction (2008, Bourse de voyage), au *Canadian Fertility and Andrology Society* (2008), au colloque du Réseau de recherche en santé environnementale (2008, 2009, 1er prix) et lors d'un congrès international de la *Society of Study on Reproduction* (2009).

RÉSUMÉ

La vie reproductive d'une femme est limitée par le nombre de ses gamètes. Les follicules primordiaux sont la forme de réserve de ces gamètes et leur nombre est défini dès la naissance chez la femme. Etant non renouvelables, ils sont une source épuisable pour sa fertilité. Dans l'ovaire, les follicules primordiaux sont en quiescence et peuvent le rester durant des décennies chez la femme. Une fois activés, ils évoluent en différents stades de maturation (follicules primaires, secondaires et antraux) qui reflètent une fertilité à moyen et court terme. Chez la femme, la perte des follicules ovariens est constante et aboutit à l'apparition d'une ménopause après plusieurs dizaines d'années. Plusieurs expositions ovo-toxiques environnementales peuvent accélérer la perte des follicules et conduire à une ménopause précoce.

L'estimation de la réserve ovarienne (l'ensemble des follicules ovariens) devient une préoccupation pertinente ces dernières années. En effet, l'amélioration des taux de survie aux cancers chez des femmes en âge de procréer, l'augmentation des expositions environnementales potentiellement ovo-toxiques et le recul de l'âge auquel les femmes ont leur premier enfant ont accru la nécessité d'avoir des outils permettant d'évaluer la taille de la réserve ovarienne. Plusieurs biomarqueurs sont utilisés afin de déterminer la taille de la réserve ovarienne à moyen et court terme; toutefois, leur capacité à prédire la réserve ovarienne à long terme et les stades folliculaires qu'ils reflètent le plus sont méconnus. Actuellement, aucuns biomarqueurs ne donnent accès au nombre de follicules primordiaux.

Des études épidémiologiques chez la femme et, d'autres menées sur des souris ont démontré que le taux sérique d'hormone anti-Müllerienne (AMH) reflétait la fertilité et qu'il serait corrélé au nombre de follicules primordiaux (fertilité à long terme). L'AMH serait le meilleur candidat pour évaluer le nombre de follicules primordiaux comparé aux biomarqueurs couramment utilisé pour évaluer la réserve ovarienne (la FSH, l'œstradiol et l'inhibine B). Afin de comparer ces biomarqueurs et déterminer leur lien avec le nombre de follicules primordiaux, nous avons élaboré un modèle *in vivo* dans lequel la population folliculaire est modulée. En effet, 4 groupes de souris (CD-1) ont été exposées, par voie intra péritonéale, au 4-Vinylcyclohexène diepoxide (VCD), un agent ovo-toxique ciblant les petits follicules, à des doses et périodes différentes (80-160 mg/kg/j) ou le véhicule pour le groupe contrôle (DMSO/saline). Des sacrifices ont eu lieu 21,

41 et 61 jours après la première injection. La pesée des souris et de divers organes n'ont montré aucune toxicité non spécifique du VCD. Toutes les souris exposées au VCD présentaient une diminution significative du nombre de follicules primordiaux et petits primaires quelques soit le point de temps observé. Par contre ce n'est que 41j après la première exposition qu'on observe une diminution significative du taux d'AMH sérique ($p<0.05$) lorsque le nombre de follicules secondaires diminuent chez les groupes traités au VCD. En comparaison, le taux d'inhibine B diminue également chez tous les groupes traitées au VCD à 41j ($p<0.05$) mais pas à 61j ($p>0.05$), tandis que celui de la FSH augmente significativement à partir de 41j uniquement pour le groupes traité avec la plus forte dose de VCD (160 mg/kg/j-20j, 41 et 61j, $p<0.05$). Le taux sérique d'œstradiol ne présente aucun changement significatif quelques soit le point de temps ($p>0.05$). Seule l'AMH sérique présente une corrélation avec le nombre de follicules primordiaux (Test de Pearson, $r=0.31-0.61$) et avec le nombre de follicules en croissance ($r=0.5-0.7$) à tous les points de temps. Les autres biomarqueurs ne présentent aucune corrélation entre leur taux sérique et le nombre de follicules primordiaux à tous les points de temps. Etonnamment la diminution sérique d'AMH n'est pas reflétée dans l'ovaire par une diminution de l'expression protéique de l'AMH que se soit à 21j et 41j. Les cellules de la granulosa pourraient accroître leur production en AMH et/ou diminuer la libération de l'AMH dans la circulation sanguine. L'AMH sérique semble être le meilleur biomarqueur de la réserve ovarienne parmi ceux testés. De plus, l'AMH permettrait d'évaluer l'impact d'ovo-toxique sur la réserve ovarienne dans son ensemble compte-tenu de sa corrélation avec le nombre de follicules primordiaux et les follicules en croissance. Désormais, nous disposons d'un modèle d'ovo-toxicité qui permettra de tester d'autres bio-marqueurs de la réserve ovarienne.

THERESA JESSY CHOISI

PATRICK J. DEVINE

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier mon directeur de recherche Patrick J. Devine pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et fait confiance durant ma maîtrise. Son investissement total pour la recherche a été une source de motivation inépuisable.

Je remercie les membres de mon laboratoire pour leur soutien et en particulier Stephanie Petrillo.

Sur le plan financier, j'aimerais souligner l'appui de la Fondation Armand Frappier dont j'ai été boursière, les différents organismes qui m'ont attribuée des subventions, prix et bourse de voyages durant ma maîtrise et le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) qui subventionne ce projet.

Pour finir, je remercie le Dr Sanderson et le Dr Price pour avoir accepté d'évaluer et commenter le contenu de ce mémoire.

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS **2**

RÉSUMÉ **3**

REMERCIEMENTS **5**

LISTE DES ABRÉVIATIONS **8**

LISTE DES FIGURES **10**

LISTE DES TABLEAUX **11**

I. PARTIE I : PASSAGE EN REVUE DE LA LITTERATURE **12**

1. PHYSIOLOGIE DU SYSTEME REPRODUCTEUR 12
2. L'OVAIRE 13
   - *2.1 La gamétogenèse chez la femelle* *13*
     - 2.1.1 L'ovogenèse 14
     - 2.1.2 La folliculogenèse 17
   - *2.2 Le cycle ovarien : implication de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique* *24*
   - *2.3 La ménopause* *30*
3. ESTIMATION DE LA RESERVE OVARIENNE 31
   - *3.1 La biopsie ovarienne : une évaluation de tous les stades folliculaires* *32*
   - *3.2 Compte des follicules antraux (AFC) par échographie trans-vaginale* *32*
   - *3.3 Dosages hormonaux* *33*
4. L'HORMONE ANTI-MÜLLERIENNE : CARACTERISTIQUES GENOMIQUES ET PROTEIQUES 38
   - *4.1 Les caractéristiques de la superfamille des TGF-β* *38*
   - *4.2 Les récepteurs de l'AMH* *44*
   - *4.3 Expression et régulation de l'AMH* *47*
     - 4.3.1 Etude du promoteur de l'AMH 47
     - 4.3.2 Expression et régulation de l'AMH chez le mâle 49
     - 4.3.3 Expression et régulation de l'AMH chez la femelle 50
5. MODULATION DE LA POPULATION OVARIENNE EN FOLLICULE PAR DES OVO-TOXIQUES 51
   - *5.1 Méthoxychlore* *52*
   - *5.2 Le cyclophosphamide (CPA)* *53*

5.3 Le 4-Vinylcyclohexène diepoxide (VCD) *53*

5.4 Autres ovo-toxiques *54*

OBJECTIFS **56**

II. RESUME DE L'ARTICLE EN FRANÇAIS **60**

L'article *62*

III. DISCUSSION GENERALE **93**

IV. PERSPECTIVES **99**

V. CONCLUSION **101**

RÉFÉRENCES **102**

ANNEXES **126**

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
AMH : hormone anti-Müllerienne
AMHRII: Récepteur de type II de l'AMH
ARN: acide ribonucléique
ARNi: ARN interférant
BaP: benzo[a]pyrène
bFGF: *basic fibroblast growth factor*
BMP: bone morphogenic protein
BMP-15: *Bone morphogenic protein-15*
BMP-4: *bone morphogenic proteins-4*
BPA: *bisphénol A*
CHO: Chinese Hamster Ovary
cisplatine: cis-diamminedichloroplatinum
c-kit: récepteur KL ou *C-kit receptor*
CPA : cyclophosphamide
CYP: cytochrome P450
DEHP: *Di-(2-ethylhexyl)phthalate*
DMBA: 7,12-dimethylbenz[a]anthracène
DMSO: diméthyl sulfoxide
EGF: *epidermal growth factor*
EMSA: *Electrophoretic mobility shift assay*
FIGα: *factor in the germ line α*
FIV: fécondation *in vitro*
Foxo3: *forkhead transcription factors 3*
FSH : *follicle stimulating hormone*
GDF-9: *growth differentiation factor-9*
GnRH: hormone gonadolibérine
HPTE: bis-hydroxy-MTX
HRT : *hormone replacement therapy*
HSD3B1: 3β-hydroxysteroïde déshydrogénase
I.p. : intrapéritonéale
IGF-II: *insulin growth factor-II*
KGF: *keratinocyte gowth factor*
KL: *Kit Ligand*
KO : knock-out
LH : *luteinizing hormone*
LHR: Récepteur de l'hormone lutéinisante
LIF : *leukemia inhibitory factor*
MEHP: *mono-(2-ethyl)phthalate*

mono-OH: mono-hydroxy MTX
MP : moutarde phosphoramidée
MTX: méthoxychlore
Pb : paire de base
PCR*: polymerase chain reaction*
PGC: *cellules germinales primordiales*
PI3K : *phosphoinositol 3-kinase*
PTEN: *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*
SF-1: steroidogenic factor-1
SOX9 : Sry-related factor 9
TGF: *transforming growth factor*
TNF-α: tumor necrosis factor-α
VCD : 4-vinylcyclohexene diépoxide
VCH: vinylcyclohexene
VEGF: vascular endothelial growth factor
WT-1: *Wilms' tumor-1 factor*

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Le système reproducteur féminin 12
Figure 2: La gamétogenèse chez la femme 13
Figure 3: Illustration de l'ovogenèse. 15
Figure 4: Illustration de la folliculogenèse. 17
Figure 5: L'activation du follicule primordial 19
Figure 6: L'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. 24
Figure 7: Production de stéroïdes par les cellules de la granulosa des follicules secondaires à antraux 25
Figure 8: Production de stéroïdes par les cellules du corps jaune 26
Figure 9: Le cycle menstruel chez la femme. 27
Figure 10: Régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique lors de l'ovulation 29
Figure 11: Le déclin du nombre de follicules avec l'âge chez la femme 30
Figure 12: Contributions des différents stades folliculaires à la production hormonale. 34
Figure 13: Immuno-histochimie dirigée contre la protéine AMH dans des ovaires de souris 36
Figure 14: Implication des membres de la superfamille des TGF-β dans la communication bi-directionnelle de l'ovocyte, des cellules de la granulosa et de la thèque. 38
Figure 15: Voie de transduction du signal activée par la plupart des membres de la famille des TGF-β. 40
Figure 16: Profil des concentrations sériques de l'AMH chez les mammifères au cours de la vie fœtale et post-natale. 41
Figure 17: Comparaison des séquences protéiques de l'AMH de plusieurs mammifères. 42
Figure 18: Synthèse et maturation post-traductionnelle de l'AMH humain. 43
Figure 19: Voie de signalisation de l'AMH possible dans les cellules de la granulosa 45
Figure 20: Comparaison des séquences des promoteurs de l'AMH humain, souris, rat et bovin. . 48
Figure 21: Mécanisme moléculaire probable de l'expression et régulation du gène de l'AMH chez les mâles 50
Figure 22 (Annexe 1): Corrélation du nombre de follicules primordiaux et du nombre de follicules primaires avec le taux sérique de l'AMH. 127
Figure 23 (Annexe 1): Corrélation du nombre de follicules secondaire et du nombre des follicules antraux avec le taux sérique de l'AMH. 128

Figure 24 (Annexe 1): Corrélation du nombre total des follicules ovariens au taux sérique de l'AMH.. 129
Figure 25 (Annexe 2): Mise en évidence de sites de liaisons pouvant être impliqués dans l'expression et la régulation du gène de l'AMH chez la femelle 136
Figure 26 (Annexe 2): Implication de GATA-4, SF-1 et LRH1 dans l'expression du gène de l'AMH chez la femelle..... 136

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Taux de FSH et d'AMH de références selon les catégories d'âge chez la femme..... 33
Tableau 2 (Annexe 1): Récapitulatif des corrélations observées dans le cadre de notre étude in vivo..... 98
Tableau 3 (Annexe 2): Oligonucleotides utilisés lors du retardement sur gel..... 132
Tableau 4 (Annexe 2): Sélection de facteurs de transcription à étudier en profondeur avec leur séquence consensus. 134

I. Partie I : Passage en revue de la littérature

1. Physiologie du système reproducteur

Au sein du système reproducteur femelle, l'ovaire tient un rôle essentiel. Sa fonction principale est de produire des ovocytes de qualité (viable et mature) qui pourront être fécondés et évolués en embryon. Chez les mammifères, les ovaires sont situés dans la cavité pelvienne et sont rattachés à l'utérus par des ligaments (fig.1).

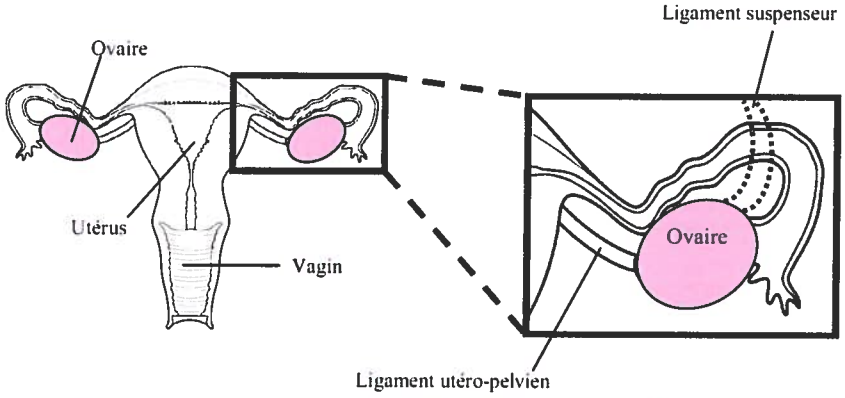

Figure 1: Le système reproducteur féminin. Il se divise en trois zones distinctes : l'ovaire (portion glandulaire), l'utérus (portion tubulaire) et le vagin (sinus uro-génitale). Les ovaires sont maintenus dans la cavité pelvienne par plusieurs ligaments dont le ligament utéro-pelvien et le suspenseur.

Les ovaires sont constitués de deux régions distinctes: le cortex et la médulla (Hirshfield, 1991; Fortune, 2003). Le cortex, également appelé zone parenchymateuse, représente la région périphérique de l'ovaire (humain et rongeurs) et est faiblement vascularisé comparé à la médulla qui est riche en vaisseaux sanguins et nerfs. Les ovocytes sont entourés d'une ou plusieurs couches de cellules de la granulosa formant ainsi l'unité fonctionnelle de l'ovaire: le follicule ovarien. La formation du follicule ovarien sera discutée plus en détail à la section 2.1.2. L'ovocyte mature est l'aboutissement de la gamétogenèse femelle, un processus qui se déroule uniquement au niveau des ovaires. La gamétogenèse et la production d'hormones sexuelles (œstrogènes et progestérone) sont deux processus important qui siègent dans l'ovaire.

2. L'ovaire

2.1 La gamétogenèse chez la femelle

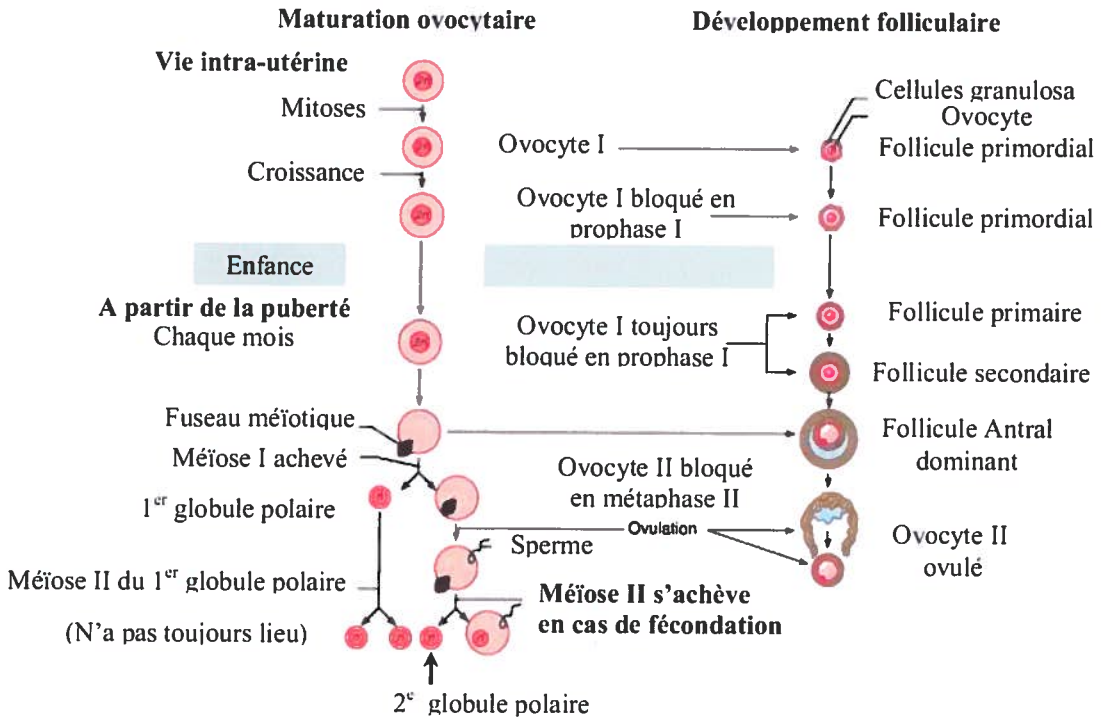

Figure 2: La gamétogenèse chez la femme. Les ovogonies issues de la vie utérine et inclus dans des follicules vont poursuivre leur maturation via la méïose. Bloqué en prophase I avant la naissance, certains d'entre eux vont poursuivre la méïose. Lors de l'ovulation, l'ovocyte a achevé la méïose I et entamé la méïose II. La méïose II sera achevé uniquement après la fécondation par un spermatozoïde. Adapté de *Human Anatomy & Physiology* par Elaine Marieb 5e édition.

La gamètogenèse ou ovogenèse chez la femelle est le passage d'une cellule diploïde à une cellule haploïde – le gamète. C'est un processus discontinu puisque certains stades ne seront atteints qu'à partir de la puberté. L'ovogenèse s'amorce durant la vie intra-utérine pour s'achever quelques années après la ménopause. L'ovogenèse peut être subdivisée en trois phases temporelles (Fig. 2). La première phase se déroule avant la naissance et est marquée par la multiplication des ovogonies. La deuxième phase se déroule à partir de la puberté jusqu'à la ménopause et est représentée par la folliculogenèse qui se déroule en même temps que l'ovogenèse. Enfin, la troisième phase se déroule uniquement à la suite d'une fécondation de

l'ovule par un spermatozoïde. Avant la puberté, la fertilité d'une femelle est nulle puisqu'il n'y a pas d'ovocyte mature disponible durant cette période.

2.1.1. L'ovogenèse

L'ovogenèse (fig. 2 et 3) débute avant la naissance entre la 5e semaine et la fin du 7e mois de gestation chez l'humain (Baker, 1963 ; Baker & Eastwood, 1983; Gondos *et al.* 1986). Chez l'humain comme chez les souris, les cellules germinales primordiales (PGC) sont à l'origine aussi bien des spermatozoïdes que des ovocytes (Lawson & Hage, 1994; Kierszenbaum & Tres, 2001; McLaren, 2000). Lawson et Hage (1994) ont démontré que les précurseurs des PGCs proviennent de l'épiblaste proximal proche de l'ectoderme extra-embryonnaire chez la souris. Lors de la gastrulation (6.5 jours de développement), ils vont quitter l'épiblaste et migrer vers une région extra-embryonnaire à la base de l'allantoïde. À partir de cette région extra-embryonnaire, les précurseurs des PGCs ne peuvent plus évoluer en d'autres types cellulaires autres que les PGCs. Durant la migration des PGCs de la base de l'allantoïde jusqu'aux crêtes génitales (gonades primitives) et au niveau de celles-ci, les PGCs vont se multiplier par vagues sucessives de mitoses (Anderson *et al.* 1999; Bendel-Stenzel *et al.* 1998). Ces PGCs, qui se trouvent dans la zone corticale de l'ovaire, se modifient en clones cellulaires d'ovogonies (amas d'ovogonies) qui sont reliés par des ponts cytoplasmiques indispensables à la synchronisation de la méïose chez la souris contrairement à l'humain où il n'y a pas de synchronisation. Ces mitoses permettent la constitution d'un stock non renouvelable d'environs 6 millions d'ovogonies chez l'humain (Baker, 1963; Baker & Eastwood, 1983; McGee & Hsueh, 2000).

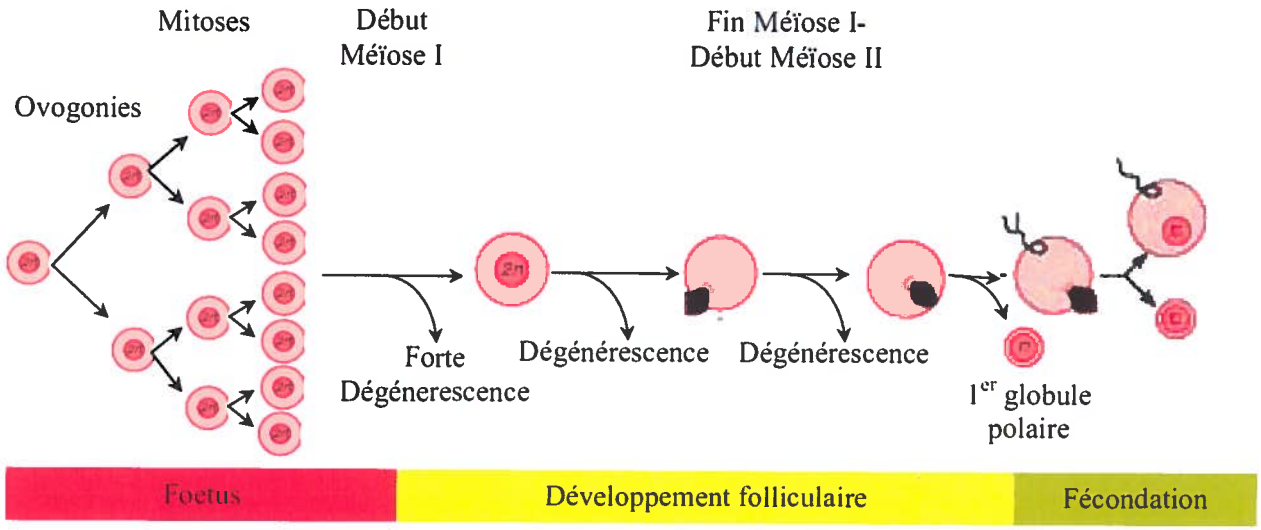

Figure 3: Illustration de l'ovogenèse. Durant l'embryogenèse les ovogonies vont se multiplier par mitoses. A la fin de la phase de prolifération, une forte dégénérescence a lieu avant la naissance. Les ovogonies vont amorcer la méïose I et s'arrêter en prophase I durant des mois ou années. Durant la puberté, certains ovocytes I font poursuivre la méïose et dégénèrent. A partir de la puberté, plusieurs ovocytes I pourront entamer la méïose I mais peu d'entre eux l'achèveront avec l'expulsion du 1er globule polaire. Habituellement un ovocyte atteint la méïose II et s'arrête en métaphase II jusqu'à l'ovulation. S'il y a fécondation, l'ovocyte II achèvera la méïose II avec l'expulsion du 2e globule polaire. Adapté de *Human Anatomy & Physiology* par Elaine Marieb 5e édition.

A partir de la 12e semaine de gestation, les ovogonies entrent en méïose, marquant ainsi leur passage au stade d'ovocytes primaires (ovocytes I), d'un diamètre de 20 à 40 µm (Encha-razavi & Escudier, 2003). Durant cette différenciation, les ovocytes sont isolés les uns des autres par les cellules épithéliales folliculaires aplaties (provenant de l'épithélium cœlomique) formant ainsi un follicule primordial. A la naissance tous les ovocytes du nouveau-né sont bloqués au stade diplotène de la prophase I (Hirshfield, 1991 ; McLaren, 2000). Ils constituent la forme de réserve des cellules germinales (Bullejos & Koopman, 2004). Cette phase d'arrêt de la méïose est appelée dictyotène (Speed, 1982 ; Hunt & Hassold, 2008). Seul 5% des 6 millions d'ovogonies vont atteindre le stade diplotène de prophase I (Baker, 1963). Un grand nombre de ces ovocytes sera éliminé par apoptose, en particulier ceux qui ne sont pas entourés de cellules folliculaires. L'établissement du cycle ovarien à la puberté permet le développement de certains follicules jusqu'à maturité. Le follicule mature renferme un ovocyte qui a achevé la méïose I marqué par l'expulsion du premier globule polaire et qui entame la méïose II (fig. 2 et 3). Seul un ou deux de

ces ovocytes poursuivront jusqu'à la métaphase II juste avant l'ovulation. Durant la maturation pré-ovulatoire, il y a un accroissement du volume de l'ovocyte. Cet accroissement de l'ovocyte est dû à l'accumulation de réserves protéiques et en ARN messagers qui seront nécessaires au développement du potentiel embryon. Lors de la fécondation par un spermatozoïde, il y a reprise de la méïose dans l'ovocyte II et expulsion du 2e globule polaire. L'expulsion du 2e globule polaire coïncide avec la fin de la maturation de l'ovocyte devenu ovule.

Le dogme en reproduction stipule que le nombre de follicules primordiaux chez les femelles mammifères est défini avant (humain) ou peu après (rongeurs) la naissance. Par conséquent, les follicules primordiaux constituent un stock non renouvelables (Mandl & Zuckerman, 1951 ; Fortune, 2003; Hirshfield, 1991). En 2004, *Jonhson* et collègues ont suggéré qu'il avait découvert des cellules souches pouvant se différencier en ovogonie après la naissance et que par conséquent le stock d'ovogonies serait renouvelable (Johnson *et al.* 2004). En 2005, ils poursuivent en suggérant que les ovogonies qui permettraient le renouvellement du stock seraient des cellules souches provenant de la moelle osseuse ayant été véhiculées par le sang jusqu'aux ovaires (Johnson *et al.* 2005). Pour appuyer leurs postulats, Lee et collègues (2007) ont transfusé de la moelle osseuse à des souris qui avait subi une chimiothérapie et qu'ils considéraient infertiles. La moelle osseuse transfusée provenait de souris transgéniques chez qui un gène spécifique des cellules germinales était exprimé conjointement avec le gène de la protéine GFP. Par conséquent, la présence de cellules germinales provenant des souris transgéniques pouvaient être localisée grâce à la présence de la protéine GFP. Selon leur étude, ce processus aurait permis de rétablir la fertilité des souris (Lee *et al.* 2007). Toutefois, Lee et collègues (2007) n'ont pas vérifié que le traitement de chimiothérapie avait éliminé la totalité des follicules primordiaux. De plus, l'ensemble des souriceaux provenait de la fécondation d'ovocytes de la souris receveuses, ce qui ne soutient pas la théorie du renouvellement des ovocytes par la souris donneuse. Bien que les ovaires des souris receveuses possédaient des ovocytes provenant des souris donneuses, aucuns des follicules observées ne dépassaient le stade de follicule préantral. Les résultats présentés suggèrent plutôt que des ovocytes provenant d'un individu de même espèce pourraient être transmis sans pour autant donné naissance à une progéniture. En se basant sur leur point de vue, la ménopause ne serait plus la conséquence d'un manque d'ovocyte mais probablement d'un déficit de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique pour favoriser le développement du

follicule. Bien que leurs résultats et hypothèse soient intéressants, les preuves fournies ne soutiennent pas vraisemblablement cette dernière. L'immense controverse que cela a suscité dans la communauté scientifique est proportionnel à l'importance de ce dogme pour la reproduction puisque qu'il engendrerait la remise en question de nombreuses théories et études (Byskov *et al.* 2005; Eggan *et al.* 2006; Gosden, 2004; Gougeon, 2005; Greenfeld & Flaws, 2004; Telfer *et al.* 2005). Des études supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer ou réfuter les découvertes de l'équipe du Dr Tilly. Pour l'instant, on considère le nombre de follicules primordiaux comme non renouvelable.

2.1.2. La folliculogenèse

La folliculogenèse est le processus au cours duquel le follicule ovarien subit sa maturation conjointement à l'ovogenèse (fig. 2 et 4). Les différents stades folliculaires témoignent de l'activation de différents gènes impliqués dans la production d'hormones sexuelles telles que l'œstradiol et la progestérone.

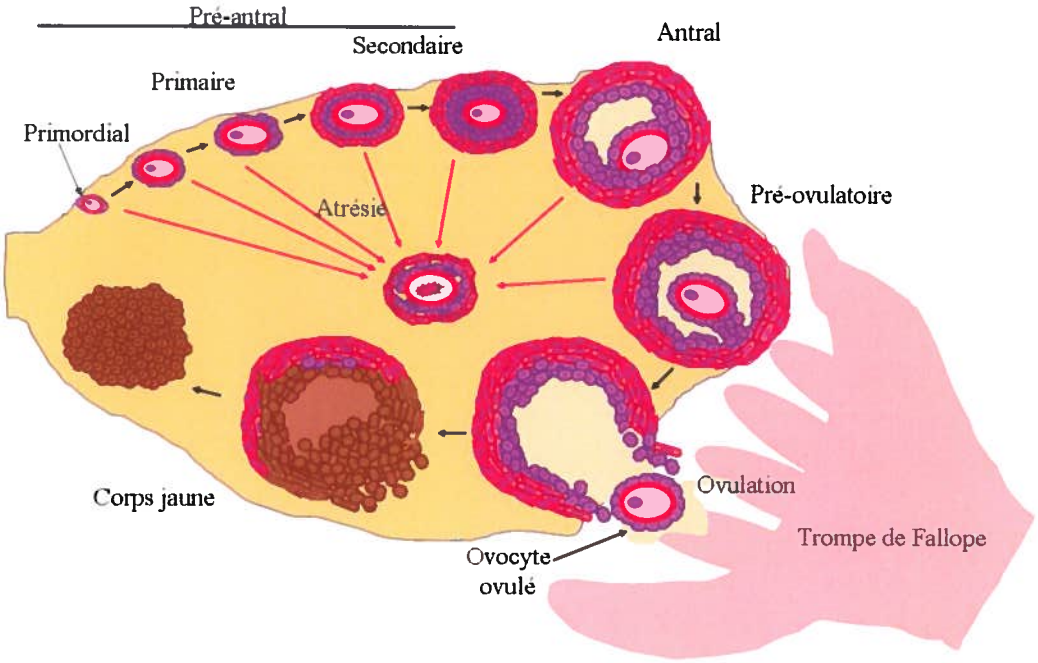

Figure 4: Illustration de la folliculogenèse. Le premier stade de la folliculogenèse est le follicule primordial qui une fois activée va évoluer en follicule primaire, secondaire et antral. Une fois que le follicule pré-ovulatoire a expulsé l'ovocyte, le follicule se referme et se transforme en corps jaune. L'atrésie qui correspond à la mort folliculaire peut affecter les follicules primordiaux à antraux. Le processus d'atrésie est représenté par les flèches rouges (Adapté de Hoyer & Devine, 2004 par SK Petrillo).

Le stade le plus précoce de la folliculogenèse est le follicule primordial (fig. 4). C'est également la forme de réserve des follicules ovariens. Ils sont présents au niveau du cortex ovarien. La *membrane de Slavjanski* (une membrane basale) les sépare du stroma ovarien (Weakley, 1966). Le follicule primordial est composé d'un ovocyte et d'une couche de cellules folliculaires aplaties (cellules pré-granulosa). Ils sont présents à partir du 3e mois de gestation chez l'humain et dans les jours qui suivent la naissance chez les rongeurs (Encha-Razavi & Escudier, 2003 ; Fortune, 2003). Le nombre de follicules primordiaux est établi au 7e mois de gestation (7 millions d'ovocytes I) chez la femme tandis qu'il l'est 4 à 5 jours après la naissance chez les rongeurs (Encha-Razavi & Escudier, 2003; Mandl & Zuckerman, 1951; Fortune, 2003; Hirshfield, 1991; McGee & Hsueh, 2000). D'un million à la naissance, on en dénombre environ 400 000 à la puberté (perte de ~ 60%) et seules 400 à 500 de ces follicules ovuleront chez l'humain (Hirshfield, 1991; Encha-Razavi & Escudier, 2003). Tous les ovocytes ovulés proviennent de follicules qui ont débuté au stade de follicule primordial. Etant donné que les follicules primordiaux sont en nombre limité, ils sont le stade folliculaire le plus important pour la fertilité à long terme (Fortune *et al.* 2000; Hirshfield, 1991; McGee & Hsueh, 2000). La reprise de la méiose dans l'ovocyte I (stade diplotène-prophase I) reflète l'activation du follicule primordial (décrit ci-dessous).

a) Le follicule primordial et son activation

Le follicule primordial présente peu d'activité métabolique (Fortune, 2003; Hirshfield, 1991). Son activation se manifeste par un accroissement du volume ovocytaire et par le passage des cellules folliculaires, auparavant de formes aplaties, en cellules cuboïdes (Hirshfield, 1991; Hirshfield & Schmidt, 1989; Skinner, 2005; van den Hurk & Zhao, 2005). Cette activation s'effectue sous l'effet de facteurs autocrines et paracrines majoritairement inconnus aujourd'hui (figure 5). Ce processus est irréversible (Hirshfield, 1991; Fortune *et al.* 2000; Fortune, 2003). Il a été démontré dans le cadre de systèmes d'études in vitro et in vivo l'implication de divers facteurs de transcription tels que le facteur *Kit ligand* (KL), le *factor in the germ line* α (FIGα); le *basic fibroblast growth factor* (bFGF), le *leukemia inhibitory factor* (LIF), le *keratinocyte growth factor* (KGF) et le *bone morphogenic protein 4* (BMP-4) dans la transition des follicules primordiaux en follicules primaires (Simpson & Rajkovic, 1999; Fortune, 2003; Kezele *et al.* 2002; Skinner, 2005).

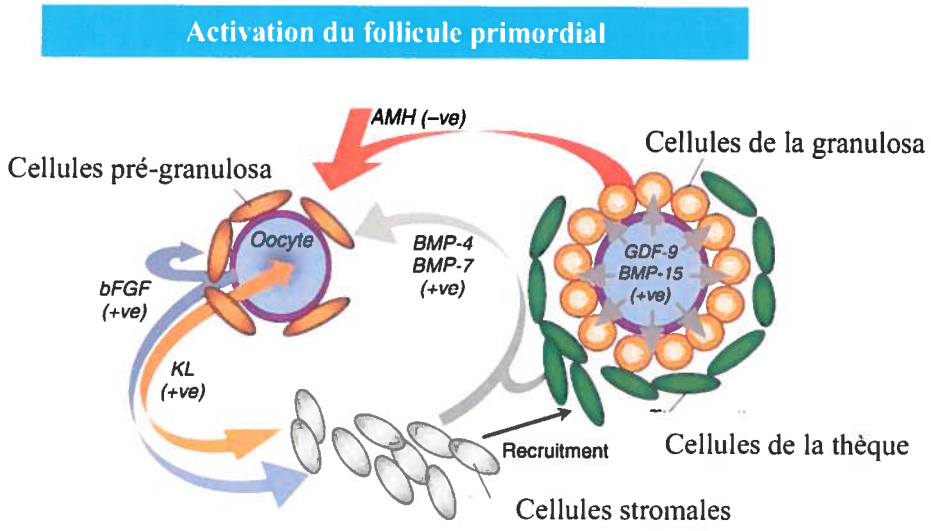

Figure 5: L'activation du follicule primordial. L'interaction de l'ovocyte avec les cellules avoisinantes induisent la production de différents stimulateur (+ve) ou inhibiteur (-ve) de l'activateur du follicule primordial. Les cellules pré-granulosa produisent le facteur kit ligant (KL) qui stimulent l'ovocyte et favorisent le recrutement des cellules stromales. L'ovocyte lui produit le basic fibroblast growth factor (bFGF) qui stimule de manière autocrine l'ovocyte. Les cellules stromales et de la thèque sécrètent le BMP-4 et BMP-7 qui favorise l'activation du follicule et sa survie. L'ovocyte des follicules primaires produisent les facteurs GDF-9 et BMP-15 qui stimulent la prolifération des cellules pré-granulosa. L'AMH produit par les follicules en croissance inhibe le recrutement des follicules. Tiré de Knight & Glister, 2006.

Dans l'ovaire, les facteurs KL et LIF sont produits par les cellules de la granulosa et semble promouvoir la croissance des ovocytes qui possèdent les récepteurs de KL (*c-kit tyrosine kinase receptor*), et la prolifération des cellules de la granulosa (Parrott & Skinner, 1999; Skinner, 2005). Le bFGF et le *tumor necrosis factor-α* (TNF-α) sont quant à eux produits par l'ovocyte pour stimuler le développement des follicules primordiaux (Skinner, 2005). La communication bidirectionnelle entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa est importante (fig. 5). L'ovocyte sécrète des différents facteurs, qui n'ont pour l'instant pas été clairement identifiés, qui stimule la sécrétion de KL par les cellules de la granulosa (Joyce *et al.* 1999). La croissance de l'ovocyte va être stimulée à son tour par la liaison de KL sur son récepteur *c-kit* présent sur l'ovocyte (Packer *et al.* 1994). Une fois que l'ovocyte a atteint sa taille optimale au sein des follicules antraux, il cesse de produire les facteurs qui promeuvent la sécrétion de KL par les cellules de granulosa (Joyce *et al.* 1999). La fixation de KL sur son récepteur présent au niveau de l'ovocyte entraîne l'activation de la voie de signalisation de la phosphatidylinositol 3-kinase

(PI3K)-Akt (Reddy *et al.* 2005). L'activation de cette voie aboutit, entre autres, à l'activation du *forkhead transcription factor* Foxo3. L'absence de Foxo3 chez des souris (Foxo3KO) entraîne une activation rapide des follicules primordiaux qui se résulte par la survenue d'une ménopause précoce et une infertilité (Castrillon *et al.* 2003; Hosaka *et al.* 2004). Cela suggère que Foxo3 agirait comme un inhibiteur de l'activation des follicules primordiaux (Castrillon *et al.* 2003; John *et al.* 2008). Le développement rapide des follicules primordiaux chez des souris déficientes en PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*) suggère un rôle d'inhibiteur pour PTEN dans l'activation des follicules primordiaux (Reddy *et al.* 2008). L'absence de Foxo3 ou de PTEN ont la même conséquence : l'activation prématurée du pool de follicules primordiaux. Le rôle précis de PTEN dans l'inhibition de l'activation du follicule primordial est méconnu mais il interviendrait via la voie de signalisation de la PI3K spécifiquement pour ce stade folliculaire (Jagarlamudi *et al.* 2009). Sur le plan hormonal, seule l'hormone anti-Müllerienne (AMH) semble inhiber l'activation des follicules primordiaux (Durlinger *et al.* 2002; Durlinger *et al.* 2001; Durlinger *et al.* 1999; Gruijters *et al.* 2003; Salmon *et al.* 2004; Visser & Themmen, 2005). De plus, elle réduirait la sensibilité des follicules en croissance à la FSH (Durlinger *et al.* 2001; Durlinger *et al.* 2002; Visser & Themmen, 2005). Cela suggère que l'AMH serait impliquée dans la régulation de la folliculogenèse à différentes étapes : la transition du follicule primordial vers le follicule primaire et la sélection des follicules secondaires pour la poursuite de la maturation.

b) Les follicules en croissance

On peut différencier trois catégories de follicules en croissance qui sont le reflet de caractéristiques moléculaires distinctifs:

- les follicules primaires
- les follicules secondaires
- les follicules antraux

Le follicule primaire est constitué d'un ovocyte entouré d'une couche de cellules folliculaires cubiques (Fortune *et al.* 2000). La membrane de Slavjanski ou membrane externe le sépare encore du stroma ovarien. Dépourvu de récepteurs aux gonadotrophines, sa croissance s'effectue sous le contrôle de facteurs paracrines tel que l'EGF (*epidermal growth factor*), le GDF-9 (*growth differentiation factor-9*) et le BMP-15 (*Bone morphogenic protein-15*). L'exposition de

tissus ovariens au GDF-9 dans le cadre d'un système *in vitro* a permis de démontrer que le GDF-9 promouvait la croissance des follicules primaires chez les rongeurs (Hayashi *et al.* 1999; Nilsson & Skinner, 2002 ; Nilsson & Skinner, 2003) comme chez l'humain (Hreinsson *et al.* 2002). Cette implication est confirmée par des expositions au GDF-9 *in vivo* chez la ratte néonatale (Vitt *et al.* 2000). Le BMP-15 promeut la prolifération des cellules de la granulosa via la voie de signalisation de c-kit (Otsuka *et al.* 2000 ; Otsuka & Shimasaki, 2002). La prolifération des cellules de granulosa est très lente dans les premiers stades de la folliculogenèse. Chez l'humain, le passage de follicule primaire à follicule secondaire peut prendre jusqu'à 4 mois (Gougeon, 1996).

Au sein des follicules secondaires, l'ovocyte est isolé du reste de l'ovaire par plusieurs assises de cellules de la granulosa cuboïdes. À ce stade, les cellules de granulosa établissent des jonctions communicantes (*gap junction*) entre elles et également avec l'ovocyte (Anderson & Albertini, 1976; Kidder & Mhawi, 2002). Ces jonctions permettent le transit de petites molécules entre l'ovocyte et les cellules de granulosa, qui sont impliquées dans la synthèse de macromolécules (Anderson & Albertini, 1976). Entre l'ovocyte et ses cellules avoisinantes, on observe l'apparition de la *zone pellucide,* une matrice extracellulaire semi-perméable produite par l'ovocyte. La zone pellucide est indispensable à la fécondation puisqu'elle est composée de glycoprotéines sulfatées (ZP1, ZP2, ZP3) qui sont essentielles pour l'adhésion des spermatozoïdes et la réaction acrosomique (revue dans Encha-Razavi & Escudier, 2003). Du fait de la présence de l'ovocyte, la production de progestérone par les cellules de la granulosa est inhibée ainsi qu'une différenciation prématurée en cellules lutéales (Vanderhyden *et al.* 2003). La membrane de Slavjansky ou membrane basale est au stade de follicules secondaires bordée de cellules de la thèque interne et externe (Hirshfield, 1991; McGee & Hsueh, 2000; Fortune *et al.* 2000). Les cellules de la thèque interne sont vascularisées et communiquent entre elles via des jonctions communicantes. Ce type cellulaire est très important pour la production et sécrétion d'hormones folliculaires. Au sein des follicules dont le diamètre est supérieur à 200µm (grand follicule secondaire), les cellules de thèque interne transforment le cholestérol en androstenedione et/ou testostérone. Ces derniers sont à leur tour convertit en œstradiol par les cellules de la granulosa. La production d'androstenedione et/ou testostérone s'effectue sous le stimulus de l'hormone lutéinisante (LH) dont le récepteur est présent sur les cellules de la thèque

(voir section 2.2. et fig.7). Bien qu'elles ne possèdent pas de récepteurs pour la LH à ce stade de développement, les cellules de la granulosa possèdent des récepteurs à l'hormone folliculo-stimulante (FSH). Dès lors, la croissance des follicules secondaires incluant la production de stéroïdes pourra être régulée par la FSH.

Les follicules antraux se caractérisent par la présence d'un espace ou antrum entre les cellules de la granulosa. Ce sont les sécrétions des cellules de la granulosa (ex: œstrogènes) qui composent l'antrum. Les cellules de la granulosa des plus grands follicules antraux vont synthétiser les récepteurs à la LH. Par conséquent, l'apparition de ce récepteur est le fruit d'un processus FSH-dépendant. La croissance des follicules antraux et la maturation de l'ovocyte dépendent de plusieurs facteurs de croissance tels que le *vascular endothelial growth factor* (VEGF), l'angiotensine II, les *transforming growth factor* (TGF)-α et β, le bFGF et *l'insulin growth factor-I* (IGF-I). Ces facteurs agissent via un mécanisme autocrine et paracrine sur les cellules folliculaires en synergie avec la FSH. La FSH induit la synthèse de ces facteurs de croissance et de stéroïdes par les cellules de la granulosa. L'ovocyte favorise également la stéroïdogenèse par action paracrine. C'est au sein du follicule antral que la méïose I se termine avec l'expulsion du premier globule polaire et que la méïose II s'amorce. La forme la plus mature du follicule est représentée par le follicule ovulatoire ou follicule de De Graaf qui fait saillie à la surface de l'ovaire. L'antrum occupe la quasi-totalité du follicule à ce stade. Chez la femme, l'ovocyte II (maturation de l'ovocyte en même temps que la folliculogenèse) est entouré par la *corona radiata,* couronne de cellules de la granulosa, faisant partie du *cumulus oophorus* (massif cellulaire). Le *cumulus oophorus* se prolonge par des cellules de granulosa qui tapissent l'intérieur du follicule. Une fois l'ovulation effectuée (libération de l'ovocyte II entouré du cumulus oophorus), un remodelage du follicule a lieu (fig. 4). Ce remodelage, plus connu sous le nom de lutéinisation, résulte en la formation du corps jaune, une glande endocrine transitoire. Le corps jaune est constitué de cellules lutéiniques (anciennement cellules de la granulosa et de la thèque) qui assurent la synthèse d'hormone stéroïdiennes (œstradiol et progestérone). La régression du corps jaune (lutéolyse) engendre l'arrêt de la synthèse hormonale, lequel déclenche la menstruation (les règles). Le corps jaune résiduel forme alors le corpus albicans. Le nombre de follicules ovariens, primordiaux à antraux, disponibles à évoluer en follicule dominant et en santé, quelques soit l'âge constitue la réserve ovarienne.

La majorité des follicules ovariens, des follicules primordiaux à antraux, vont être éliminés via le phénomène d'atrésie. L'atrésie permet d'éliminer les follicules dans un processus de sélection (Hirshfield, 1991; McGee & Hsueh, 2000; Fortune *et al.* 2000). Lorsqu'il s'agit de follicules en croissance cette régression serait dû, selon certaines publications, à une stimulation insuffisante du follicule par la FSH et la LH (Pedersen & Peters, 1968; Peters, 1969; Hirshfield, 1991). Le processus d'atrésie serait amorcé avec l'entrée en apoptose des cellules de la granulosa (Hsueh *et al.* 1996; Kaipia & Hsueh, 1997; Hussein, 2005). À l'heure actuelle, on dispose de peu d'informations sur les mécanismes précis qui déclenchent l'atrésie folliculaire. Les études portant sur l'atrésie ont principalement lieu sur des cellules de la granulosa provenant de follicules antraux. Les résultats obtenus dans le cadre de ces études ne sont donc pas automatiquement applicables aux follicules primordiaux et primaires, puisque ceux-ci présentent des différences notables avec les follicules antraux tels que l'absence de récepteurs pour la LH et la FSH. En outre, il a été démontré que les follicules primordiaux et primaires, ne présentent pas certains marqueurs de la voie apoptotique tels que la fragmentation de l'ADN et l'activation de la caspase-3 (Van Blerkom & Davis, 1998 ; Glamoclija *et al.* 2005). Une récente étude a suggéré que ce ne serait pas ni la voie apoptotique de l'atrésie ni la nécrose qui serait impliquée dans la mort des petits follicules mais plutôt une voie non apoptique (Tingen *et al.* 2009). Au niveau des ovocytes, il a été démontré une augmentation de l'activité de la caspase-3 au sein d'ovocyte ovulé (Perez *et al.* 1999). Devine et collègues (2000) ont suggéré que la mort de l'ovocyte ne serait imputable ni à la nécrose ni à l'apoptose mais à un autre type de mort cellulaire (Devine *et al.* 2000 ; Perez *et al.* 2005). Dans tous les cas, les informations concernant la mort cellulaire des ovocytes sont incomplètes (Hussein, 2005 ; Escobar *et al.* 2008). Après la ménopause, les ovaires ne contiennent en majorité que des reliquats de follicules qui ont régressé.

La folliculogenèse est un processus discontinu chez l'humain dans lequel est géré le stock d'ovocytes formés au cours de la vie fœtale. L'aspect discontinu vient du fait que jusqu'à la puberté aucun follicule ne pourra dépasser le stade de follicule secondaire. Il existe deux étapes clés au cours de la folliculogenèse: le recrutement des follicules primordiaux et la sélection des follicules pré-antraux qui aboutira à l'ovulation exceptionnellement. La sélection des follicules pré-antraux est grandement influencée par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

2.2 Le cycle ovarien : implication de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique

La régulation de la folliculogenèse est régit par plusieurs hormones et molécules de natures et fonctions diverses qui interviennent localement telles que les cytokines, les facteurs de croissance, des molécules d'adhérence et des protéines de choc thermique (Hirshfield, 1991 ; revue dans Bulun & Adashi, 2007). Trois catégories d'hormones sont très importantes dans la régulation de la folliculogenèse: les gonadotrophines, les stéroïdes et les hormones peptidiques (figure 6). Les cellules gonadotropes de l'hypothalamus sécrètent l'hormone gonadolibérine (GnRH) qui stimulent la synthèse et sécrétion de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et de l'hormone lutéinisante (LH) au niveau de l'adénohypophyse, le lobe antérieur de l'hypophyse (Hirshfield, 1991 ; Fortune, 2003).

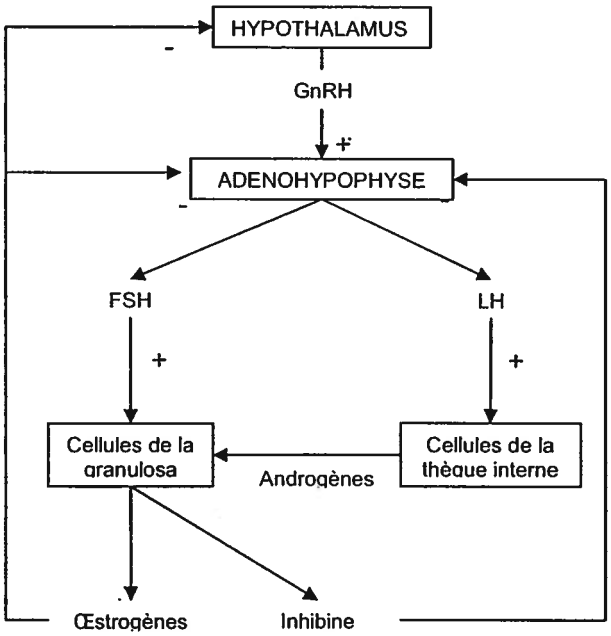

Figure 6: L'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. Sous stimulation de GnRH, sécrétée par l'hypothalamus, l'adénohypophyse va sécréter la FSH et la LH. Ces deux hormones vont favoriser, au niveau de l'ovaire la production d'œstrogènes (essentiellement de l'œstradiol), de progestogène et d'hormones peptidiques (ex: inhibine B) par les follicules ovariens. La FSH et LH sont indispensables à la croissance et maturation folliculaire. L'œstradiol, la progestérone et l'inhibine B produits au niveau de l'ovaire par les stimuli hypophysaire vont inhiber la production de GnRH, FSH et LH dans le cadre d'un rétrocontrôle négatif.

La fixation de la FSH sur son récepteur présent sur les cellules de la granulosa des follicules secondaires à antraux induit un signal intracellulaire dans lequel le *steroidogenic factor-1* (SF-1,

un membre de la famille des *récepteurs nucléaires orphelins*) est le facteur de transcription clé qui initie l'expression de plusieurs gènes stéroïdogéniques dont le gène de l'aromatase (CYP19) de la famille des cytochromes P450 (Cooke, 1999). L'aromatase est l'une des enzymes indispensable à la synthèse d'œstradiol dans les cellules de la granulosa. Elle permet la conversion de l'androstenedione produite par les cellules de la thèque interne en œstradiol dans les cellules de la granulosa des follicules secondaires à antraux. La production d'androstenedione par les cellules de la thèque interne et de la thèque lutéinisées est stimulée par la fixation de la LH sur son récepteur (présent sur ces cellules). Cette synthèse s'effectue à partir du cholestérol (fig. 7).

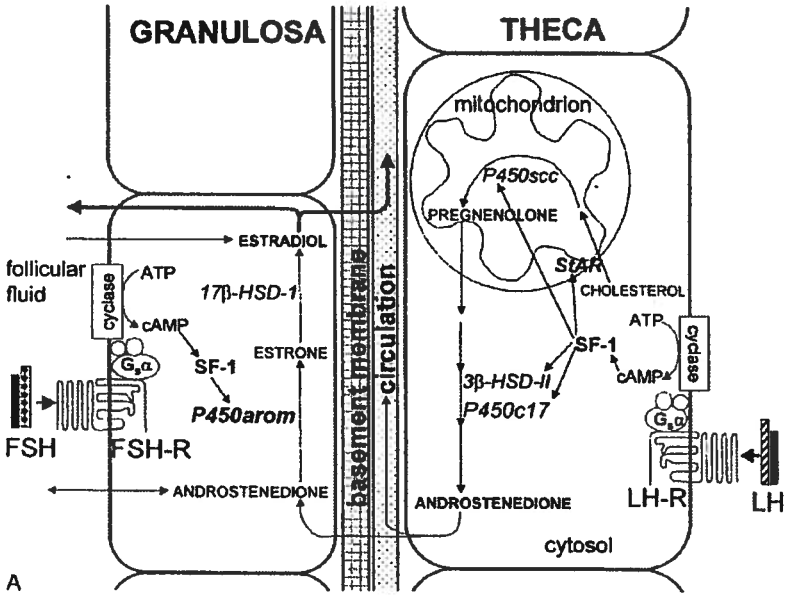

Figure 7: Production de stéroïdes par les cellules de la granulosa des follicules secondaires à antraux. La fixation de la LH sur son récepteur entraîne l'activation du facteur SF-1 et d'une cascade de signalisation impliquant le facteur StAR. L'entrée du cholestérol dans la mitochondrie permet sa conversion en androstenedione par des enzymes de la famille de cytochrome p450 dans les cellules de la thèque. L'androstenedione libérée sera captée par les cellules de la granulosa et/ou convertie en œstradiol. L'œstradiol sera sécrété dans la circulation sanguine et dans le fluide folliculaire. La fixation de la FSH sur son récepteur au niveau des cellules de la granulosa va permettre l'activation du facteur SF-1 et des aromatases nécessaires à la conversion de l'œstradiol. Source : *William textbook of Endocrinology*, 11e édition.

Dans le corps jaune, les cellules de granulosa lutéinisées possèdent les récepteurs de la LH et de la FSH tandis que les cellules de la thèque lutéinisées possèdent les récepteurs de la LH uniquement (fig. 8). La fixation de la LH et de la FSH sur leur récepteur respectif entraîne

l'activation d'une cascade de signalisation où les facteurs SF-1 et StAR vont favoriser la production d'androstenedione, d'œstradiol et de progestérone. Le facteur SF-1 favorise ou inhibe la synthèse de plusieurs enzymes de la stéroïdogenèse tels que le facteur StAR et l'aromatase. La présence de l'aromatase dans les cellules de la granulosa lutéinisées (corpus luteum) a été démontrée par immunolocalisation dans l'ovaire humain (Sasano *et al.* 1989). StAR stimule l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie, le cholestérol étant indispensable à la production de l'androstenedione et de la progestérone (revue dans Stocco, 2000; Strauss *et al.* 1999). La progestérone et l'œstradiol produits seront toutes deux libérés dans la circulation sanguine.

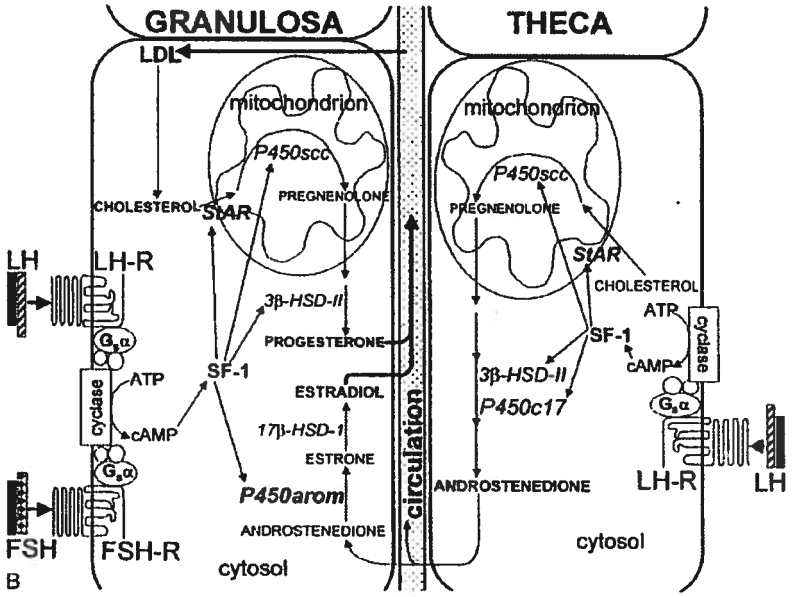

Figure 8: Production de stéroïdes par les cellules du corps jaune. La fixation de la LH sur son récepteur entraîne l'activation du facteur SF-1 et d'une cascade de signalisation impliquant le facteur StAR chez les cellules de la thèque et granulosa lutéinisées. L'entrée du cholestérol dans la mitochondrie permet sa conversion en androstenedione par des enzymes de la famille de cytochrome p450 dans les cellules lutéales. L'androstenedione produit convertie en œstradiol et progestérone qui seront sécrétés dans la circulation sanguine. La fixation de la FSH sur son récepteur au niveau des cellules granulosa lutéinisées va favoriser le processus en induisant l'activation du facteur SF-1, StAR, des aromatases nécessaires à la conversion de l'œstradiol. Source : *William textbook of Endocrinology*, 11e édition.

À partir de la puberté, les taux des différentes hormones citées précédemment vont varier définissant ainsi un cycle hormonal (fig. 9). Chez la femme, le cycle hormonal dure en moyenne

28 jours d'où l'appellation de cycle menstruel tandis qu'il se déroule sur 4 jours chez la souris (Hirshfield, 1991 ; Faddy & Gosden, 1996). Chez la femme, il existe deux phases de 14 jours au cours du cycle menstruel: la phase folliculaire et la phase lutéale. La phase folliculaire correspond au temps nécessaire à la maturation d'un follicule sélectionné par la FSH jusqu'au stade de follicule pré-ovulatoire (Santen & Paulsen, 1973).

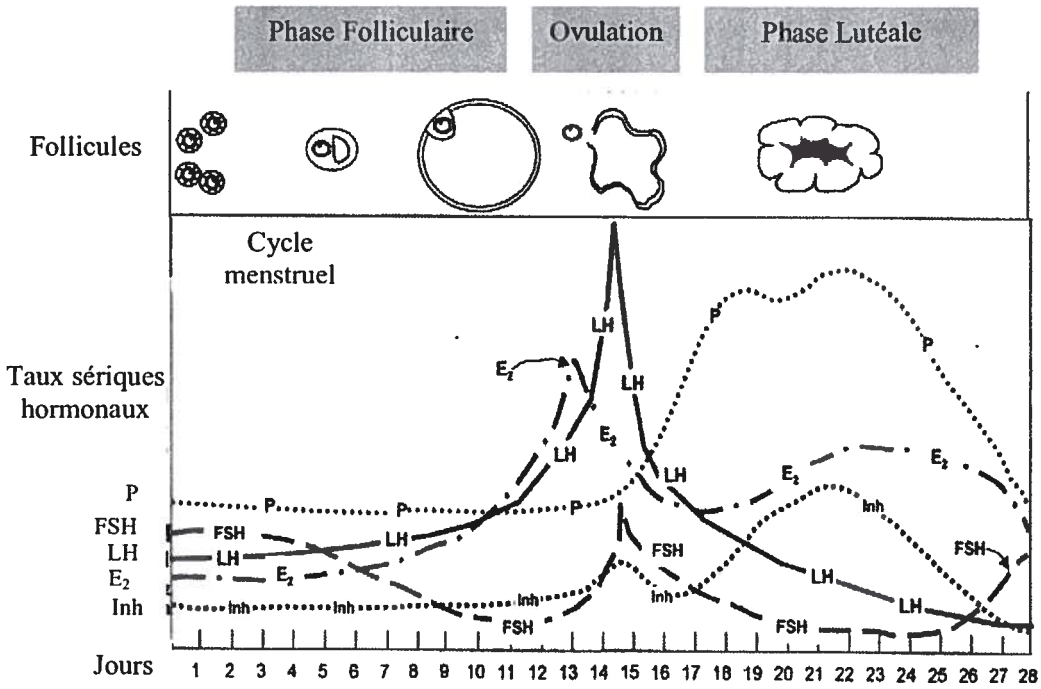

Figure 9: Le cycle menstruel chez la femme. Le cycle menstruel se divise en deux phases : la phase folliculaire (0 à 14 jours) et la phase lutéale (14 à 28 jours) séparé par l'ovulation. Durant la phase folliculaire, la FSH produite par l'hypophyse, va stimuler la croissance des follicules secondaires à antraux. Les follicules qui maturent, produisent des hormones tels que l'E_2, la progestérone (P) et des inhibines (Inh). Le pic de LH produit par l'hypophyse va induire l'ovulation et promouvoir la différenciation du follicule ovulé en corps jaune. Le corps jaune va sécréter de la progestérone et de l'E_2 jusqu'à sa dégénérescence. Source : *William textbook of Endocrinology*, 11e édition.

La phase folliculaire débute à partir du premier jour des règles. Elle se caractérise par la sélection et maturation de follicules. L'élévation progressive du taux d'œstrogènes reflète la maturation folliculaire. Le taux d'œstrogène augmente progressivement jusqu'à atteindre un pic au 13e jour du cycle (fig. 9). Après l'ovulation au 14e jour du cycle, le taux d'œstrogène chute à cause du remodelage du follicule en corps jaune. Suite à l'ovulation et au remodelage du follicule ovulé en

corps jaune, il y aura production de progestérone en grande quantité durant la moitié du cycle lutéale grâce à la stimulation de la LH. La production de progestérone par les cellules du corps jaune va diminuer durant la seconde moitié de la phase lutéale car les cellules lutéales expriment de moins en moins de récepteurs à la LH.

La variation des taux d'œstrogènes et de progestérone dépend des taux de FSH et de LH. Au cours de la première semaine du cycle, le taux de FSH va augmenter progressivement stimulant ainsi la synthèse et sécrétion d'œstrogènes (fig. 9). Du fait du rétrocontrôle exercé par les œstrogènes sur l'hypothalamus et l'hypophyse, il y a une légère diminution du taux de FSH au cours de la deuxième semaine pour finir par croître rapidement juste avant l'ovulation. Durant la phase progestative, le taux de FSH va diminuer graduellement (fig. 9). La sécrétion de LH et de GnRH s'effectue de façon pulsatile (toutes les 90 minutes) durant la phase folliculaire. Le taux de LH va rester stable durant la phase folliculaire mais va augmenter de façon considérable 36 heures avant l'ovulation qu'il déclenche.

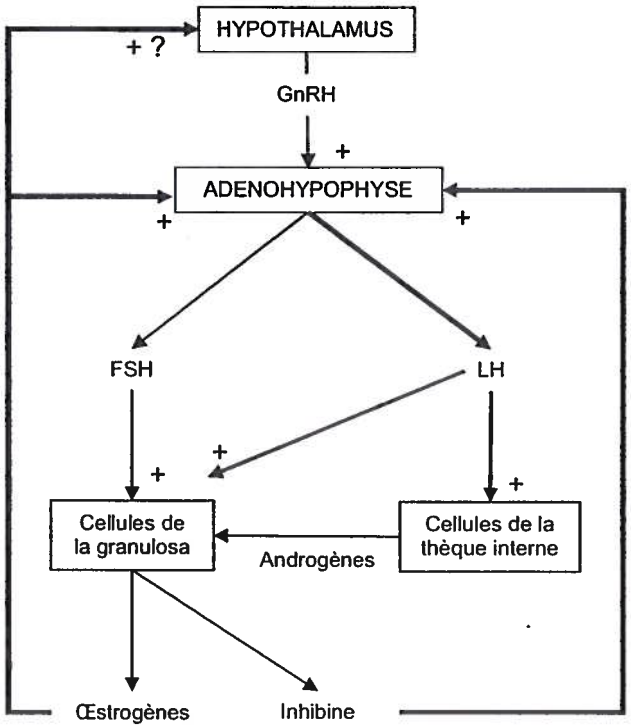

Figure 10: Régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique lors de l'ovulation. La forte concentration d'œstrogènes produits par le follicule pré-ovulatoire va stimuler la production de LH par l'hypophyse. Le pic de LH induit la ponte ovulatoire (ovulation) du follicule.

La période qui précède l'ovulation est particulière. Les cellules de la granulosa du follicule dominant commencent à exprimer les récepteurs à la LH et sécrètent de grandes quantités d'œstrogènes (fig. 10). La forte concentration d'œstrogènes engendre 48h plus tard une inversion des effets des œstrogènes sur l'hypophyse (rétrocontrôle positif). Cette inversion engendre une stimulation de l'adénohypophyse qui produit de la FSH et LH de façon considérable (pics). Au cours de la phase lutéale, la fréquence des décharges de la LH vont diminuer pour s'effectuer toutes les 8 à 12h (fin de phase lutéale). Les cellules du corps jaune (cellules lutéales) vont produire de la progestérone et de l'inhibine qui effectuent un rétrocontrôle négatif sur la production de LH. Le cycle menstruel est rompu à la ménopause lorsque le nombre de follicules atteints un seuil critique insuffisant pour maintenir l'axe adénohypophyso-gonadique.

2.3 La ménopause

La ménopause correspond à l'arrêt des fonctions ovariennes et des cycles menstruels. L'irrégularité des cycles menstruels et la modification des règles témoignent de la réduction des sécrétions ovariennes (diminution de la production d'œstrogènes). Les follicules primordiaux sont en quantité limités, non renouvelable chez la femme comme chez les rongeurs. Par conséquent, la réserve ovarienne subit, au cours de la vie, un déclin constant jusqu'à atteindre un nombre de follicules critique (~1000) dans l'ovaire (fig.11). Cette période marque le début de la ménopause qui se traduit par des modifications hormonales majeures. Les changements hormonaux qu'engendre la ménopause ont de nombreuses répercussions chez la femme telle que les bouffées de chaleur et la prise de poids (Umland, 2008). De plus, il existe des problèmes médicaux qui apparaissent avec la ménopause dû à un manque d'œstrogènes tels que l'ostéoporose (Pouilles *et al.* 1994; Vega *et al.* 1994), la survenue de maladies cardio-vasculaires (Antonicelli *et al.* 2008; de Kleijn *et al.* 2002a; de Kleijn *et al.* 2002b) ainsi que le développement de cancers. Des substituts hormonaux sont employés afin de contrecarrer les effets de la ménopause, mais leur bénéfice est controversé puisque ces derniers favoriseraient le développement de certains cancers (Hodis & Mack, 2008; Rohan *et al.* 2008; Shumaker *et al.* 2003; Utian *et al.* 2008).

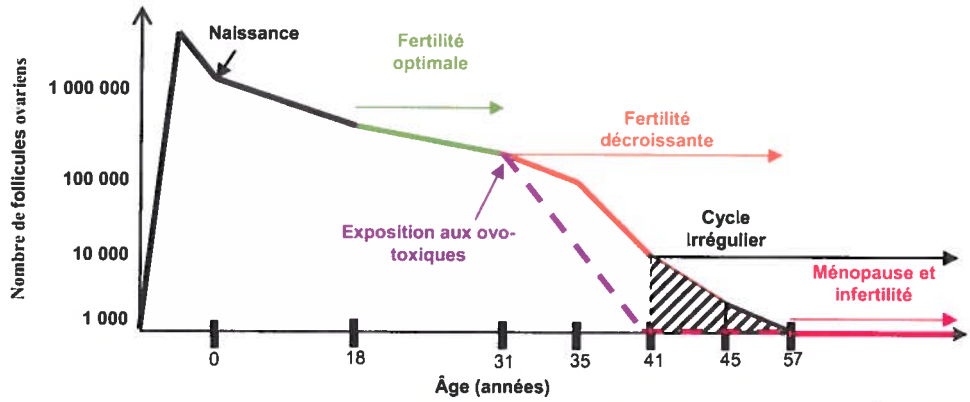

Figure 11: Le déclin du nombre de follicules avec l'âge chez la femme. À partir de la naissance, le nombre de follicules ovariens primordiaux va décroître rapidement avec l'âge pour atteindre un seuil critique autour de la cinquantaine (~1000). Ce seuil critique est associé à une infertilité permanente. L'exposition aux ovo-toxiques peut accélérer ce phénomène et aboutir à une ménopause et infertilité précoce (ligne violet). Inspiré de Faddy *et al.* (1992).

Bien que la ménopause soit un processus physiologique normal sa survenue peut être accélérée. Plusieurs événements peuvent conduire à une ménopause précoce : l'exposition à des produits

ovo-toxiques (connus et inconnus), la chimiothérapie (Sklar *et al.* 2006) et la consommation de cigarettes (Baird *et al.* 2005; Jick & Porter, 1977; Kinney *et al.* 2007;Mikkelsen *et al.* 2007). Des souris exposées à des concentrations de fumée de cigarette représentatives des expositions humaines ont présenté une perte significative de follicules primordiaux (Tuttle *et al.* 2009). Le benzo[a]pyrène (BaP) est un composé présent dans la fumée de cigarette qui induit la mort des follicules primordiaux de manières spécifiques (Mattison & Nightingale, 1982; Mattison *et al.* 1980). Les follicules primordiaux sont responsables de la fertilité à long terme. Une perte prématurée des follicules primordiaux entraîne la survenue d'une ménopause précoce. La prédisposition génétique est un autre facteur important dans la survenue d'une ménopause précoce qui est peu connue actuellement (Pal & Santoro, 2002). Le facteur clé dans la survenue de la ménopause est sans nul doute le nombre de follicules présents dans l'ovaire. L'estimation de la réserve ovarienne (des follicules primordiaux aux follicules antraux) est un challenge qui n'est pas entièrement résolu dans le cadre de la biologie de la reproduction. Devant l'amélioration des taux de survie aux cancers infantiles, l'estimation de la réserve ovarienne et plus spécialement du nombre de follicules primordiaux devient incontournable. En effet, la majorité des traitements chimio thérapeutiques (90%) contiennent des substances ovotoxiques qui induisent la mort des follicules primordiaux tel que le cyclophosphamide (Koyama *et al.* 1977; Warne *et al.* 1973; Colvin, 1999; Hoyer, 2005; Meirow *et al.* 1999; Meirow & Nugent, 2001; Plowchalk & Mattison, 1991). Ce phénomène a pour conséquence dans la plupart des cas l'apparition d'une ménopause précoce (Chemaitilly *et al.* 2006; Chiarelli *et al.* 1999; Thomson *et al.* 2002). Outre la chimiothérapie, des expositions environnementales peuvent induire une diminution accrue du nombre de follicules engendrant potentiellement une diminution prématurée de la fertilité (Sharara *et al.* 1998; Uzumcu et al. 2006). Le problème majeur à l'heure actuelle est d'estimer de manière simple, rapide et fiable la taille de la réserve ovarienne et particulièrement le nombre de follicules primordiaux. Cette nécessité est accentuée dans les pays occidentaux où il existe un phénomène sociétal qui induit un recul de l'âge auquel les femmes ont leur premier enfant (Leridon, 1998).

3. Estimation de la réserve ovarienne

Au cours des 20 dernières années plusieurs techniques ont été et sont employées afin de déterminer la taille de la réserve ovarienne telle que la biopsie ovarienne, le compte des follicules

antraux (AFC) et les dosages hormonaux. Ces techniques sont plus ou moins utilisées de concert afin de déterminer la taille de la réserve ovarienne en follicules en fin de folliculogenèse (secondaires à antraux). La plupart du temps, l'estimation de la réserve ovarienne est souhaitée dans le cadre de procédure d'évaluation de la fertilité pour potentiellement entreprendre un programme de fécondation assistée (fécondation in vitro, fécondation in vitro avec transfert d'embryons, etc.). On s'intéresse alors aux stades finaux de la folliculogenèse (follicules antraux et pré-ovulatoire). Par conséquent la technique utilisée doit répondre à l'information recherchée. Dans le cadre de l'évaluation de dommages ovariens affectant la population en follicules primordiaux, il est nécessaire d'avoir un outil donnant accès à une estimation de cette réserve permanente en follicules ovariens. Il existe plusieurs techniques permettant d'évaluer la réserve ovarienne. Ces techniques se basent soit sur une évaluation physique (biopsie ovarienne, compte des follicules antraux) soit sur une évaluation à partir des productions directes ou indirectes des follicules (hormones).

3.1 La biopsie ovarienne : une évaluation de tous les stades folliculaires

La biopsie ovarienne est employée afin d'estimer la réserve ovarienne dans son ensemble (Black, Govan, 1972; Fayez & Jonas, 1976; Motashaw et al. 1977; Steele *et al.* 1970). A l'époque une controverse naissait essentiellement sur la taille de l'échantillon à prélever afin d'avoir une estimation fiable de la réserve ovarienne dans son ensemble (Egger, 1975; Steele *et al.* 1970). Depuis, plusieurs études ont émit des doutes sur le caractère prédictif de la biopsie ovarienne (Sutton, 1974; Smith *et al.* 1991). La biopsie ovarienne est la seule technique qui permet actuellement d'obtenir directement le nombre de follicules primordiaux. Etant donné la répartition inégale des follicules dans l'ovaire, la biopsie ovarienne fournit un résultat peu fiable quant à la taille de la réserve ovarienne lorsque le prélèvement est de petites tailles (Schmidt *et al.* 2003). Ce résultat est confirmé par l'étude de Lambalk et collègues qui démontrent clairement que le nombre de follicules prédits par biopsie ovarienne varie avec l'emplacement du prélèvement mais de plus ne reflète pas le nombre de follicules (primordiaux à antraux) présents dans l'ovaire (Lambalk *et al.* 2004). Cette méthode est de plus très invasive.

3.2 Compte des follicules antraux (AFC) par échographie trans-vaginale

Le compte des follicules antraux est principalement employé dans le cadre de fécondation *in vitro* (FIV) (Elter *et al.* 2005; Hendriks *et al.* 2005). L'AFC comptabilise le nombre de follicules dont

la taille est supérieure à 10 mm de diamètre lors du début de la phase folliculaire. Bien qu'il soit considéré comme étant un bon indicateur de la réserve ovarienne, il ne reflète qu'à court terme la taille de la réserve ovarienne puisqu'il caractérise le nombre de follicules en fin de maturation seulement (Klinkert *et al.* 2005). Toutefois, le nombre de petits follicules antraux semble être lié au nombre de follicules primordiaux (Gougeon *et al.* 1994; Kevenaar *et al.* 2006). Malgré tout le nombre des follicules antraux varie entre les cycles ce qui peut engendrer un résultat variable sur la prédiction à long terme. De récentes études ont établi que l'AFC était utile à la prédiction de l'état de la réserve ovarienne et/ou de la réponse ovarienne à la stimulation (Muttukrishna *et al.* 2005; Nardo *et al.* 2007). Bien que peu invasif, cette technique nécessite tout de même un encadrement et suivi médical. De plus, l'évaluation à long terme de la réserve ovarienne et de la fertilité avec cette technique n'a pas été démontrée pour le moment.

3.3 Dosages hormonaux

Les dosages hormonaux représentent une façon rapide, peu invasive et peu coûteuse d'accéder à l'estimation de la réserve ovarienne. Quatre hormones sont couramment dosées pour évaluer la taille de la réserve ovarienne: l'œstradiol, l'inhibine B, la FSH et l'hormone anti-Müllerienne (AMH). Etant donné que le taux de la FSH dépend des taux d'œstradiol et d'inhibine B, l'interprétation de son dosage peut être complexe (Broekmans *et al.* 1998; Perloe *et al.* 2000; van Rooij *et al.* 2005). Afin d'aider les cliniciens des valeurs de références ont été définies pour permettre l'établissement de diagnostique de fertilité tel qu'effectué pour la FSH et l'AMH (Tableau 1).

Âge (années)	FSH mIU/mL	Âge (années)	AMH (ng/mL)
< 33	< 7.0	≤ 30	≥ 2.1
33-37	< 7.9	31-35	≥ 1.7
38-40	< 8.4	36-40	≥ 1.1
≥ 41	< 8.5	≥ 41	≥ 0.5

Tableau 1: Taux de FSH et d'AMH de références selon les catégories d'âge chez la femme. Source : Mise à jour pour la communauté obstétrique et gynécologique sur les nouveaux tests de fertilité du *Center for human reproduction* (CHR)- site web: http://centerforhumanreprod.com

La FSH est dosée souvent dans le cadre d'une FIV. Elle est quantifiée au 3e jour du cycle menstruel. Au jour 3 du cycle menstruel, le taux de FSH est censé se trouver à son état basal,

(Barnhart & Osheroff, 1998). Les fluctuations du taux de FSH au jour 3 observées entre les cycles peuvent être le reflet du déclin de la réserve ovarienne (Perloe *et al.* 2000).

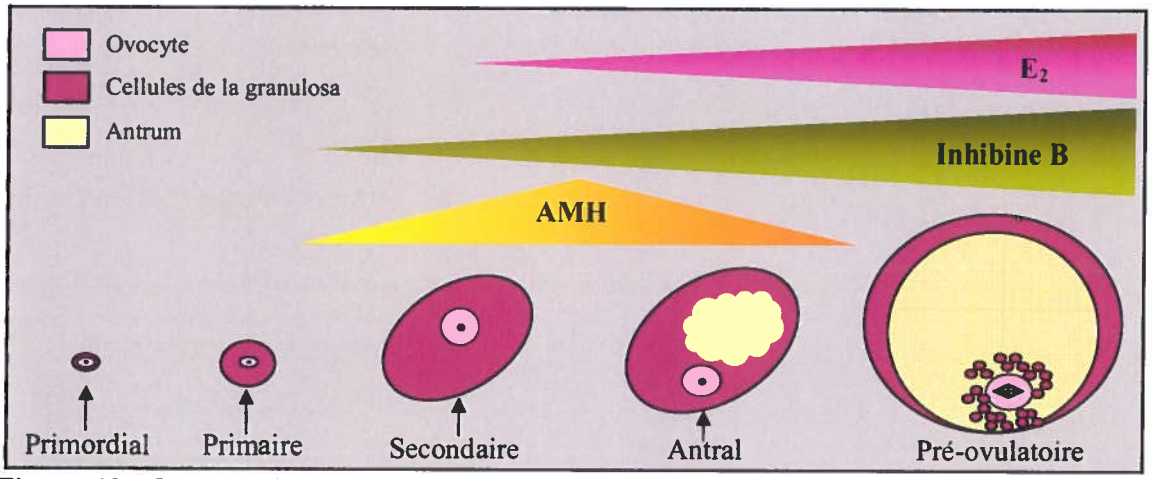

Figure 12: Contributions des différents stades folliculaires à la production hormonale. Aucuns biomarqueurs de la réserve ovarienne testés ne sont produits par les follicules primordiaux. L'AMH est produit par les follicules primaires à antraux mais ce sont les follicules secondaires qui contribuent le plus à sa production. L'inhibine B est produit par les follicules secondaire à pré-ovulatoire avec une forte contribution des follicules antraux. Quant à l'œstradiol il est principalement produit par les follicules pré-ovulatoires même si les follicules secondaires en produisent également.

L'œstradiol est un autre biomarqueur couramment utilisé pour estimer la réserve ovarienne. Toutefois, il est plus le reflet de l'activité folliculaire que le reflet du nombre de follicules ovariens. Dans tous les cas, il n'est jamais dosé seul pour évaluer la réserve ovarienne. Le taux d'œstradiol peut augmenter dans le cadre d'une augmentation de la folliculogenèse ou dans le cadre d'une augmentation du nombre de follicules antraux, même si ces follicules produisent une petite quantité d'œstradiol, tel que observée chez les femmes atteintes par le syndrome des ovaires poly kystiques (Toner, 2003). Ce sont les cellules de la granulosa des follicules pré-ovulatoires qui contribuent le plus à la production d'œstradiol tandis que ce sont les petits follicules antraux qui contribue le plus à la production de l'inhibine B (Hillier *et al.* 1981 ; Burger, 2000; Welt, 2004).

L'inhibine B est une hormone peptidique, membre de la super famille des *transforming growth factor-β* (TGF- β) (Knight & Glister, 2006; Perloe *et al.* 2000). L'inhibine B augmente lors du début de la phase folliculaire avec la croissance des follicules antraux pour finalement diminuer

avant le pic de FSH (Toner, 2003). La variation du taux d'inhibine B est normale puisque l'inhibine B est produite par un stade folliculaire transitoire qui est présent en une certaine quantité durant la phase folliculaire et qui se transforment par la suite en corps jaune en phase lutéale et/ou remplacé par d'autres follicules antraux en croissance. La diminution du nombre de follicules pourrait conduire à la diminution du taux d'inhibine B (Klein *et al.* 1996). On ne dispose pas de suffisamment d'études sur l'inhibine B pour déterminer si elle permet véritablement de prédire la taille de la réserve ovarienne. Elle permettrait toutefois, de prédire le nombre d'ovocytes récupérés chez des patients ayant subi une stimulation ovarienne par des gonadotrophines (Balasch *et al.* 1996; Bancsi *et al.* 2002; Creus *et al.* 2000; Erdem *et al.* 2004; Fabregues *et al.* 2000; Ficicioglu *et al.* 2003; Muttukrishna *et al.* 2005; Penarrubia *et al.* 2000; Seifer *et al.* 1997). Alors, les taux d'inhibine B, d'oestradiol et de la FSH ne donne pas accès à une estimation directe du nombre de follicules primordiaux mais plutôt une estimation par extrapolation en se basant sur le fait que le nombre de follicules en croissance semble être déterminé par le nombre de follicules primordiaux (Hirshfield, 1994).

L'AMH est le plus récent biomarqueur de la réserve ovarienne découvert à ce jour, il fait partit comme l'inhibine B de la superfamille des TGF-β (Josso, Clemente, 2003; Knight & Glister, 2006). Bien que l'AMH soit produite par les cellules de la granulosa des follicules primaires à antraux, ce sont les follicules secondaires à petits antraux qui contribuent le plus à sa production (fig.12 et 13) chez les souris (Durlinger *et al.* 2002) tandis que chez l'humain ce sont les follicules secondaires à antraux de 4-6 mm qui l'expriment le plus (Weenen *et al.* 2004). L'AMH n'est pas produite par les follicules atrétiques ou par les cellules de la thèque (Ueno *et al.*, 1989; Munsterberg & Lovell-Badge, 1991; Hirobe *et al.* 1994). Elle est considérée comme étant le meilleur bio-marqueur de la réserve ovarienne dans son ensemble (Fanchin *et al.* 2003; van Rooij *et al.* 2005; Berin & Teixeira, 2008; Appt *et al.* 2009). Il semblerait que son taux sérique reflète le nombre de follicules chez la femme dans le cadre d'études épidémiologiques (Broekmans *et al.* 2006) et dans le cadre d'études chez les souris (Durlinger *et al.* 2002; Kevenaar *et al.* 2006; Visser *et al.* 2006).

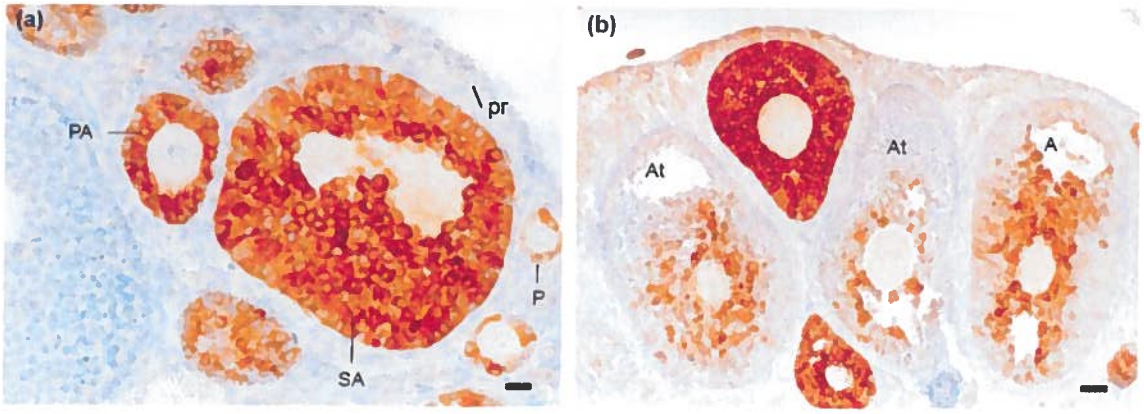

Figure 13: Immuno-histochimie dirigée contre la protéine AMH dans des ovaires de souris. La photo A représente des coupes de tissus colorés au bleu de toluidine sans anticorps primaire. Les photos B montrent des coupes de tissus colorés au bleu de toluidine et incubés avec l'anticorps anti-AMH. Les différents stades folliculaires sont indiqués comme suit: pr= primordial ; P= primaire ; PA= pré-antral ; SA= petit antral; A= antraux. Il n'y a pas d'AMH dans l'ovocyte tandis que les follicules atrétiques (At) cessent de produire de l'AMH. Tiré de Durlinger *et al.* 2002.

L'AMH est le seul bio-marqueur dont le taux sérique serait corrélé au nombre de follicules primordiaux (Kevenaar *et al.* 2006). L'étude menée *in vivo* par Kevenaar et collègues (2006) se base sur le dosage du taux sérique d'AMH chez des souris d'âge croissant dont le nombre de follicules primordiaux et croissants a été déterminé. Ils observaient une diminution du taux d'AMH et du nombre des follicules primordiaux et en croissance avec le vieillissement des souris. Ils ont déterminé l'existence d'une corrélation entre le taux sérique d'AMH et le nombre de follicules primordiaux. A l'heure actuelle, on ne connaît pas les conséquences du vieillissement sur la production d'AMH par les follicules. De plus, la diminution du nombre de follicules en croissance qu'ils observent serait potentiellement responsable de la diminution du taux sérique d'AMH. L'absence de données concernant l'impact du vieillissement sur la production d'AMH et sur la réserve ovarienne suffit à remettre en question cette corrélation. Une étude dans laquelle on induirait directement une diminution des follicules qui ne produisent pas l'AMH (petits follicules), sans que l'âge des souris compte comme un facteur, permettrait de déterminer avec plus de certitudes le lien entre l'AMH et les follicules primordiaux.

Au sein de notre laboratoire, Sahambi et collègues (2008) ont démontré la possibilité d'utiliser le 4-vinylcyclohexène diepoxide pour moduler la population en follicules primordiaux

et primaire afin d'étudier la corrélation entre l'AMH et les follicules primordiaux. Etant donné que les follicules primordiaux ne contribuent pas à la production d'AMH, le taux sérique d'AMH permettrait d'estimer le nombre de follicules primordiaux présents dans l'ovaire indirectement comme les autres biomarqueurs couramment utilisés. Une comparaison des différents biomarqueurs (AMH, FSH, Inhibine B et Œstradiol) est nécessaire pour déterminer leur capacité à estimer le nombre de follicules primordiaux. Le taux sérique d'AMH comme biomarqueur de la réserve ovarienne présente plusieurs avantages. Le premier étant que le taux sérique d'AMH est affecté plus rapidement que ceux des autres facteurs endocriniens ovariens tels l'Inhibine B ou l'œstradiol, comme il a été récemment reporté lors de la transition perimenopause (Burger *et al.* 2007). Le deuxième avantage de l'AMH provient des stades folliculaires qui la produisent. Contrairement à l'inhibine B et l'œstradiol, l'AMH est produite par les cellules de la granulosa d'une grande variété de stades folliculaires (primaires à antraux) (Baarends *et al.* 1995; Durlinger *et al.* 2002; Weenen *et al.* 2004). Cela semble avoir pour conséquence une indépendance de l'AMH vis à vis du cycle menstruel/estrus comme il l'a été suggérée dans plusieurs études prospective (Hehenkamp *et al.* 2006; La Marca *et al.* 2006; Tsepelidis *et al.* 2007) hormis dans une étude épidémiologique longitudinale chez 37 femmes qui a montré une diminution rapide du taux d'AMH en début de phase lutéale (Wunder *et al.* 2008). Cette indépendance pourrait s'expliquer par le fait que la production d'AMH serait FSH indépendante, probablement parce que les follicules antraux cessent progressivement de produire de l'AMH (Baarends *et al.* 1995; Durlinger *et al.* 2002; Fanchin *et al.* 2003; Visser *et al.* 2006). L'action de l'AMH à différents niveaux de la folliculogenèse (inhibition de l'activation des follicules primordiaux, diminution de la sensibilité des follicules à la FSH), son implication dans l'inhibition de la synthèse de l'aromatase et du récepteur de la LH (di Clemente *et al.* 1994) et sa production indépendante de la FSH suggèrent l'implication de plusieurs voies de signalisation dans l'activation et régulation du gène de l'AMH. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer les différents rôles physiologiques de l'AMH ainsi que les mécanismes qui contrôlent son expression et régulation (Feyereisen *et al.* 2006).

4. L'hormone anti-Müllerienne : caractéristiques génomiques et protéiques

4.1 Les caractéristiques de la superfamille des TGF-β

Parmi les membres de la superfamille des TGF-β, on dénombre de nombreux facteurs impliqués dans la régulation du développement des follicules chez les mammifères. Plusieurs de ces membres sont impliqués dans la communication bidirectionnelle qui existe entre l'ovocyte et ses cellules avoisinantes (fig. 14).

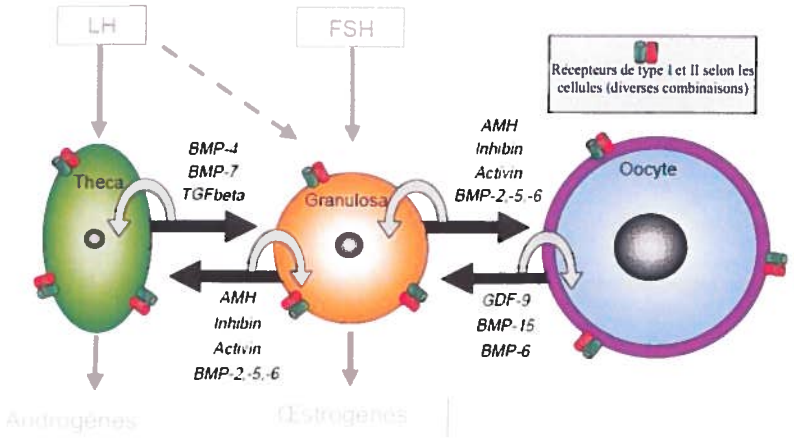

Figure 14: Implication des membres de la superfamille des TGF-β dans la communication bidirectionnelle de l'ovocyte, des cellules de la granulosa et de la thèque. Des facteurs produits par l'ovocyte, les cellules de la granulosa et de la thèque exercent leurs effets de manières autocrine (flèches grises) et paracrine (flèches noires) selon l'expression des récepteurs de type I et II à la surface cellulaire. La fixation de la LH et FSH sur leurs récepteurs respectifs entraînent l'activation de voie signalisation qui aboutissent à la production d'androgènes (cellules de la thèque) et d'œstrogènes (cellules de la granulosa). Tiré de Knight & Glister, 2006.

La superfamille des TGF-β contrôle différents processus cellulaires telles que la différenciation, l'apoptose et la prolifération tant durant l'embryogenèse qu'au sein des tissus matures (Massague, 2000; Ten Dijke *et al.* 2002). Elle peut être subdivisée en sous-famille telles que la sous-famille des TGF- β (incluant TGF-β1 à 3), la sous-famille des *bone morphogenic protein* (BMP), contenant plus de 20 membres, la sous-famille des activines/inhibines (incluant l'Inhibine B), et l'AMH. Tous les membres de cette famille sont synthétisés sous la forme d'une pré-pro-protéine qui mature par clivage protéolytique. Les formes matures sont constituées d'un homo ou hétérodimère comprenant la région C- terminale du précurseur liée par des ponts disulfures. La plupart des membres de la superfamille des TGF-β (excluant les inhibines et la sous-famille des *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) agissent en se fixant à un

complexe hétéro-tétramérique composé de deux types de récepteurs (de type I et II) à activité serine-thréonine kinase présent à la surface cellulaire (Chang *et al.* 2002; Miyazawa *et al.* 2002; Knight & Glister, 2006). Une ou plusieurs combinaisons de récepteurs de type I et II sont possibles pour un même facteur (Massague & Wotton, 2000; Knight & Glister, 2006). La fixation du ligand du récepteur entraîne la phosphorylation du récepteur de type II qui va induire la phosphorylation du récepteur de type I (fig. 15). La propagation du signal se fait via la phosphorylation des protéines Smads (Shi & Massague, 2003). À ce stade, on distingue trois classes de protéines transductrices du signal (Smads): les SMADs régulées et activés par leur récepteur (R-Smads: Smad 1, 2, 3, 5 et 8), les Smads co-médiatrices (Co-Smads: Smad4), et les SMADs inhibitrices du signal (I-Smads: Smad 6 et 7). Le complexe formé entre les SMADs transductrices et la protéine Smad4 sera transloqué au noyau où il pourra activer ou réprimer des gènes cibles en liant aux sites spécifiques.

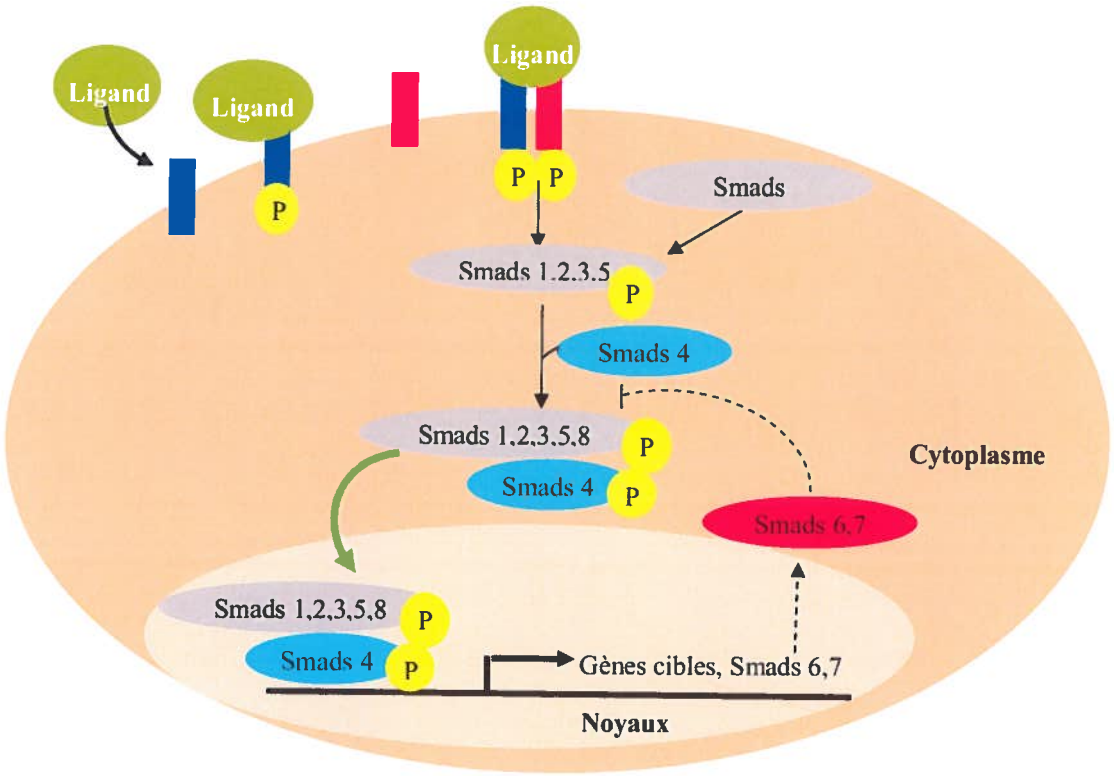

Figure 15: Voie de transduction du signal activée par la plupart des membres de la famille des TGF-β. La protéine sur son récepteur de type II entraîne son activation et le recrutement et l'activation du récepteur de type I. La transduction du signal se fait via les protéines Smads 1, 2, 3 et 5 qui s'associent avec la protéine co-médiatrice (Smad 4) pour transmettre le signal jusqu'au compartiment nucléaire. Le complexe protéique se fixera au niveau de leur séquence consensus afin d'activer l'expression de gènes cibles. L'activation de gènes cibles s'accompagne de l'expression des gènes des protéines Smads inhibitrices qui inhibera la cascade d'activation.

L'AMH a une action clé sur les organes reproducteurs en développement. Chez les mâles, l'AMH engendre la régression des canaux de Müller (Josso, 1992; Josso *et al.* 1977). Elle est produite uniquement par les cellules de Sertoli durant l'embryogenèse puis décroît très rapidement à la naissance pour atteindre un faible taux à la puberté (fig.16- Jamin *et al.* 2002; MacLaughlin & Donahoe, 2002; Visser, 2003). Chez la femelle, les canaux de Müller donne naissance aux oviductes, à l'utérus et à la partie supérieure du vagin (Kobayashi & Behringer, 2003). L'AMH est produite à de faibles taux uniquement par les cellules de la granulosa des follicules en croissance (primaires à petits antraux) de l'ovaire (fig.16 - Rajpert-De Meyts *et al.* 1999; Rey *et al.* 2000).

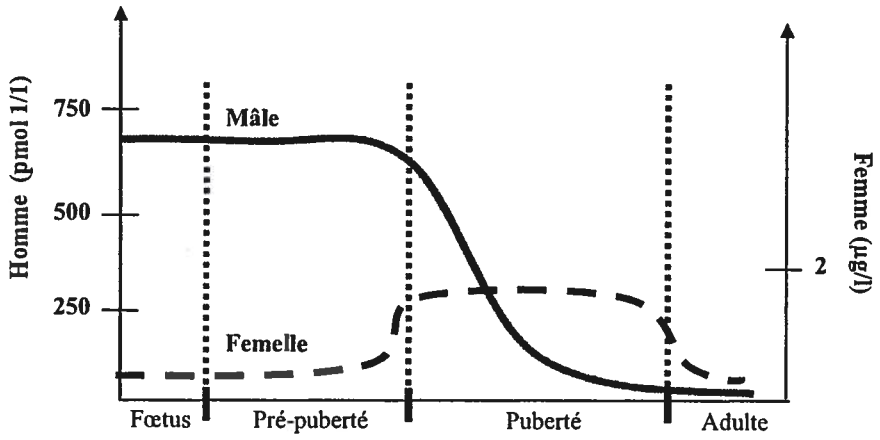

Figure 16: Profil des concentrations sériques de l'AMH chez les mammifères au cours de la vie fœtale et post-natale. Chez les mâles la concentration sérique d'AMH est élevée de la vie fœtale jusqu'à la pré-puberté (–). Par la suite elle décroît (puberté) jusqu'à un faible taux à l'âge adulte. Chez la femelle (– –), sa concentration sérique est plus faible, avec une légère augmentation durant la puberté (Rey *et al.* 2003). Les axes des ordonnées sont à l'échelle pour l'homme et la femme respectivement.

La structure de l'AMH est hautement conservée chez les vertébrés (Budzik *et al.* 1980; Eusebe *et al.* 1996; Western *et al.* 1999). La séquence protéique de l'AMH chez l'humain présente plus de 70% d'homologie avec celle des souris, rats et bovins (fig.17). La conservation de la protéine entre les espèces est probablement le témoin d'une importance physiologique. On connaît le rôle de l'AMH dans la différenciation sexuelle lors de la régression des canaux de Müller mais elle semble être dans différents processus par la suite aussi bien chez le mâle que chez la femelle. Il semblerait que l'AMH soit impliqués dans l'inhibition de la maturation de l'ovocyte et des spermatogonies (Takahashi *et al.* 1986; Ueno *et al.* 1988; Taketo *et al.* 1991). Elle serait également impliquée dans le développement pulmonaire et la descente des testicules (Hutson, 1986; Catlin *et al.* 1988; Lee & Donahoe, 1993; Teixeira & Donahoe, 1996). Dès la fin des années 70, il a été suggéré que l'AMH ait un pouvoir anti-prolifératif sur des cellules cancéreuses (Donahoe *et al.* 1981; Donahoe *et al.* 1979; Fuller *et al.* 1982; Fuller *et al.* 1985; Chin *et al.* 1991; Parry *et al.* 1992). Plusieurs membres de la famille des TGF-β semblent impliqués dans des processus pro et anticancéreux (revue dans Padua & Massague, 2009).

```
Humain      MRDLPLTS-LALVLSALGALLGTEALR---------AEEPAVGTSGLIFREDLDWP---- 46
Bovin       -MPGPSLS-LALVLSAMGALLRPGTPREEVFSTSALPREQATGSGALIFQQAWDWPLSSL 58
Souris      -MQGPHLSPLVLLLATMGAVLQPEAVE-----------NLATNTRGLIFLEDELWP---- 44
Rat         -MQGPHLSLLLLLLATMGAVLQADTVE-----------ELT-NTRGLIFLEDGVWP---- 43
                *  * * *:*:::**:* . : .            : : .: .*** :   **

Humain      --PGSPQEPLCLVALGGDSNGSSSPLRVVGALSAYEQAFLGAVQRARWGPRDLATFGVCN 104
Bovin       WLPGSPLDPLCLVTLHGSGNGSRAPLRVVGVLSSYEQAFLEAVRRTHWGLSDLTTFAVCP 118
Souris      --PSSPPEPLCLVTVRGEGNTSRASLRVVGGLNSYEYAFLEAVQESRWGPQDLATFGVCS 102
Rat         --PSSPPEPLCLVAVRGEGDTSKASLTVVGGLHSYEHAFLEAVQESRWGPQDLATFGVCS 101
              *.** :*****:: *..: * :.* *** * :** *** **:.::**  **:**.**

Humain      TGDRQAALPSLRRLGAWLRDPGGQRLVVLHLEEVTWEPTPSLRFQEPPPGGAGPPELALL 164
Bovin       AGNGQPVLPHLQRLQAWLGEPGGRWLVVLHLEEVTWEPTPLLRFQEPPPGGASPPELALL 178
Souris      T-DSQATLPALQRLGAWLGETGEQQLLVLHLAEVIWEPELLLKFQEPPPGGASRWEQALL 161
Rat         T-DSQTTLPALQRLGAWLGETGEQQLLVLHLAEVIWEPQLLLKFQEPPPGGASRWEQALL 160
            : : *..** *:** *** :.* : *:**** ** ***   *:*********.  * ***

Humain      VLYPGPGPEVTVTRAGLPGAQSLCPSRDTRYLVLAVDRPAGAWRGSGLALTLQPRGEDSR 224
Bovin       VVYPGPGLEVTVTGAGLPGTQSLCLTADSDFLALVVDHPEGAWRRPGLALTLRRRGNGAL 238
Souris      VLYPGPGPQVTVTGTGLRGTQNLCPTRDTRYLVLTVDFPAGAWSGSGLILTLQPSREGAT 221
Rat         VLYPGPGPQVTVTGAGLQGTQSLCPTRDTRYLVLTVHFPAGAWSGSGLALTLQPSKEGAT 220
            *:***** :**** :** *:*.** : *: :*.*.*. * ***  .** ***:   :.:

Humain      LSTARLQALLFGDDHRCFTRMTPALLLLPRS-EPAPLPAHGQLDTVPFPPPRPSAELEES 283
Bovin       LSTAQLQALLFGADSRCFTRKTPALLLLLPARSSAPMPAHGRLDLVPFPQPRASPEPEEA 298
Souris      LSIDQLQAFLFGSDSRCFTRMTPTLVVLPPA-EPSPQPAHGQLDTMPFPQPGLSLEPEAL 280
Rat         LTIAQLQAFLFGSDSRCFTRMTPTLVLLPPT-GPTPQPAHGQLDTVPFPQPGLSLEPEDL 279
            *:  :***:*** * ***** **:*::*  :  .:* ****:** :*** *  * * *

Humain      PPSADPFLETLTRLVRALRVPPARASAPRLALDPDALAGFPQGLVNLSDPAALERLLDGE 343
Bovin       PPSADPFLETLTRLVRALAGPPARASPPRLALDPGALAGFPQGQVNLSDPAALERLLDGE 358
Souris      PHSADPFLETLTRLVRALRGPLTQASNTQLALDPGALASFPQGLVNLSDPAALGRLLDWE 340
Rat         PHSADPFLETLTRLVRALRGPLTRASNTRLALDPGALASFPQGLVNLSDPVALGRLLDGE 339
            * ****************  * ::** .:*****.***.**** ******.** **** *

Humain      EPLLLLLRPTAATTGDPAPLHDPTSAPWATALARRVAAELQAAAAELRSLPGLPPATAPL 403
Bovin       EPLLLLLPPTAATTGVPATPQGPKSPLWAAGLARRVAAELQAVAAELRALPGLPPAAPPL 418
Souris      EPLLLLLSPAAATEREPMPLHGPASAPWAAGLQRRVAVELQAAASELRDLPGLPPTAPPL 400
Rat         EPLLLLLSPAAATVGEPMRLHSPTSAPWAAGLARRVAVELQAAASELRDLPGLPPTAPPL 399
            ******* *:***   *   :.* *. **:.* ****.****.*:*** ******::.**

Humain      LARLLALCPGGPGGLGDPLRALLLLKALQGLRVEWRGRDPRGPGRAQRSAGATAADGPCA 463
Bovin       LARLLALCPGNPDSPGGPLRALLLLKALQGLRAEWRGRERSGSARAQRSAGAAAADGPCA 478
Souris      LARLLALCPNDSRSSGDPLRALLLLKALQGLRAEWHGRE--GRGRTGRSAG-TGTDGPCA 457
Rat         LSRLLALCPNDSRSAGDPLRALLLLKALQGLRAEWRGRE--GRGRAGRSKG-TGTDGLCA 456
            *:*******... . *.***************.**:**:  * .*: ** * :.:** **

Humain      LRELSVDLRAERSVLIPETYQANNCQGVCGWPQSDRNPRYGNHVVLLLKMQARGAALARP 523
Bovin       LRELSVDLRAERSVLIPETYQANNCQGACGWPQSDRNPRYGNHVVLLLKMQARGATLARP 538
Souris      LRELSVDLRAERSVLIPETYQANNCQGACAWPQSDRNPRYGNHVVLLLKMQARGAALGRL 517
Rat         LRELSVDLRAERSVLIPETYQANNCQGACAWPQSDRNPRYGNHVVLLLKMQARGAALGRL 516
            ***************************.*.**************************:*.*

Humain      PCCVPTAYAGKLLISLSEERISAHHVPNMVATECGCR 560
Bovin       PCCVPTAYTGKLLISLSEERISAHHVPNMVATECGCR 575
Souris      PCCVPTAYAGKLLISLSEERISAHHVPNMVATECGCR 554
Rat         PCCVPTAYTGKLLISLSEEHISAHHVPNMVATECGCR 553
            ********:**********:*****************
```

Figure 17: Comparaison des séquences protéiques de l'AMH de plusieurs mammifères qui démontre la conservation de la protéine AMH entre espèces mammifères (logiciel ClustalW). « * » correspond à une homologie de 100% entre les quatre espèces, « : » et « . » correspond à des différences d'un ou de deux acides aminés. Les chiffres à droite correspondent au nombre d'acides aminés.

L'AMH est une protéine homodimérique glycosylée liée par des ponts disulfures (Budzik *et al.* 1983; Picard & Josso, 1984). La maturation post-traductionnelle de l'AMH correspond à deux clivages protéolytiques (fig.18). La furine et la proprotéine convertase 5 sont de potentielles enzymes de clivages de la forme immature de l'AMH ; elles sont exprimées au niveau de la crête uro-génitale et leur expression temporo-spatiale pourrait être responsable de la spécificité tissulaire de l'action de l'AMH lors de l'embryogenèse et par la suite (Nachtigal & Ingraham, 1996). En effet, l'expression du gène de ces enzymes ainsi que la localisation de celles-ci correspondent au moment où l'AMH exerce son action ainsi qu'à l'emplacement tissulaire où cette action siège. La forme active de l'AMH est un homodimère de la portion C-terminale du précurseur de l'AMH. L'activité de la forme active de l'AMH est augmentée par un homodimère composé de deux monomères de la portion N-terminal du précurseur (Wilson *et al.* 1993).

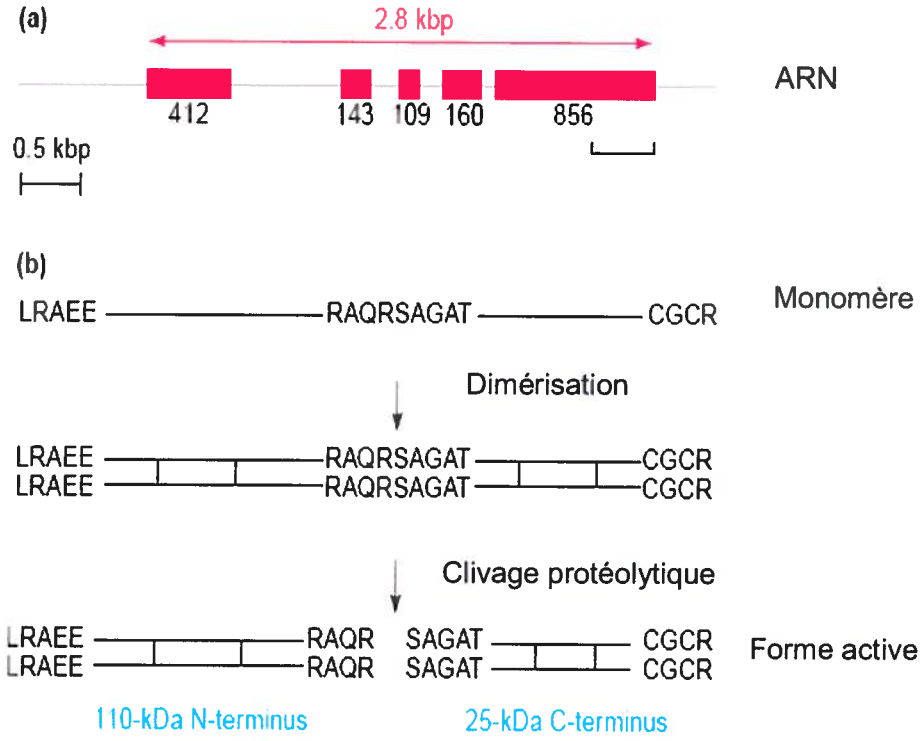

Figure 18: Synthèse et maturation post-traductionnelle de l'AMH humain. Une fois que le gène de l'AMH est transcrit et son ARN traduit(a), il y a libération du monomère AMH dans le réticulum endoplasmique où il va subir une maturation post-traductionnelle incluant la dimérisation et le clivage protéolytique. Tiré de Josso & Clemente, 2003.

Il a été démontré que la traduction de l'ARNm codant pour l'AMH avait lieu au sein du réticulum endoplasmique et de l'appareil de golgi par immunohistochimie (Hayashi *et al.* 1984; Tran & Josso, 1982). Des mutations du gène AMH peuvent entraîner la rétention de la protéine au sein du réticulum endoplasmique (Belville *et al.* 2004). Étant donné que l'AMH est une protéine glycosylée, sa synthèse débute au sein du réticulum endoplasmique pour par la suite transitée vers l'appareil de golgi où sa glycosylation sera achevée. Les protéines AMH pourraient être contenues dans des vésicules pour être sécrétées dans le milieu interstitiel de manière constitutive ou via l'activation d'une voie de signalisation.

4.2 Les récepteurs de l'AMH

Seul le récepteur de type II de l'AMH a été identifié à l'heure actuelle (Baarends *et al.* 1994; di Clemente *et al.* 2003). Le récepteur de type II est exprimé au niveau des cellules de la granulosa chez les souris et les rats, des follicules préantraux et petits antraux dans les ovaires de rats (Baarends *et al.* 1995; Ingraham *et al.* 2000; Durlinger *et al.* 2002) et également dans des cellules épithéliales de surface de l'ovaire chez l'humain (Masiakos *et al.* 1999). Il existe au moins trois récepteurs de type I potentiel (fig. 19): ALK2 également connu sous le nom de ActRI (Visser *et al.* 2001); ALK3 ou BMPRI-A (Jamin et al. 2002) et ALK6 également appelé BMPRI-B (Gouedard *et al.* 2000).

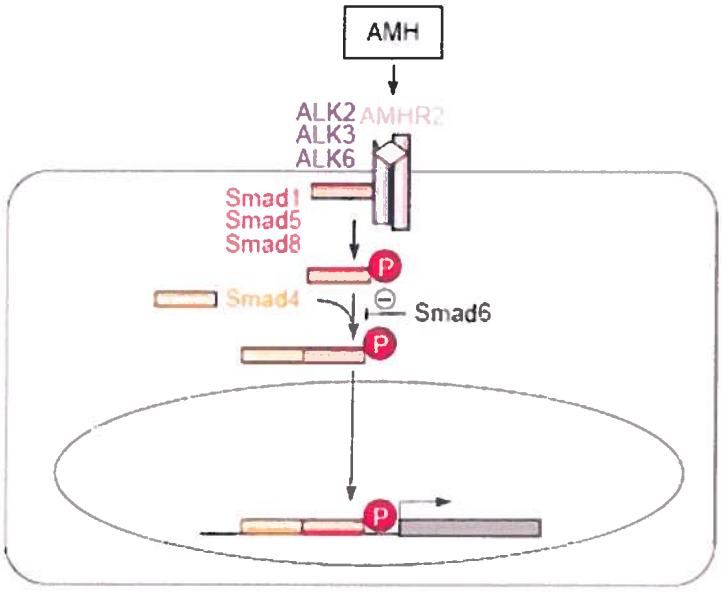

Figure 19: Voie de signalisation de l'AMH possible dans les cellules de la granulosa. La fixation de l'AMH sur son récepteur de type II (AMHRII) entraîne la formation d'un complexe avec un récepteur de type I, ALK2, 3 ou 6. Le récepteur I sous sa forme active phosphoryle les molécules Smad 1, 5, 8 qui lie la molécule Smad4. Ce complexe Smad 1, 5,8 et 4 sera transloqué dans le noyau où en se liant à l'ADN activera la transcription de plusieurs gènes. La molécule Smad6 peut interrompre cette voie de signalisation en inhibant la formation du complexe Smad1, 5, 8 et 4. Tiré de Josso & Clemente, 2003.

L'implication d'ALK2 a été démontrée dans la voie de signalisation de l'AMH au sein d'un système in vitro de régression des canaux de Müller où l'exposition aux oligonucléotides d'ALK2 inhibait la régression des canaux de Müller induite par l'AMH (Visser *et al.* 2001). L'implication d'ALK2 dans la transduction du signal de l'AMH a été confirmée à l'aide de lignées cellulaires (Clarke *et al.* 2001; Visser *et al.* 2001). L'implication d'ALK3 dans la régression des canaux de Müller chez des souris mâles a été démontrée puisque son invalidation au niveau des canaux de Müller entraîne leur persistance. Par conséquent, la formation d'un complexe ALK2/AMHRII ou ALK3/AMHRII serait possible pour transmettre le signal dans le compartiment intracellulaire lors de l'embryogenèse (Visser, 2003). Durant l'embryogenèse, les cellules exprimant le récepteur AMHRII sont localisées au niveau de l'épithélium cœlomique du pont urogénital des sexes mâles et femelles. Sous l'influence de l'AMH, ces cellules vont migrer dans le mésenchyme entourant les canaux de Müller chez le mâle. Zhan et collègues (2006) ont démontré que l'expression des récepteurs ALK2 et ALK3 s'effectuait dans un espace temporel et

spatial semblable à l'expression de l'AMH. Toutefois, il semblerait que l'expression d'ALK2 et ALK3 varient selon les tissus lors de la migration des cellules épithéliales cœlomique. Le récepteur ALK6 n'est probablement pas important dans la voie de signalisation de l'AMH lors de l'embryogenèse puisque les souris n'exprimant pas le gène d'ALK6 (ALK6KO) ne présentent aucunes anomalies de la régression des canaux de Müller. Le récepteur ALK6 pourrait donc être impliqué lors de la période post-natale et/ou adulte (Clarke *et al.* 2001). Toutefois, ALK6 présente une interaction spécifique avec le récepteur AMHRII dans les cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO) (Gouedard *et al.* 2000).

Malheureusement, les études portant sur les récepteurs de l'AMH étant principalement effectuées chez les mâles, on dispose de peu de données sur leur expression spatiotemporelle dans l'ovaire. Il semblerait qu'ALK2 soit exprimé dans les cellules de granulosa des petits follicules en croissances (Visser & Themmen, 2005). ALK3 et ALK6 sont exprimés dans les cellules de granulosa (principalement antraux) et ovocytes dans les ovaires murines (Erickson & Shimasaki, 2003; Yi *et al.* 2001). Des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer à partir de quand ces récepteurs potentiels de types I sont exprimés dans l'ovaire ainsi que leur implication dans la voie de signalisation de l'AMH après la naissance chez les femelles.

La fixation de l'AMH sur ses récepteurs aboutit à la transcription de plusieurs gènes cibles. De plus, il a été démontré que l'AMH induisait une diminution de l'expression du gène du cytochrome P450 aromatase (CYP19) *in vitro* dans des ovaires de différentes espèces exposés à différentes concentrations d'AMH (di Clemente *et al.* 1992). Ces résultats ont été confirmés chez le mâle également (Racine *et al.* 1998). En utilisant, par exemple, des souris transgéniques surexprimant le gène de l'AMH ou en exposant des cellules de Leydig à l'AMH, il a été démontré que l'AMH était impliquée dans la transcription du gène du récepteur de la LH (LHR), de la 3β-hydroxysteroïde déshydrogénase (HSD3B1), de la CYP11A et du gène de la CYP17 (Racine *et al.* 1998; Messika-Zeitoun *et al.* 2001; Laurich *et al.* 2002). L'AMH inhibait l'activation du gène de l'AMHRII (Messika-Zeitoun *et al.* 2001) et activait le gène de Smad6 dans une lignée cellulaire dérivée des cellules de Leydig (Clarke *et al.* 2001).

4.3 Expression et régulation de l'AMH

4.3.1. Etude du promoteur de l'AMH

Le gène de l'AMH se situe sur les chromosomes 19, 10 et 7 chez l'humain (position 19p13.3), la souris (position 10 C1; 1043.0 cM) et le rat (position 7q11) respectivement. Le promoteur de l'AMH s'étend chez l'humain sur 656pb (site chromosomique 219967-2200333), la souris sur 436pb (site 80267560-80267995) et le rat sur 325pb (site chromosomique 10419995-10419671). La position du gène de l'AMH est hautement conservée entre les espèces ; il est situé entre les gènes du *Splicing factor 3A subunit 2* (SF3A2) et du *junctional sarcoplasmic reticulum protein 1* (JRSP1). Il a été démontré expérimentalement, par troncature progressive, que la région effectrice du promoteur murin correspondrait au 180 pb en amont du point d'initiation de la transcription (Giuili *et al.* 1997). En comparant cette séquence murine à celle de l'humain, du rat et de l'espèce bovine, on retrouve une forte homologie dans les 180 pb en amont du point d'initiation de la transcription (fig. 20). Ces fortes homologies sont probablement le reflet de la présence de sites reconnus par des facteurs de transcription nécessaire à l'expression et régulation du gène de l'AMH.

```
Rat         CCCAGGCAGATGGGA-ACGACCCAAGGACACCTC-GGCCTCTGCAGTTG-GGGGCTGGCT 155
Souris      -CCAGGGAGATGGGA-GCTACTCAAGGACAGCTCAGGCCTCTGCAGTTATGGGCCCAGCT 58
Humain      TGTTGACACATCAGGCCCAG----------CTCTATCACTG---GGGAGGGAGATAGGCT 484
Bovin       GTCTGACAAATGGGTCACAGGCCACACACACTGTATCGCTGCTCAGGAGATAGGCAGGCA 533
                 *  * **  *   *                    **     *      *    **
                                  SRY
Rat         C-TGAGGACAGAAAG--CCTTTTGAGACAGCCGCCTCCCACCTGATGGGCATGCAAAGCG 212
Souris      C-TGAGGACAGAAAG--CCCTTTGAGACAGTCGCCTCCCACCTGCTGGGCATGAAAAGTG 115
Humain      GCCAGGGACAGAAAGGGCTCTTTGAGAAGGCCAC--TCTGCCTGGAGTGGGGGCGC---- 538
Bovin       CGTTGGAACAGAAGGGGC--TTTGAGAAGGCCA---TAGGCCTCCCAGGCTCACAG---- 584
                 * ****** *  *  *******  * *        ***     *
                                SF-1                GATA
Rat         CAGCCAGGCACTGTCCCC-AAGGTCACCTC--AGGGGTTGATAGAGG--TGTCCCTCCCA 267
Souris      C---CAGGCACTGTCCCCCAAGGTCACCTT--TGGTGTTGATAGGGG--CGTCCCTCCCA 168
Humain      ----CGGGCACTGTCCCCCAAGGTCGCGGC---AGAGGAGATAGGGGTCTGTCCTGCACA 591
Bovin       ----CAGGCACCAGCCTTCAAGGTCATGTCCCAGGAGGAGATAGGGA-CCGCCCTGCACC 639
                 * *****   **   ******         * *  ***** *    * **  * *
                                          TATA
Rat         AG----CACT--CTGGCTCGA--ATGCATATAAGCAGGACCACCCAGACCCTGCCA--TG 317
Souris      AGCAAGCAAT--CTGGCTCAGCCATACATATAAGCAGGGCCACCCGGACCTTGCTG--TA 224
Humain      AACACCCCACCTTCCACTCGG---CTCACTTAAGGCAGGCAGCCCAGCCCCTGGCAGCAC 648
Bovin       A-CAAACAGC--TCTGCTCCC---TCTTATAAAGTAGGGCAGCCCAGCCCCTGGAAGCTC 693
            *     *         ***          ***   * *  *** * ** **
                  M
Rat         CCACCATG 325
Souris      CCACCATG 232
Humain      CCACGATG 656
Bovin       CCAGGATG 701
            ***  ***
```

Figure 20: Comparaison des séquences des promoteurs de l'AMH humain, souris, rat et bovin. Une plus forte homologie est constatée au niveau des 180 pb se trouvant en amont du point d'initiation de la transcription (point de référence: espèce murine). Les séquences nucléiques de plusieurs sites (SRY, SF-1, WT-1) reconnus par des facteurs de transcription sont des zones d'homologies entre les espèces.

Plusieurs études chez le mâle ont démontré la présence de site de liaison pour des facteurs de transcription nécessaires à l'expression du gène tels que les facteurs SF-1 ou GATA (Tremblay *et al.* 2001; Tremblay & Viger, 1999). Chez la souris, la région effectrice du promoteur du gène de l'AMH demeure un sujet controversé mais plusieurs études ont sélectionnées cette région de 180 paires de bases comme étant la région effectrice du promoteur (Dresser *et al.* 1995; Beau *et al.* 2001; Tremblay *et al.* 2001). En se basant sur des homologies de séquences d'ADN, les sites trouvés dans le modèle murin sont également présents chez d'autres espèces mammifères. Les sites découverts pourraient être reconnu par des protéines de la famille SOX (Haqq *et al.* 1993 ; De Santa Barbara *et al.* 1998), de SF-1 (Shen *et al.* 1994;

Watanabe *et al.* 2000) et des facteurs GATA (Tremblay & Viger, 1999; Watanabe *et al.* 2000; Beau *et al.* 2000) chez l'humain et la souris. Le fait que des sites au niveau du promoteur du gène de l'AMH soient conservés chez les mammifères suggèrent que les facteurs de transcription qui se lient à ces sites soient également important voire indispensable à l'activation du promoteur du gène. Toutefois, il existe des différences significatives entre les sexes mâles et femelles à l'égard des facteurs de transcription qui sont impliqués dans l'expression et régulation du promoteur du gène de l'AMH telle que l'absence de l'implication du facteur de transcription SOX9 (Notarnicola *et al.* 2006) et l'implication de l'ovocyte (Salmon *et al.* 2004). Par conséquent, les études portant sur le gène AMH doivent être menées aussi bien chez le mâle que chez la femelle.

4.3.2. Expression et régulation de l'AMH chez le mâle

Les sites découverts dans la région effectrice du promoteur de l'AMH ont permis d'étudier l'implication de plusieurs facteurs de transcription dans l'expression et la régulation de l'AMH. Il a été démontré par immuno-précipitation, EMSA et mutagenèse dirigé, que le *Sry-related factor* SOX9 est nécessaire pour l'expression du gène de l'AMH chez le mâle (Arango *et al.* 1999; De Santa Barbara *et al.* 1998; Morais da Silva *et al.* 1996). SOX9 reconnaît le site SRY/SOX dans la région effectrice du promoteur (Arango *et al.* 1999; De Santa Barbara *et al.* 1998; Morais da Silva *et al.* 1996). Dans un système d'étude *in vitro* où des cellules HeLa étaient transfectées avec la région effectrice du promoteur AMH dans lequel le site SF-1 était muté, il a été observé une diminution significative de l'activité transcriptionnelle du gène (Shen et al. 1994). Des souris transgénique ayant le site de SF-1 muté ne présentaient qu'une légère diminution de l'activité transcriptionnelle du gène de l'AMH (Arango *et al.* 1999) du fait de la présence d'un deuxième site SF-1 (-218bp) découvert plus tardivement (Watanabe *et al.* 2000). SF-1 en synergie avec le facteur GATA4 active le promoteur de l'AMH *in vitro* (Tremblay & Viger, 1999). Deux protéines GATA4 interagiraient avec SF-1 pour favoriser l'activité transcriptionnelle du gène de l'AMH (Tremblay *et al.* 2001). Le *Wilms' tumor-1 factor*, WT-1 se lierait à un site de liaison proche (-50) du site GATA (Nachtigal *et al.* 1998 ; Miyamoto *et al.* 2008). La fixation de WT-1 ne suffit pas pour activer le promoteur de l'AMH mais il agirait en synergie avec SF-1 et GATA4 pour promouvoir l'activité transcriptionnelle du gène (Nachtigal *et al.* 1998 ; Miyamoto *et al.* 2008). Par contre, le facteur Dax-1 possède un effet négatif sur

l'activité transcriptionnelle du gène de l'AMH. Dax-1 inhiberait l'interaction entre SF-1 et WT-1 et entre GATA-4 et SF-1 (Nachtigal *et al.* 1998 ; Tremblay & Viger, 2001). Tremblay et collègues (2001) ont suggéré que le facteur de transcription *friend of gata 2* (FOG-2) inhiberait l'interaction entre GATA4 et SF-1, toutefois des études supplémentaires sont nécessaires pour définir le mécanisme moléculaire de ces interactions. Plusieurs mécanismes moléculaires ont été proposés pour tenter d'expliquer l'expression et la régulation du promoteur du gène de l'AMH (Fig. 21 et Tremblay *et al.* 2001) .

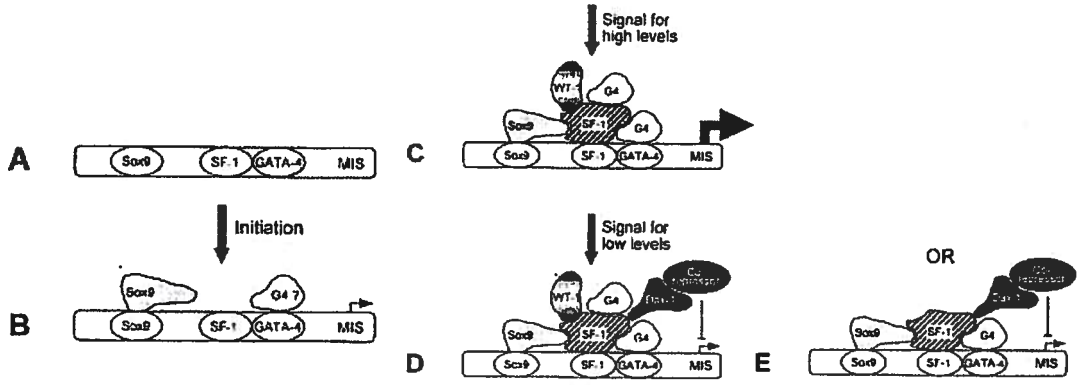

Figure 21: Mécanisme moléculaire probable de l'expression et régulation du gène de l'AMH chez les mâles. La fixation de SOX9 sur son site de liaison au niveau du promoteur de l'AMH est nécessaire pour l'initiation de la transcription du gène de l'AMH (B). La fixation du facteur GATA4 favoriserait cette initiation. Pour poursuivre la transcription, la fixation des facteurs SF-1, WT-1 et GATA-4 activerait la transcription du gène AMH (C). L'interaction de Dax-1 avec SF-1 conduirait à l'inhibition de la transcription (D) ou inhiberait les interactions SF-1/ WT-1 et SF-1/GATA-4 (E). (Tiré de Tremblay & Viger, 2001)

4.3.3. Expression et régulation de l'AMH chez la femelle

L'étude de l'expression et régulation du gène de l'AMH chez la femelle est moins approfondie que chez les mâles. Plusieurs facteurs de transcription impliqués dans l'activation du promoteur du gène de l'AMH chez le mâle sont exprimés chez la femelle. En effet les facteurs SF-1, GATA-4, WT-1 et Dax-1 sont tous exprimés dans les cellules de la granulosa (Pelletier *et al.* 1991 ; Ikeda *et al.* 1996; Anttonen *et al.* 2003). La transfection d'une lignée cellulaire de cellules de granulosa, la lignée KK-1, avec le promoteur du gène de l'AMH suivi du gène de la luciférase, a permis de démontrer l'implication de GATA4 dans l'expression du gène AMH et du rôle d'inhibiteur de FOG2 dans cette expression (Anttonen *et al.* 2003). Ils ont démontré

l'expression de GATA-4 et FOG2 dans les cellules de la granulosa d'ovaires fœtaux de souris par immunohistochimie (Anttonen *et al.* 2003). Le facteur SOX9 n'est pas impliqué dans l'expression du gène de l'AMH chez la femelle puisqu'il est exprimé qu'à partir des follicules secondaires (Notarnicola *et al.* 2006) alors que l'AMH l'est depuis le stade de follicule primaire (Visser & Themmen, 2005). Il a été proposé que le facteur SOX8 remplace le facteur SOX9, essentiel chez le mâle, pour l'expression du gène de l'AMH chez les femelles (Salmon *et al.* 2005). Toutefois, l'étude menée n'est pas concluante puisqu'il ne se base que sur la modulation de l'expression des gènes des différents facteurs incluant SOX8 pour déterminer leur implication. Un facteur peut être impliqué dans l'expression d'un gène sans que l'expression de son propre gène ne soit affectée. Des expériences d'interactions protéines/ADN seraient nécessaires afin de démontrer l'interaction de ces facteurs de transcriptions avec le promoteur de l'AMH dans les cellules de la granulosa (tel que présenté en Annexe 3). Il semblerait que la FSH ne soit pas impliquée dans l'expression et régulation de l'AMH de l'ovaire. A notre connaissance, il n'existe pas de lignées cellulaires de cellules de la granulosa qui expriment l'AMH. Toutefois, des expériences portant sur le promoteur de l'AMH peuvent être réalisées dans des lignées de cellules de la granulosa avec la transfection du promoteur de l'AMH suivi d'un gène reporteur. Anttonen et al. (2003) ont déterminé l'implication de FOG2 comme inhibiteur de l'action de GATA-4 au niveau du promoteur de l'AMH dans la lignée murine KK1.

5. Modulation de la population ovarienne en follicule par des produits ovo-toxiques

Il existe de nombreux facteurs capables d'altérer la physiologie ovarienne de manières temporaires ou permanente. Ces altérations peuvent avoir de lourdes conséquences pour la santé de la femme. L'impact des différents produits toxiques sur la physiologie ovarien dépend des stades folliculaires qu'ils ciblent et des systèmes cellulaires qu'ils perturbent. La destruction des follicules antraux aboutit à un arrêt temporaire du cycle menstruel et une infertilité transitoire. L'arrêt des expositions et la croissance des petits follicules permettent de retrouver un équilibre. Toutefois, la destruction des petits follicules a de plus lourdes conséquences telles que la survenue d'une ménopause précoce et l'infertilité permanente (Hoyer, 2005). Du fait des voies de signalisation qu'elles activent/inhibent, l'exposition à des ovotoxiques peut perturber la synthèse des hormones impliquées dans l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique et/ou rompre la communication entre l'ovocyte et ses cellules avoisinantes (Hirshfield, 1997; Hoyer, 2005).

La spécificité d'action des ovo-toxiques peut être utilisée dans le but de moduler la population ovarienne pour étudier par exemple des biomarqueurs de la réserve ovarienne.

5.1.Méthoxychlore

Le méthoxychlore (MTX) est un insecticide organochloré largement utilisé tels que dans l'élevage de bétail pour lutter contre des parasites et de multiples nuisibles qui affectent les plantes, les fruits et les légumes (Cummings, 1997). Le MTX induit la mort des follicules antraux chez des souris (Borgeest *et al.* 2002). Les expositions au MTX engendre entre autres: une diminution du volume de l'ovaire, une diminution du taux d'estradiol, et par conséquent une pertubation du cycle estral et l'atrésie folliculaire (Cummings & Gray, 1989; Martinez & Swartz, 1991; Swartz & Corkern, 1992; Swartz & Eroschenko, 1998). Une étude menée *in vitro* a démontré que le MTX inhibait la croissance des follicules antraux et augmentait le taux d'atrésie folliculaire (Miller *et al.* 2005). Des rats néonataux exposés à des doses croissantes de MTX (0-500 mg/kg/jour) sur une base journalière pendant 8 jours présentaient une hypersécrétion d'AMH, une diminution des follicules en croissance et une diminution du volume ovarien qui est imputable à la mort des follicules antraux (Uzumcu *et al.* 2006). Chez des primates exposées au MTX, on constate une sensibilité au MTX 100 fois plus élevé que celle observée chez les rongeurs (Gupta *et al.* 2007). Ce qui suggère que les effets du MTX chez l'humain seraient plus sévères que ceux observés chez les rongeurs. Le MTX induit un stress oxydatif par l'intermédiaire des mitochondries qui provoquerait l'atrésie des follicules antraux (Gupta *et al.* 2006a; Gupta *et al.* 2006b). Le métabolisme du MTX dans le foie par le cytochrome P450 produit principalement deux métabolites : le mono-hydroxy MTX (mono-OH) et le bis-hydroxy-MTX (HPTE). Ces deux métabolites possèdent une forte affinité pour les récepteurs aux œstrogènes. Le MTX agirait donc comme antagoniste des récepteurs œstrogènes dans son mécanisme de toxicité (Bulger *et al.* 1985; Bulger *et al.* 1978; Hall *et al.* 1997; Laws *et al.* 2000; Miller *et al.* 2006; Ousterhout *et al.* 1981). Il semblerait que le HPTE soit responsable de l'activité ostrogénique du MTX (Waters *et al.* 2001). Le HPTE serait en fait un agoniste du récepteur alpha à l'œstrogène mais un antagoniste du récepteur beta à l'œstrogène (Gaido *et al.* 2000; Safe *et al.* 2001; Zama & Uzumcu 2009). Le MTX pourrait être utilisé pour induire la mort des follicules antraux et ainsi étudier le recrutement des follicules primordiaux et l'établissement de la population folliculaire de l'ovaire.

5.2.Le cyclophosphamide

Le cyclophosphamide (CPA) est un agent alkylant bi fonctionnel membre de la famille des moutardes azotées. Les membres de la famille des moutardes azotées entraînent des cassures à l'ADN qui induisent la mort de la cellule. C'est ce principe qui explique l'utilisation du CPA dans les traitements anticancéreux puisque les cellules cancéreuses se multiplient plus vite que les cellules saines (Colvin, 1999; Ludeman, 1999; Hurley, 2002). Le métabolite ovotoxique du CPA aussi bien dans des modèles d'études *in vivo* et *in vitro* est la moutarde phosphoramidée (MP) (Plowchalk & Mattison, 1991; Desmeules & Devine, 2006). La MP induisait la mort des follicules primordiaux et antraux (Meirow *et al.* 1999; Meirow & Nugent, 2001; Plowchalk & Mattison, 1992). Il en résulte une atrophie ovarienne, une diminution du taux d'œstrogène, conséquence directe de la mort des follicules antraux, et selon la dose employée une diminution du nombre de follicules ovariens (Moore, 1991; Plowchalk & Mattison, 1992; Anderson *et al.* 1995). Le CPA peut être utilisée dans le but d'étudier l'impact de certaines chimiothérapies sur l'ovaire mais pas pour moduler spécifiquement un stade de follicules ovariens.

5.3.Le 4-Vinylcyclohexène diepoxide

Le 4-vinyl cyclohexène diepoxide (VCD) est un métabolite d'un produit dimérique du 1,3-butadiène, le 4-vinyl cyclohexène ou VCH (Borman *et al.* 2000; Mayer *et al.* 2004; Lohff *et al.* 2005). Le VCH et VCD sont utilisés dans l'industrie des pneus en caoutchouc, des retardateurs de flammes et dans les insecticides (Flaws *et al.* 1994). L'administration de VCH et de VCD par voie péritonéale à des souris engendre l'apparition d'une ménopause précoce causant la mort des follicules primordiaux et petits primaires au niveau des ovaires des rongeurs et primates *(Flaws et al.* 1994; Mayer *et al.* 2004; Mayer *et al.* 2004; Thompson *et al.* 2005; Lohff *et al.* 2006; Appt *et al.* 2006; Hoyer, Sipes, 2007). Le VCD ne présente aucune autre toxicité hormis l'induction de la mort des follicules primordiaux et petits primaires (Flaws *et al.* 1994; Kao *et al.* 1999 ; Mayer *et al.* 2004; Sahambi *et al.* 2008). Des souris âgées de 28 jours exposées au VCD à la concentration de 160 mg/kg/j durant 15 jours présentaient d'une part un cycle estrous plus long que celui observé chez les souris contrôles et d'autres part la survenue d'une ménopause précoce (Lohff *et al.* 2005).

Plusieurs mécanismes d'action du VCD ont été proposés. Lorsque des rattes étaient exposées *in vivo* au VCD à 80 mg/kg/j durant 10 jours, on pouvait déceler l'apparition de la fragmentation de l'ADN génomique, un marqueur de l'induction d'apoptose, au niveau des petits follicules prélevés 4h après la dernière injection (Springer *et al.* 1996). Différents signaux impliqués dans la voie apoptotique sont modulé par l'exposition au VCD. Il semble que le VCD induise l'activation de plusieurs voies de signalisation apoptotique impliquant les mitochondries aboutissant à une accélération du processus d'atrésie (Hoyer *et al.* 2001). Cette hypothèse est soutenue par le fait que les petits follicules issus de rattes exposées au VCD (80 mg/kg/j, 15 jours) présentaient une augmentation du ratio des protéines Bax/ Bcl-x_L dans le compartiment mitochondriale des cellules de la granulosa (Hu *et al.* 2001a). Les protéines Bax sont pro-apoptotiques tandis que les membres de la famille des Bcl-2 sont anti-apoptotiques, c'est le ratio des deux qui semble déterminer la voie qui sera empruntée (Ren *et al.* 1997). Le VCD agirait en activant la voie de signalisation des MAPK/AP-1 qui impliquerait la phosphorylation du factor c-jun pour la transduction du signal et l'activation de caspases (Hu *et al.* 2001b; Hu *et al.* 2002). Outre le fait d'activer des voies pro-apoptotiques, le VCD perturberait une voie de signalisation qui permet habituellement la survie des follicules. Une récente étude a démontré aussi bien *in vivo* et *in vitro* chez des rats que l'exposition au VCD perturbait la voie de signalisation c-kit/kitL. Il a été démontré via une analyse par microarray, que l'exposition de rattes ou d'ovaires de rattes néonatales au VCD induisait une diminution de l'expression du gène du récepteur kit et une augmentation de l'expression du gène de KitL (Fernandez *et al.* 2008). Le mécanisme qui aboutit à la spécificité d'action du VCD est méconnu toutefois elle peut être utilisée pour manipuler la population folliculaire de l'ovaire. En effet, le VCD peut être utilisé afin d'induire une diminution dose-dépendante du nombre de follicules primordiaux et petits primaires et à plus long terme, produire un modèle d'étude de la ménopause (Mayer *et al.* 2004 ; Sahambi *et al.* 2008).

5.4.Autres ovo-toxiques

Il existe dans l'environnement une variété de substances ayant un caractère ovo-toxique direct ou indirect. Par exemple, la fumée de la cigarette induit entre autre une déplétion de la réserve ovarienne (Mattison *et al.* 1989) et des ovocytes (Lodovici *et al.* 2004; Mattison *et al.* 1989). L'aspect le plus nuisible de la fumée de cigarette pour la réserve ovarienne est le fait qu'elle

induit la mort des follicules primordiaux, la source épuisable de la fertilité (Cortvrindt & Smitz, 2002; Mlynarcikova *et al.* 2005; Soares *et al.* 2007). Il a été démontré que le 7,12-dimethylbenz[a]anthracène (DMBA) et le benzo(a)pyrène (BaP), contenus dans la cigarette induisaient la mort de tous les stades folliculaires ovariens chez les rongeurs (Rajapaksa *et al.* 2007; Igawa *et al.* 2009). Des souris néonatales exposées à de fortes doses de bisphénol A (BPA) présentaient un nombre accru de follicules poly ovulaires (plusieurs ovocytes dans un même follicule) (Suzuki et al. 2002). L'exposition aux phthalates, une autre grande famille d'ovotoxique utilisé dans l'industrie du plastique également, engendre la mort des follicules antraux spécifiquement (Lovekamp-Swan & Davis, 2003; Hoyer, 2005).

Les traitements anticancéreux contiennent une variété d'ovo-toxiques qui peuvent induire une diminution de la réserve ovarienne aboutissant parfois à une ménopause précoce. Le cisplatine (cis-diamminedichloroplatinum) est un agent chimio thérapeutique qui est utilisé pour traiter une variété de cancers cancer du sein, carcinome du cortex surrénale, carcinome des poumons). Chez les rongeurs, le cisplatine semble induire la mort des follicules primordiaux et un allongement des cycles estrous chez les souris exposées, (Borovskaya *et al.* 2004; Yucebilgin *et al.* 2004). Yeh et collègues (2006) ont été les premières a démontré l'utilisation d'un biomarqueur sanguin (l'AMH), chez les rattes, pour évaluer l'impacte d'un produit ovotoxique (le cisplatine) sur la réserve ovarienne. La variété de produits chimiques induisant la mort des petits follicules accentue la nécessité d'avoir un bio-marqueur fiable permettant d'estimer la réserve ovarienne et évaluer l'impact de produits ovotoxiques.

OBJECTIFS

Les follicules primordiaux assurent la fertilité d'une femelle à long terme. À l'heure actuelle, nous ne disposons d'aucun bio-marqueur fiable permettant d'évaluer la fertilité à long terme. Outre le fait de fournir une estimation de la réserve ovarienne quelques soit l'âge d'un individu, les biomarqueurs de la réserve ovarienne permettraient d'évaluer l'impact d'ovo-toxique sur la population folliculaire. De plus, les biomarqueurs ovariens faciliteraient l'identification de dysfonctionnements ovariens et/ou de maladies ovariennes (ex : ovaires polykystiques, tumeurs ovariennes). Une récente étude a suggéré que l'AMH sérique serait corrélé au nombre de follicules primordiaux, dans un modèle d'étude basée sur le vieillissement des souris (Kevenaar *et al.* 2006). Les répercussions du vieillissement sur la population folliculaire et la production d'AMH sont méconnues. Il serait donc nécessaire d'induire une perte progressive de follicules primordiaux afin de déterminer s'il existe une corrélation directe entre le nombre de follicules primordiaux et l'AMH sérique. Pour ce faire, nous allons utiliser un produit ovotoxique connu, le VCD, afin d'induire une perte spécifique de follicules primordiaux et petits primaires (cibles du VCD). De précédentes études ont démontrés la spécificité du VCD à induire la mort des follicules primordiaux et petits primaires (Flaws *et al.* 1994; Devine *et al.* 2004; Hoyer & Sipes, 2007). L'utilisation du VCD pour manipuler la réserve ovarienne et étudier l'AMH sérique comme bio-marqueur de la réserve ovarienne a été démontré par une étude dans notre laboratoire (Sahambi *et al.* 2008). Dans le cadre de cette étude, des souris étaient exposées à 240 mg/kg/j de VCD durant 5 jours. Elles étaient par la suite sacrifiées à 16, 37, 57 ou 100 jours après la première injection. Le compte folliculaire a mis en évidence une diminution significative des follicules primordiaux et primaires dès le 16e jour tandis que les folliculaires secondaires et antraux diminuaient significativement à partir du 37e jour. Le taux sérique d'AMH diminuait significativement à partir du 37e jour après la première injection. Malheureusement cette étude ne permettait pas de d'étudier différents bio-marqueurs de la réserve ovarienne puisque les pertes de follicules occasionnées étaient soit absentes soit sévères (perte de 95 à 99% selon les stades folliculaires).

En ajustant les doses de VCD à administrer aux souris, nous allons moduler la population folliculaire de l'ovaire et déterminer les effets sur les taux circulants de différents bio-marqueurs connus de l'ovaire (AMH, FSH, E_2 et inhibine B). Nous pensons ainsi démontrer que l'AMH est le meilleur bio-marqueur des différents stades folliculaires et qu'il présenterait la meilleure

corrélation avec le nombre de follicules primordiaux que les autres biomarqueurs (FSH, E_2 et inhibine B).

croissance par rapport aux petits follicules. Les conséquences de cette perte sur la dynamique folliculaire de l'ovaire seront relevées et discutées.

II. Résumé de l'article en français

Thérésa J. Choisi[1], Sukhdeep K. Sahambi[2], Catherine Ferland[3], Bas Karels[4], Jenny A. Visser[4], Axel P.N. Themmen[4] and Patrick J. Devine[1]., 2010. **Evaluation of the anti-Müllerian hormone as a biomarker of primordial follicle number and its expression and regulation in female mice.**

[1]INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec; [2]LAB Research, Laval, Québec; [3]Université de Montréal, Ste Hyacinthe, Québec, Canada ; [4]Erasmus MC, Rotterdam, Netherlands.

En préparation pour le journal ***Human Reproduction.***

La réserve ovarienne est composée de follicules ovariens à différents stades de maturation. Les follicules primordiaux sont les plus importants puisqu'ils sont la source de tous les stades ultérieurs. Leur nombre est défini peu après la naissance chez les rongeurs et sont non renouvelables. Ces follicules sont les seules en quiescence dans l'ovaire et peuvent le demeurer durant plusieurs mois. Les follicules primordiaux représentent par conséquent la fertilité à long terme tandis que les stades ultérieurs (follicules primaires, secondaires et antraux) qui sont en croissance représentent la fertilité à moyen et court terme. On ne dispose d'aucuns bio-marqueurs permettant d'évaluer le nombre de follicules primordiaux. Des études sur des souris et épidémiologiques chez la femme ont démontré que le taux sérique d'hormone anti-Müllerienne (AMH) reflétait la fertilité. Une récente étude a suggéré que le taux sérique d'AMH serait corrélé au nombre de follicules primordiaux. Toutes ces données soutiennent l'idée que l'AMH soit le meilleur candidat pour évaluer le nombre de follicules primordiaux. Afin d'étudier cette possibilité, nous avons constitué 4 groupes de souris (CD-1) auxquels on a injecté du 4-Vinylcyclohexène diepoxide (VCD), un agent ovo-toxique ciblant les petits follicules, à des doses et périodes différentes (80-160 mg/kg/j) ou le véhicule pour le groupe contrôle (DMSO/saline). Des sacrifices ont eu lieu 21, 41 et 61 jours après la première injection. La pesée des souris et de divers organes n'a montré aucune toxicité non spécifique du VCD. À chaque point de temps, on observe chez tous les groupes exposés une diminution significative du nombre de follicules primordiaux. Par contre ce n'est que 41j après la première exposition qu'on observe une diminution significative du taux d'AMH sérique ($p<0.05$), lorsque le nombre de follicules secondaires diminuent chez les groupes traités au VCD. C'est uniquement à ce point de temps

que l'on observe une diminution significative du taux sérique d'inhibine B chez les souris traitées au VCD. En comparaison, le taux de FSH augmente significativement à partir de 41j uniquement pour le groupe traité avec la plus forte dose de VCD (160 mg/kg/j-20j, 41 et 61j, $p<0.05$) tandis que celui de l'œstradiol ne présente aucun changement significatif à tous les points de temps ($p>0.05$). Toutefois il existe une corrélation entre l'AMH sérique et le nombre de follicules primordiaux (Test de Pearson, $r=0.31$-0.61) ainsi qu'entre l'AMH et les follicules en croissance ($r=0.5$-0.7). Les autres biomarqueurs ne présentent aucune corrélation entre leur taux sérique et le nombre de follicules primordiaux. Etonnamment la diminution sérique d'AMH n'est pas reflétée dans l'ovaire par une diminution de l'expression protéique de l'AMH que se soit à 21j et 41j. Les cellules de la granulosa pourraient peut être accroître leur production en AMH. Malgré tout, l'AMH sérique semble être le meilleur biomarqueur de la réserve ovarienne parmi ceux testés. De plus, l'AMH permettrait d'évaluer l'impact de produits ovotoxiques sur la réserve ovarienne. Désormais, nous disposons d'un modèle d'ovo-toxicité qui permettra de tester d'autres bio-marqueurs de la réserve ovarienne.

Evaluation of anti-Müllerian hormone as a biomarker of small ovarian follicle numbers in female mice.

Short Title: Biomarkers of ovarian follicles in mice

Key Words: Biomarker, primordial follicle, hormone, anti-mullerian hormone, ovarian reserve, 4-vinylcyclohexene diepoxide.

One-sentence Summary: This study demonstrates that the anti-Müllerian hormone (AMH) is correlated to primordial follicle number and provides tools to understand the expression and regulation of AMH gene in female mammals.

Authors: Thérésa J. Choisi[1], Sukhdeep K. Sahambi[1], Catherine Ferland[1], Bas Karels[2], Axel P.N. Themmen[2], Jenny A. Visser[2], and Patrick J. Devine[1]*.

[1]INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec; [2]Erasmus MC, Rotterdam, Netherlands.

***Address correspondence to:** Patrick J. Devine, Ph.D., INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, H7V 1B7; Phone: 450-687-5010; FAX: 450-686-5309; E-mail: Patrick.devine@iaf.inrs.ca;
website: http://www.iaf.inrs.ca/Anglais/professeur.jsp?page=DevinePatrick

Footnote: This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Armand-Frappier Foundation.

Abstract. (250 word limit)

Anti-Müllerian hormone (AMH), produced by granulosa cells of growing follicles, is considered among the best biomarkers of ovarian reserve according to epidemiologic studies. Serum AMH levels in mice correlate well with age-dependent changes in primordial follicle number, although the impact of aging on AMH production is unknown. Here, we induced partial or total primordial follicle loss, using an ovarian toxicant that causes loss of primordial and primary follicles (4-vinylcyclohexene diepoxide, VCD), to test a possible correlation between serums AMH levels and primordial and growing follicle numbers independent of ageing. The present study demonstrated that serum AMH levels were the only biomarker of ovarian reserve tested which correlates well with primordial follicle numbers, although there was a delay between the decrease in primordial follicle numbers and reductions in serum levels. Also, correlations between serum AMH levels and secondary follicles are really strong. Moreover, decreases in small follicle numbers caused quantitative decreases in numbers of growing follicles. A significant decrease in serum inhibin B levels on day 41 and on day 61 in the higher VCD-treated group and a subsequent increase in FSH levels on day 61, though in mice given the highest dose were observed. However, no significant modification was observed in serum E_2 level. *In vivo* evidence supports an increase of AMH production by granulosa cells of VCD treated mice suggesting AMH gene activation. Results confirm AMH as the best biomarker of ovarian reserve, especially primordial follicle numbers.

Introduction.

The numbers of gametes that a female has is established during fetal life, reaching a peak of 6 million. Numbers rapidly decrease to 300,000 to 400,000 by the time of birth, as oogonia arrest in meiosis and become incorporated into dormant primordial ovarian follicles (Block, 1953; Forabosco *et al.* 1991; Faddy *et al.* 1992). These follicles represent the finite follicle population that determines long-term fertility throughout a woman's life. They can remain in a dormant state for decades, and small numbers are activated to commence maturation each month. Once activated, dormant follicles progress through multiple stages of folliculogenesis, leading to growth and maturation of both the follicle and the oocyte. Follicles eventually either rupture and release a mature oocyte (ovulation) or, much more often, are eliminated by a natural process called atresia (Hirshfield, 1991; Fortune, 2003). Together, these processes lead to the progressive decline of the ovarian follicle population until ovarian function can no longer be maintained and the woman becomes infertile and enters menopause. Growing follicles are important for short-term fertility and maintaining proper hormone levels and reproductive cyclicity, whereas primordial follicles are the most important for long-term fertility (Hirshfield, 1991; Gougeon, 1996; McGee, Hsueh, 2000). Although not proven directly, the number of growing follicles appears to be correlated and/or controlled by the number of primordial follicles still remaining in an individual (Gougeon, Lefevre, 1984; Scheffer et al. 1999; Gougeon, 1996). Fertility begins to decline after the age of 30 (Broekmans *et al.* 1998), and reproductive failure (menopause) occurs at the age of 51, on average (Faddy *et al.* 1992). Loss of growing follicles and the hormones they produce is thought to impaire the function of several systems, leading to alterations in bone metabolism and strength, cognitive function, thermoregulation, and increased risk of cardiovascular disease and certain cancers (Pouilles *et al.* 1994; Vega *et al.* 1994; Umland, 2008; Antonicelli *et al.* 2008; Hodis, Mack, 2008; Rohan *et al.* 2008; Utian *et al.* 2008).

The control of the rate of follicle loss is poorly understood. With women having their first child later in life, acceleration in follicle loss could have a negative impact on fertility just when it is needed most (Faddy *et al.* 1992; te Velde, Pearson, 2002). Follicle depletion can be also accelerated by some exposures, such as smoking (Jick, 1979; Jick, Porter, 1977; Westhoff *et al.* 2000; Kinney *et al.* 2007) chemotherapy, ionizing radiation (Larsen et al. 2003) and some solvents (Sallmen *et al.* 1995; Hoyer, Sipes, 1996; Koh *et al.* 1998). Knowledge of an

individual's ovarian reserve would help her to make decisions on when to start a family, as well as help monitor any exposures to potential ovotoxicants.

Measurement of ovarian reserve, roughly defined as the number of follicles present in the ovary that can provide eggs for fertilization, is important for determining whether or not a woman has sufficient follicles to become pregnant (Broekmans *et al.* 2006). Circulating anti-Müllerian hormone (AMH) levels are considered to be one of the best predictors of IVF success *(Fanchin et al.* 2003) and are determined in women for medical diagnoses of infertility (Tremellen *et al.* 2005; Gnoth *et al.* 2008; Broekmans *et al.* 2006). AMH is a member of the TGF-β family known for its ability to induce regression of the Müllerian ducts during embryonic development of the male reproductive system (Josso, Clemente, 2003; Lee, Donahoe, 1993; Josso *et al.* 1977; Josso, 1992), but its role in ovarian physiology of adults is largely unknown. It is expressed in Sertoli and granulosa cells in gonads of males and females, respectively (Visser, Themmen, 2005). Clinical studies show a negative correlation between serum AMH levels and age in women (van Rooij *et al.* 2005; van Disseldorp *et al.* 2008). In mice, circulating AMH levels decrease as primordial follicle numbers decline with age (Kevenaar *et al.* 2006). Unfortunately, the variables of follicle numbers and age cannot be separated in such an experimental design. Serum AMH levels have also been used to characterize ovarian toxicity of chemicals in rodents. Serum AMH was reduced in cisplatin-exposed rats with decreased numbers of healthy antral follicles (Yeh *et al.* 2006). In mice, elimination of almost all ovarian follicles following exposure to a diepoxide metabolite of an industrial byproduct, 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) resulted in significant decreases in circulating AMH (Sahambi *et al.* 2008).

Multiple other techniques are currently used to determine fertility in women, including ovarian biopsy, antral follicle count (AFC) by vaginal ultrasound, and measurement of serum hormone levels of follicle stimulating hormone (FSH), estradiol, and inhibin B. Estradiol and inhibin B are secreted predominantly from the largest antral follicles. Thus, most of these measurements can only detect the more advanced follicle types, and are well correlated with success of becoming pregnant by *in vitro* fertilization (IVF) (Broekmans *et al.* 2006; Broekmans *et al.* 1998). Furthermore, interpretation of levels of FSH, E_2, and inhibin B are complicated by the fact that they change over the course of the menstrual cycle and so must be measured at specific times during the cycle (Roseff *et al.* 1989; Hall *et al.* 1992; Winslow *et al.* 1991; Elting

et al. 2001). Although ovarian biopsies can determine small ovarian follicle numbers, results tend to be highly variable (Lambalk *et al.* 2004).

The aim of this study is to determine the best available predictor of ovarian reserve following toxic insult to the ovary. To characterize biomarkers of ovarian reserve in a model of variable ovarian reserve that is independent of aging, specific target of ovarian follicles is required. A technique to modify numbers of ovarian follicles was developed based upon previous studies done with VCD (Flaws *et al.* 1994; Mayer *et al.* 2004; Mayer *et al.* 2002; Sahambi *et al.* 2008; Devine *et al.* 2004; Hoyer *et al.* 2001). Previous studies demonstrated that exposure of female rodents to 80 mg/kg VCD for 15 or 30 days induced 50 or 100% depletion, respectively, of primordial and small primary follicles, the specific target follicle types of VCD (Flaws *et al.* 1994). This is followed by loss of larger growing follicles as the dormant follicle population is depleted (Kao *et al.* 1999). Subsequent studies determined the optimal exposure regime to induce rapid and complete follicle loss to be 160mg/kg/d for 20 days (Mayer *et al.* 2004). Other signs of toxicity at these doses were not observed (Mayer *et al.* 2002; Devine *et al.* 2004; Sahambi *et al.* 2008). Using dosing regimens of VCD that caused various extents of primordial follicle loss (between 50 and 99%), we determined ovarian follicle numbers and quantified circulating levels of AMH, FSH, estradiol and inhibin B at various times after start of exposures. This study allowed us to determine that AMH is the most reliable biomarker of those tested here for small ovarian follicle numbers.

Materials and Methods

Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, unless otherwise specified (Oakville, ON).

Animals, exposures and tissue processing

Female CD-1 mice (28 days of age) were purchased from Charles River (Montréal, QC). All animals were housed in plastic cages and maintained in a controlled environment (21°C ±2°C; 12h light/12h dark cycles). Animals had access to food and water *ad libitum*. All animals were given five days to acclimatize to their environment prior to the start of the experiments. All

experimental procedures were approved by the INRS Institutional Committee on Animal Care and Use.

VCD (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was dissolved in DMSO (Bioshop Canada Inc., Burlington, ON, Canada) then mixed 1:1 with 0.9% saline. Preliminary tests to determine doses and durations of VCD exposures that reduce follicle populations from 50-99% were performed on groups of 4 mice, with doses of 80-160 mg/kg/d VCD for 4-20 days (Table 1). Subsequently, groups of 4-5 mice were exposed by ip injection to either the vehicle (1:1 DMSO:0.9% saline) for 20 days, or to VCD for 4 days (160mg/kg/d), 6 days (80mg/kg/d) and 20 days (160 mg/kg/d). A pre-exposure blood sample was collected from each mouse from the sub-mandibular vein in the cheek just before the first exposure. Mice were weighed each day during exposures. The estrus cycle of mice was assessed for five days prior to sacrifice on days 41 or 61 by microscopic examination of vaginal lavages as described previously for rats (Goldman *et al.* 2007). Terminal blood collections were carried out by cardiac puncture with heparinized syringes under anesthesia with isoflurane at 21, 41 and 61 days after start of exposures, after which ovaries, uterus, liver, spleen and kidneys of each mouse were removed and weighed. Ovaries were immediately placed in Bouin's fixative and processed for histology. Blood samples were kept at 4°C overnight and serum was isolated the next day and conserved at -20°C until measurement of hormone levels.

Histology and Ovarian Follicle Counts

Histology and serial sectioning (5 µm sections) were performed on one ovary per mouse, and follicle counts were performed by two observers blinded to sample identity, as described previously (Sahambi *et al.* 2008; Mayer *et al.* 2002).

Hormonal Measurements

AMH serum levels were measured by an in-house AMH ELISA assay as described previously (Kevenaar *et al.* 2006; Visser *et al.* 2007). Mean inter-assay and intra-assay coefficients of variation were less than 5%. E_2 and Inhibin B serum levels were measured by commercial RIA and ELISA assays respectively (Beckman Coulter, Missisauga, ON, Canada) according to the manufacturer's directions with a modified volume of 100µl for the assessments. Mean inter- and intra-assay coefficient of variation were, respectively 5% and 9% for E_2 and less

than 9% for Inhibin B. FSH serum levels were measured in 50-100µl of samples by RIA assay, as described previously (Mayer *et al.* 2004; Greenfeld *et al.* 2007). Mean inter-assay and intra-assay coefficient of variation were respectively 2.9% and 2.4%. Samples whose values were below the detection limit were included in analyses as having a concentration of zero.

Western blot for analysis of ovarian AMH levels

10 µl of ovary homogenate sample was mixed with 10µl 2X Laemmli sample loading buffer (100 mM Trizma-HCl, 20% glycerol, 10% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 0.5% bromophenol blue), heated at 100°C for 10 min, and separated on a 5-20% gradient SDS-polyacrylamide gel for 90min at 120V. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane at 100V for 1h. The membrane was blocked with 5% skim milk in TBST (137 mM NaCl, 20mM Trizma-HCl, 0.1% Tween-20) for 1h, and then incubated overnight at 4°C with anti-AMH antibody (1:2,500, Serotec, Oxford, UK) in TBST. The primary antibody was detected using horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse secondary antibody (1:20,000, Vector laboratories, Burlingame, CA) in TBST, followed by Immun-Star HRP substrate (Biorad, Hercules, CA) according manufacturer's instructions. Membranes were then stripped for 10 min at 65°C (6% SDS, 2% β-mercaptoethanol, 1mM Tris-HCl), and reprobed for β-actin (primary antibody used at 1:20,000, 1h at room temperature). Subsequent steps were the same as above. Bands were detected on a chemiluminometer, and densitometry of bands was performed using Alpha Ease FC software (Alpha Innotec Corporation, version 6.0.0), normalizing AMH levels to β-actin.

Primary granulosa cell culture, and COV434, and KK-1 culture and exposures

Ovaries from female CD-1 mice (26 days of age) were placed in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 0.5% penicillin/streptomycin (10,000 U/ml, 10,000 µg/ml streptomycin; Invitrogen), 0.25% fungizone (250 µg/ml amphotericin B; Invitrogen), and 10mM HEPES (pH 7.3). Granulosa cells were collected by follicle puncture, as described previously (Boone et al. 1997; Orimoto et al. 2008). Granulosa cells were centrifuged at 900g for 10 min, then resuspended in culture medium (described above) without HEPES. Cell viability was always above 50% as assessed by Trypan blue exclusion. Culture medium was changed after 24h to remove non-attached cells. COV434 and KK-1 were cultured in DMEM/F-12 with L-glutamine

(Invitrogen) supplementend with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin (10,000 U/ml, 10,000 µg/ml streptomycin; Invitrogen). For assessment of cytotoxicity of VCD, cells plated at a density of 40,000 cells/well in 96-well plates were exposed to VCD at 0, 30, 75, 250, 500 or 1000µM during 48h, changing the medium after 24h. The *in vitro* toxicology assay kit, XTT based was used to determine cell viability according to the manufacturer's instructions. XTT was added to the medium during the last 24h of exposure. Absorbance readings were performed according manufacturer's instructions on a 96-well plate reader. For Western blot analyses and RNA extraction, cells cultured in 6-well plates at a density of 400,000 viable cells/well were exposed to VCD (30 µM) or normal culture medium. Medium, with or without VCD, was replaced after 24h, and cells were collected at 48h and conserved at -80°C until analysis.

Quantification of AMH mRNA by real-time RT-PCR

Total RNA was extracted from cultured granulosa cells exposed or not to VCD using a total RNA extraction kit following manufacturer's instructions (Total RNA extraction, Sigma-aldrich). 500 ng of RNA was reverse transcribed using 0.5 µg of oligo-dT (Invitrogen), 50 units of MMLV reverse-transcriptase, 25mM $MgCl_2$, 10 mM dNTPs, 20 units Ribonuclease inhibitor and 1X RT buffer in a total volume of 20ul. Reactions were performed at 42°C for 2h. RT product was diluted 5-fold in water, and real-time PCR amplification was carried out with 2ul of the dilution per reaction, in triplicate using specific primer for AMH and β-actin and the Platinum SYBR Green qPCR supermix UDG (Invitrogen). Primer sequences, annealing temperatures and product sizes are given in Table 2. Real-time PCR cycles were performed as follows: 94°C for 5min, followed by 50 cycles of: 56°C for 30 sec, 60°C for 45 sec. Fluorescence was captured using the iCycler iQ real-time detection system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Fifteen µl of PCR products from one of the triplicate were visualized on a 2% agarose gel to confirm their specificity and size.

Statistics

Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test using GraphPad Prism (version 5, San Diego CA). A p value less than 0.05 was considered statistically significant. Correlations were assessed using the Pearson correlation test.

Results

Characterization of dose-dependent reductions in follicle numbers.

Multiple VCD dosing regimens were tested to induce loss of primordial follicles of approximately 40-50%, 75-85% and 95-100% in order to develop a model for testing the sensitivity of biomarkers of ovarian follicle populations. Primordial and small primary follicle loss in response to VCD was both dose- and exposure duration-dependent (Table 1). Exposure to 160 mg/kg/d for only 15 days did not achieve the desired maximal follicle loss (89-92% reduction in primordial follicles), but 20 days of such exposure reduced these follicle populations to 1-2% compared to controls. Eighty mg/kg/d for 10 or 12 days caused more primordial follicle loss than desired (70-75% compared to controls), but 6 days of this dose caused approximately 50% loss of primordial follicles. There was little difference in effect in dosing with 160 mg/kg/d for between 4 and 8 days, although 4 days of exposure gave results closer to those desired. The dosing regimens of 80 mg/kg/d for 6 days, and 160 mg/kg/d for 4 or 20 days were chosen as giving a good range of follicle loss.

For mice exposed to the above dosing regimens of VCD, body weights were not significantly different among treatment groups either during exposures or at the times of sacrifice (data not shown). There were also no alterations in the estrous cycle the week before sacrifices on days 41 or 61 following VCD exposures (data not shown). No significant differences in weights of liver, kidney, spleen or uterus were observed among the various treatment groups at any time point examined ($p>0.05$; Table 3). Primordial and primary follicle numbers were significantly decreased in all VCD-treated groups compared to vehicle-treated groups since day 21 time point ($p<0.0001$; Fig. 1A-B). Starting at 41 days after start of exposures, secondary follicle numbers were significantly reduced for all VCD-treated groups ($p<0.0001$; Fig 1C). Antral follicle numbers decreased significantly at the 61 day time point, and only for mice exposed for 20 days to 160 mg/kg/d VCD ($p<0.05$; Fig. 1D). At all time points there was a statiscally significant correlation ($p<0.05$, Pearson Test) between small (primordial and small primary) and growing follicles numbers (Fig. 2).

Effects of VCD on circulating hormone levels

Serum AMH, E_2, FSH and inhibine B were measured for each mouse on days 21, 41, and 61 after the start of VCD exposures. There were no significant alterations in circulating levels of any of these hormones in VCD-treated mice on d21, when compared to vehicle-treated mice (Fig. 3). On both d41 and d61, all of the VCD-treated groups had significantly decreased serum AMH levels compared to control groups (Fig. 3a). At 41 and 61 days after VCD exposures, AMH levels were below the detection limit for all mice exposed to 160mg/kg/d for 20 days. Serum inhibin B levels were significantly reduced at 41 days in all VCD-treated groups and were undetectable at 61d in mice given 160mg/kg/d for 20 days (Fig. 3b). In contrast, there were no significant changes at 61d in mice with shorter exposures, compared to controls. At 21d, approximately 40% of the samples were below the limit of detection; 26% and 40% at 41 and 61 days respectively were also below the limit. There were no significant differences in circulating FSH levels of VCD-treated mice from controls, except for groups treated with 160 mg/kg/d VCD for 20d, which were significantly increased on days 41 and 61 (Fig. 3c). Serum E_2 levels did not show significant changes among treatment groups at any time point (Fig. 3d), although most (approximately 80%) of samples were below the detection limit at 21d.

To evaluate how well circulating AMH levels correlated with follicle numbers of primordial and growing follicles, Pearson correlations were performed. For primordial follicles, correlations were statistically significant for all time points (Fig. 4A-Annexe 1). Growing follicles were correlated with circulating AMH levels than primordial follicles (Fig. 4B).

Ovarian AMH protein expression following mice VCD exposures

Western-blot analysis of ovarian AMH protein abundance detected the mature form (25kDa) as well as the pro (55kDa) and pre-pro-form (70kDa), without other major bands being observed. There were no significant changes in abundance of the mature and precursor forms of AMH in ovaries at either 21d or 41d in VCD-treated mice compared to control mice (Fig. 5).

Granulosa cell, COV434 and KK-1 viability, AMH mRNA and protein expression following VCD exposures

The sensitivity of cultured granulosa cells and granulosa cell lines to exposures to VCD were tested to determine if there are direct effects of such an exposure on viability or AMH expression.

In cultured rat ovaries exposed to 30μM of VCD *in vitro*, we observed significant decreases in primordial and primary follicle numbers (Devine *et al.* 2002). However, when isolated murine granulosa cells were exposed to VCD *in vitro*, no significant decreases in their viability were observed until 500μM VCD ($p<0.001$, Fig. 6A). COV434 and KK-1 granulosa cell lines showed a significant decreases in their viability only when they were exposed to >1000μM of VCD ($p<0.001$, Fig.6B-6C). Exposure of granulosa cell to VCD *in vitro* did not significantly alter the expression level of AMH gene compare to control ($p>0.05$, Fig.7).

Discussion

Several circulating biomarkers commonly used in the clinical setting to characterize changes in ovarian function were tested in a mouse model of ovarian injury to determine their ability to reflect changes in follicle populations. Serum levels of AMH, inhibin B, FSH and E_2 were all followed in the same individuals so that direct comparisons could be made among these hormones. Results demonstrated that numbers of most follicle types were best correlated with serum AMH levels. Circulating inhibin B correlated well with changes in follicle populations on day 41 only, and serum FSH was elevated only following almost complete follicle loss. In contrast to these changes, none of the hormones tested changed shortly after induction of primordial and small primary follicle loss (day 21). Overall results roughly mimic what is observed in the clinical setting, although it is not possible to correlate ovarian status with circulating hormone levels.

No adverse effects were found in VCD-treated mice even at the higher doses at the differents time points examined. VCD induced a decrease of growing follicles only via a decrease of primordial follicle number such as mentioned in previous studies (Kao *et al.* 1999; Devine *et al.* 2004; Sahambi *et al.* 2008).

None of the hormones tested appear to be directly linked to primordial follicle numbers. The lack of hormonal changes on day 21 after start of exposures is likely due to two factors. First, there is a delay between initial exposures and start of small follicle loss. Even with a single exposure of VCD that causes 80% follicle loss *in vivo*, significant changes in follicle numbers are not observed until 6 days later (Devine *et al.* 2004). A similar delay is observed *in vitro* (Devine *et al.* 2004). Second, none of the hormones measured are produced by primordial follicles and only minimal AMH is produced by small primary follicles. Alternative techniques (e.g. proteomics of serum and ovarian samples, microarray analysis of ovarian gene expression) will be necessary to better explore possible biomarkers of primordial follicles. Models such as that tested here will help make such analyses as specific as possible to identify such markers.

As previously reported by others, the number of growing follicle is correlated to the size of the primordial follicle pool (Gougeon, 1996; Scheffer *et al.* 1999). We also observed a strong correlation between small and growing follicle numbers on days 41 and 61, regardless of exposure. This data suggests that the rate of activation and growth of follicles is a dynamic process in which adjustments occur relatively rapidly. This fact could be considered as normal

but because we decreased rapidly the number of follicle (compare to the normal process of ovarian ageing), it is surprising that the rate of primordial follicle number compare to growing follicle decreases. It might be a manner to preserve fertility longer following ovarian injury than if the number of follicles being activated continued at the same rate as in healthy ovaries. This model of ovarian toxicity could be used to study such changes as a way to examine the underlying mechanisms of how primordial follicles are activated to develop.

To the best of our knowledge, hormonal changes were due to modifications in follicle numbers and not to any other possible effects of VCD. This idea is supported by the timing of hormonal changes, i.e. 20 days after exposures were completed, as well as by analysis of AMH expression. Previous studies have demonstrated that a concentration of 30μM can induce complete follicle loss in ovaries of rats cultured *in vitro* (Devine *et al.* 2002). Only at concentrations ten-fold higher than that, 500μM or higher, were negative effects on granulosa cell viability observed whereas 1mM is required to induce a significant decrease of COV434 and KK-1 viability. Furthermore, no changes were observed in AMH protein levels in the ovary 21 days after start of exposure. This suggests that VCD does not have a direct effect on AMH expression. This hypothesis is confirmed by the fact that no significant changement was observed in the mRNA level expression of AMH in granulosa cell exposed to VCD at 30μM compared to vehicule-treated cell. Thus, VCD-induced ovarian injury provides a good model for testing biomarkers of fertility or follicle numbers.

Overall, compared to serum inhibin B, E_2 and FSH levels, circulating AMH is the most consistent, reliable biomarker for assessing changes in primordial follicles. This result is in accordance with results of epidemiological studies (Bath *et al.* 2003; Anderson *et al.* 2006; Burger *et al.* 2007; Lie Fong *et al.* 2008; Rohr *et al.* 2008). E_2, inhibin B and FSH are less suitable than AMH due to their variability in the menstrual cycle, their insensitivity to quantitative changes in follicle numbers, and their lack of a physiological link to small follicles. AMH secretion has been reported to be independent of the estrus cycle (La Marca *et al.* 2006; Hehenkamp *et al.* 2006; Tsepelidis *et al.* 2007). Also, its role in the inhibition of primordial follicle recruitment and the sensitivity of the follicle to FSH have been suggested (Durlinger *et al.* 1999; Durlinger *et al.* 2002; Durlinger *et al.* 2001; Durlinger *et al.* 2002). However our results did not show a correlation between serum AMH and FSH levels (data not shown). Although serum AMH levels are correlated with primordial follicle numbers, changes occur only at time

points at which significant decreases in secondary follicles where observed. In mice, secondary follicles are the follicle types which contribute most to AMH secretion (Durlinger *et al.* 2002; Weenen *et al.* 2004), therefore, serum AMH levels might be a good direct biomarker for growing follicles and an indirect biomarker for primordial follicles. The most important follicle population for long-term fertility is the primordial follicle pool, so other possible clinical biomarkers need to be sought for this follicle stage. Currently, we have no tools to monitor toxicity to primordial follicles in women. Effects will only be observed when there is a severe effect on reproduction or the menstrual cycle, at which point it is too late to intervene to protect exposed women.

Previous studies demonstrated that serum AMH levels reflect the ovarian follicle reserve by examining mice as they age (Kevenaar *et al.* 2006). The current experimental model has allowed us to look more closely at biomarkers of small follicles by quantitatively modulating ovarian follicle numbers using VCD, because of its specificity. This model should provide a useful tool to identify possible biomarkers for ovarian follicles in the future. Other chemicals, such as the antral follicle-depleting compound methoxychlor, could be used to modify populations of large growing follicles, as well. The field of reproductive toxicology and infertility clinics has a need for better ways to determine long-term fertility. These studies have provided some advancement in testing current biomarkers, but further work is needed to determine the usefulness of AMH as a predicator of the long-term fertility in woman.

Acknowledgements
The authors want to thank Dr Robert Viger for technical support for EMSA, the Quebec Network for research in reproduction (RQR) which provides funding for student technical instruction, Dr Frank de Jong and Dr Huhtaniemi for providing the COV434 and KK-1 cell line respectively. TJC want to thank RQR and Armand Frappier Foundation for their grants.

References

Anderson RA, Themmen AP, Al-Qahtani A, Groome NP, Cameron DA, 2006. The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer. Hum Reprod 21:2583-92

Antonicelli R, Olivieri F, Morichi V, Urbani E, Mais V, 2008. Prevention of cardiovascular events in early menopause: a possible role for hormone replacement therapy. Int J Cardiol 130:140-6

Bath LE, Wallace WH, Shaw MP, Fitzpatrick C, Anderson RA, 2003. Depletion of ovarian reserve in young women after treatment for cancer in childhood: detection by anti-Mullerian hormone, inhibin B and ovarian ultrasound. Hum Reprod 18:2368-74

Block E, 1953. A quantitative morphological investigation of the follicular system in newborn female infants. Acta Anat (Basel) 17:201-6

Boone DL, Carnegie JA, Rippstein PU, Tsang BK, 1997. Induction of apoptosis in equine chorionic gonadotropin (eCG)-primed rat ovaries by anti-eCG antibody. Biol Reprod 57:420-7

Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB, 2006. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. Hum Reprod Update 12:685-718

Broekmans FJ, Scheffer GJ, Bancsi LF, Dorland M, Blankenstein MA, te Velde ER, 1998. Ovarian reserve tests in infertility practice and normal fertile women. Maturitas 30:205-14

Burger HG, Hale GE, Robertson DM, Dennerstein L, 2007. A review of hormonal changes during the menopausal transition: focus on findings from the Melbourne Women's Midlife Health Project. Hum Reprod Update 13:559-65

Devine PJ, Sipes IG, Hoyer PB, 2004. Initiation of delayed ovotoxicity by in vitro and in vivo exposures of rat ovaries to 4-vinylcyclohexene diepoxide. Reprod Toxicol 19:71-7

Devine PJ, Sipes IG, Skinner MK, Hoyer PB, 2002. Characterization of a rat in vitro ovarian culture system to study the ovarian toxicant 4-vinylcyclohexene diepoxide. Toxicol Appl Pharmacol 184:107-15

Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP, 2002. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. Endocrinology 143:1076-84

Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP, 2001. Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. Endocrinology 142:4891-9

Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP, 1999. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. Endocrinology 140:5789-96

Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP, 2002. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. Reproduction 124:601-9

Elting MW, Korsen TJ, Schoemaker J, 2001. Obesity, rather than menstrual cycle pattern or follicle cohort size, determines hyperinsulinaemia, dyslipidaemia and hypertension in ageing women with polycystic ovary syndrome. Clin Endocrinol (Oxf) 55:767-76

Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF, 1992. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. Hum Reprod 7:1342-6

Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J, 2003. Serum anti-Mullerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. Hum Reprod 18:323-7

Flaws JA, Doerr JK, Sipes IG, Hoyer PB, 1994. Destruction of preantral follicles in adult rats by 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide. Reprod Toxicol 8:509-14

Forabosco A, Sforza C, De Pol A, Vizzotto L, Marzona L, Ferrario VF, 1991. Morphometric study of the human neonatal ovary. Anat Rec 231:201-8

Fortune JE, 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. Anim Reprod Sci 78:135-63

Gnoth C, Schuring AN, Friol K, Tigges J, Mallmann P, Godehardt E, 2008. Relevance of anti-Mullerian hormone measurement in a routine IVF program. Hum Reprod 23:1359-65

Goldman JM, Murr AS, Cooper RL, 2007. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 80:84-97

Gougeon A, 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. Endocr Rev 17:121-55

Gougeon A, Lefevre B, 1984. Histological evidence of alternating ovulation in women. J Reprod Fertil 70:7-13

Greenfeld CR, Babus JK, Furth PA, Marion S, Hoyer PB, Flaws JA, 2007. BAX is involved in regulating follicular growth, but is dispensable for follicle atresia in adult mouse ovaries. Reproduction 133:107-16

Hall JE, Schoenfeld DA, Martin KA, Crowley WF Jr, 1992. Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone secretion and follicle-stimulating hormone dynamics during the luteal-follicular transition. J Clin Endocrinol Metab 74:600-7

Hehenkamp WJ, Looman CW, Themmen AP, de Jong FH, Te Velde ER, Broekmans FJ, 2006. Anti-Mullerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. J Clin Endocrinol Metab 91:4057-63

Hirshfield AN, 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. Int Rev Cytol 124:43-101

Hodis HN, Mack WJ, 2008. Postmenopausal hormone therapy and cardiovascular disease in perspective. Clin Obstet Gynecol 51:564-80

Hoyer PB, Devine PJ, Hu X, Thompson KE, Sipes IG, 2001. Ovarian toxicity of 4-vinylcyclohexene diepoxide: a mechanistic model. Toxicol Pathol 29:91-9

Hoyer PB, Sipes IG, 1996. Assessment of follicle destruction in chemical-induced ovarian toxicity. Annu Rev Pharmacol Toxicol 36:307-31

Jick H, 1979. Cigarette Smoking and Early Menopause. West J Med 130:235

Jick H, Porter J, 1977. Relation between smoking and age of natural menopause. Report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program, Boston University Medical Center. Lancet 1:1354-5

Josso N, 1992. Anti-mullerian hormone and Sertoli cell function. Horm Res 38 Suppl 2:72-6

Josso N, Clemente N, 2003. Transduction pathway of anti-Mullerian hormone, a sex-specific member of the TGF-beta family. Trends Endocrinol Metab 14:91-7

Josso N, Picard JY, Tran D, 1977. The anti-Mullerian hormone. Birth Defects Orig Artic Ser 13:59-84

Kao SW, Sipes IG, Hoyer PB, 1999. Early effects of ovotoxicity induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide in rats and mice. Reprod Toxicol 13:67-75

Kevenaar ME, Meerasahib MF, Kramer P, van de Lang-Born BM, de Jong FH, Groome NP, Themmen AP, Visser JA, 2006. Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. Endocrinology 147:3228-34

Kinney A, Kline J, Kelly A, Reuss ML, Levin B, 2007. Smoking, alcohol and caffeine in relation to ovarian age during the reproductive years. Hum Reprod 22:1175-85

Koh JM, Kim CH, Hong SK, Lee KU, Kim YT, Kim OJ, Kim GS, 1998. Primary ovarian failure caused by a solvent containing 2-bromopropane. Eur J Endocrinol 138:554-6

La Marca A, Stabile G, Artenisio AC, Volpe A, 2006. Serum anti-Mullerian hormone throughout the human menstrual cycle. Hum Reprod 21:3103-7

Lambalk CB, de Koning CH, Flett A, Van Kasteren Y, Gosden R, Homburg R, 2004. Assessment of ovarian reserve. Ovarian biopsy is not a valid method for the prediction of ovarian reserve. Hum Reprod 19:1055-9

Larsen EC, Muller J, Schmiegelow K, Rechnitzer C, Andersen AN, 2003. Reduced ovarian function in long-term survivors of radiation- and chemotherapy-treated childhood cancer. J Clin Endocrinol Metab 88:5307-14

Lee MM, Donahoe PK, 1993. Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. Endocr Rev 14:152-64

Lie Fong S, Lugtenburg PJ, Schipper I, Themmen AP, de Jong FH, Sonneveld P, Laven JS, 2008. Anti-mullerian hormone as a marker of ovarian function in women after chemotherapy and radiotherapy for haematological malignancies. Hum Reprod 23:674-8

Mayer LP, Devine PJ, Dyer CA, Hoyer PB, 2004. The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. Biol Reprod 71:130-8

Mayer LP, Pearsall NA, Christian PJ, Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Marion SL, Sipes IG, Hoyer PB, 2002. Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. Reprod Toxicol 16:775-81

McGee EA, Hsueh AJ, 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocr Rev 21:200-14

Orimoto AM, Dumaresq-Doiron K, Jiang JY, Tanphaichitr N, Tsang BK, Carmona E, 2008. Mammalian hyaluronidase induces ovarian granulosa cell apoptosis and is involved in follicular atresia. Endocrinology 149:5835-47

Pouilles JM, Tremollieres F, Bonneu M, Ribot C, 1994. Influence of early age at menopause on vertebral bone mass. J Bone Miner Res 9:311-5

Rohan TE, Negassa A, Chlebowski RT, Lasser NL, McTiernan A, Schenken RS, Ginsberg M, Wassertheil-Smoller S, Page DL, 2008. Estrogen plus progestin and risk of benign proliferative breast disease. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 17:2337-43

Rohr J, Allen EG, Charen K, Giles J, He W, Dominguez C, Sherman SL, 2008. Anti-Mullerian hormone indicates early ovarian decline in fragile X mental retardation (FMR1) premutation carriers: a preliminary study. Hum Reprod 23:1220-5

Roseff SJ, Bangah ML, Kettel LM, Vale W, Rivier J, Burger HG, Yen SS, 1989. Dynamic changes in circulating inhibin levels during the luteal-follicular transition of the human menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab 69:1033-9

Sahambi SK, Visser JA, Themmen AP, Mayer LP, Devine PJ, 2008. Correlation of serum anti-Mullerian hormone with accelerated follicle loss following 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced follicle loss in mice. Reprod Toxicol 26:116-22

Sallmen M, Lindbohm ML, Kyyronen P, Nykyri E, Anttila A, Taskinen H, Hemminki K, 1995. Reduced fertility among women exposed to organic solvents. Am J Ind Med 27:699-713

Scheffer GJ, Broekmans FJ, Dorland M, Habbema JD, Looman CW, te Velde ER, 1999. Antral

follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. Fertil Steril 72:845-51

te Velde ER, Pearson PL, 2002. The variability of female reproductive ageing. Hum Reprod Update 8:141-54

Tremellen KP, Kolo M, Gilmore A, Lekamge DN, 2005. Anti-mullerian hormone as a marker of ovarian reserve. Aust N Z J Obstet Gynaecol 45:20-4

Tsepelidis S, Devreker F, Demeestere I, Flahaut A, Gervy Ch, Englert Y, 2007. Stable serum levels of anti-Mullerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo-ovulatory women. Hum Reprod 22:1837-40

Umland EM, 2008. Treatment strategies for reducing the burden of menopause-associated vasomotor symptoms. J Manag Care Pharm 14:14-9

Utian WH, Archer DF, Bachmann GA, Gallagher C, Grodstein F, Heiman JR, Henderson VW, Hodis HN, Karas RH, Lobo RA, Manson JE, Reid RL, Schmidt PJ, Stuenkel CA, 2008. Estrogen and progestogen use in postmenopausal women: July 2008 position statement of The North American Menopause Society. Menopause 15:584-602

van Disseldorp J, Faddy MJ, Themmen AP, de Jong FH, Peeters PH, van der Schouw YT, Broekmans FJ, 2008. Relationship of serum antimullerian hormone concentration to age at menopause. J Clin Endocrinol Metab 93:2129-34

van Rooij IA, Broekmans FJ, Scheffer GJ, Looman CW, Habbema JD, de Jong FH, Fauser BJ, Themmen AP, te Velde ER, 2005. Serum antimullerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. Fertil Steril 83:979-87

Vega EM, Egea MA, Mautalen CA, 1994. Influence of the menopausal age on the severity of osteoporosis in women with vertebral fractures. Maturitas 19:117-24

Visser JA, Durlinger AL, Peters IJ, van den Heuvel ER, Rose UM, Kramer P, de Jong FH, Themmen AP, 2007. Increased oocyte degeneration and follicular atresia during the estrous cycle in anti-Mullerian hormone null mice. Endocrinology 148:2301-8

Visser JA, Themmen AP, 2005. Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. Mol Cell Endocrinol 234:81-6

Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC, Themmen AP, 2004. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. Mol Hum Reprod 10:77-83

Westhoff C, Murphy P, Heller D, 2000. Predictors of ovarian follicle number. Fertil Steril 74:624-8

Winslow KL, Toner JP, Brzyski RG, Oehninger SC, Acosta AA, Muasher SJ, 1991. The gonadotropin-releasing hormone agonist stimulation test--a sensitive predictor of performance in the flare-up in vitro fertilization cycle. Fertil Steril 56:711-7

Yeh J, Kim B, Liang YJ, Peresie J, 2006. Mullerian inhibiting substance as a novel biomarker of cisplatin-induced ovarian damage. Biochem Biophys Res Commun 348:337-44

Table 1. Results of preliminary experiments designed to determine the dose and duration of VCD exposure required to cause partial primordial and small primary follicle depletion.

Experiment	Duration (days)	Dose VCD (mg/kg/d)	Number of days dosing	Primordial follicles remaining (% of control)	Small Primary follicles remaining (% of control)	Growing Follicles remaining (% of control)
1	15	0	0	100	100	100
		80	12	31.8	38.9	77.1
		160	8	12.7	17.6	70.8
		160	15	8.1	11.8	61.4
2	20	0	0	100.0	100.0	100.0
		80	10	25.4	46.8	95.8
		160	6	11.6	33.8	72.2
		160	20	1.0	6.0	61.0
3	20	0	0	100.0	100.0	100.0
		80	6	45.3	61.4	87.3
		160	4	13.5	27.2	64.6
		160	20	1.8	5.7	51.1

Table 2. Details of primers used in real time RT-PCR.

Genes	Primers	Sequences (5'–3')	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)
AMH	F	GCAGTTGCTAGTCCTACATC	353	56
	R	TCATCCGCGTGAAACAGCG		
β-Actin	F	ATCGTGGGCCGCCCTAGGCACCA	148	56
	R	TCCATGTCGTCCCAGTTGGTAACAA		

Table 3. Organ and mice weights according to each treatment and time points. No significant difference (ANOVA, $p<0.05$, n=3).

	Treatments	Bodies (g)	Liver (g)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Uterus (mg)
21d	Control	27 ± 0,6	1,38 ± 0,04	352 ± 8	107 ± 7	80 ± 6
	80mg/kg/d, 6d	27 ± 0,5	1,34 ± 0,04	325 ± 26	93 ± 2	107 ± 17
	160mg/kg/d, 4d	27± 0,5	1,30 ± 0,04	344 ± 7	94 ± 4	85 ± 5
	160mg/kg/d, 20d	26 ± 0,7	1,35 ± 0,04	385 ± 16	71 ± 4	76 ± 7
41d	Control	28 ± 0,7	1,39 ± 0,05	354 ± 8	96 ± 3	132 ± 19
	80mg/kg/d, 6d	28 ± 0,5	1,42 ± 0,03	374 ± 7	103 ± 4	139 ± 15
	160mg/kg/d, 4d	28 ± 0,7	1,35 ± 0,05	371 ± 14	118 ± 6	173 ± 15
	160mg/kg/d, 20d	28 ± 0,7	1,49 ± 0,03	377 ± 8	102 ± 9	99 ± 16
61d	Control	31 ± 0,6	1,46 ± 0,05	378 ± 12	116 ± 6	136 ± 15
	80mg/kg/d, 6d	29 ± 0,5	1,46 ± 0,07	373 ± 13	106 ± 6	122 ± 10
	160mg/kg/d, 4d	29 ± 0,5	1,35 ± 0,06	371 ± 17	118 ± 11	173 ± 54
	160mg/kg/d, 20d	29 ± 1	1,40 ± 0,04	365 ± 6	98 ± 5	94 ± 9

Legends:

Fig.1: Modulation of ovarian follicle populations induced by VCD exposures. CD-1 mice were exposed to 80-160 mg/kg/d of VCD or vehicle according to different duration of administration. After 21, 41,61 days following the first exposure, mice were sacrificed, follicles were counted in each ovary and classified as follow: (A) primordial, (B) primary, (C) secondary and (D) Antral. Effects of VCD exposures were assessed by one-way analysis of variance followed by Tukey's a *posteriori* test to determine significant differences between the treatments. Data represent means ± S.E.M. (n= 12-15 mice/group/time point). *$p<0.05$, significant difference between VCD- and vehicle-treated mice at the time point considered.

Fig.2: Correlations between small (primordial to small primary) and growing (large primary to antral) ovarian follicles from VCD- and vehicle-treated mice. Significance was tested by Pearson correlation analysis ($p<0.001$). Linear regression and correlation test were treatments independent.

Fig.3: Circulating AMH, Inhibin B, FSH and E2 levels assessed following VCD or vehicle exposures. Serum was collected from mice sacrificed 21, 41, 61 days after the first day of exposures. AMH and Inhibin B were measured by ELISA whereas FSH and E2 were measured by RIA (described in section 2). Differences between treatment groups were determined by by one-way analysis of variance followed by Tukey's a posteriori test to determine significant differences between the treatments. Data represent means ± S.E.M. (n= 8-14 mice/group/time point). * $p<0.05$, significant difference between VCD- and vehicle-treated mice at the time point and hormone considered.

Fig.4: Correlation between small or growing follicle number and serum AMH level of mice treatment-independent at 41d. Significance of correlations between primordial follicle number or growing follicle number and serum AMH level were determined by Pearson test ($p<0.0001$).

Fig.5: Western blot analysis of AMH forms in VCD- and vehicle treated mice at 21 and 41 days after the first day of exposure respectively. Expression of pre-pro-, pro- and AMH were quantified by densitometry and normalized to β-actin signal. One-way analysis of variance followed by Tukey's a *posteriori* test was performed to determine differences between VCD- and vehicle-treated mice. Data represent means ± S.E.M. (n= 6-10 mice/group/time point).

Fig.6: Cytotoxicity of 48h VCD exposures on murine primary granulosa cell (A), KK-1 (B) and COV434 (C) in culture. Cells were exposed to 30, 75, 250, 500 and 1000μM of VCD during 48h on a daily basis. To assess cytotoxicity of VCD, XTT solution was added to the medium the last 24h and absorbance lecture were performed. Effects of VCD exposures on granulosa cell viability were assessed by one-way analysis of variance followed by Tukey's a *posteriori* test was performed to determine differences between VCD- and vehicle-treated cells. Data represent means ± S.E.M. (n= 6/group/concentrations). * $p<0.05$, significant difference between VCD- and vehicle-treated cell.

Fig.7: Expression levels of anti-müllerian hormone in ovarian granulosa cells. Expression levels of AMH of not cultured granulosa cell, control (*white bar*) and VCD-treated (*gray bar*) granulosa cell in culture were analyzed by real-time RTPCR using primers shown in Table 2. Values were normalized to the _β-actin housekeeping gene and expressed as mean ±SEM (n 3–4 animals per group). *Asterisks* denote significant differences between not cultured granulosa cell and control or VCD-treated granuloasa cell ($p < 0.05$).

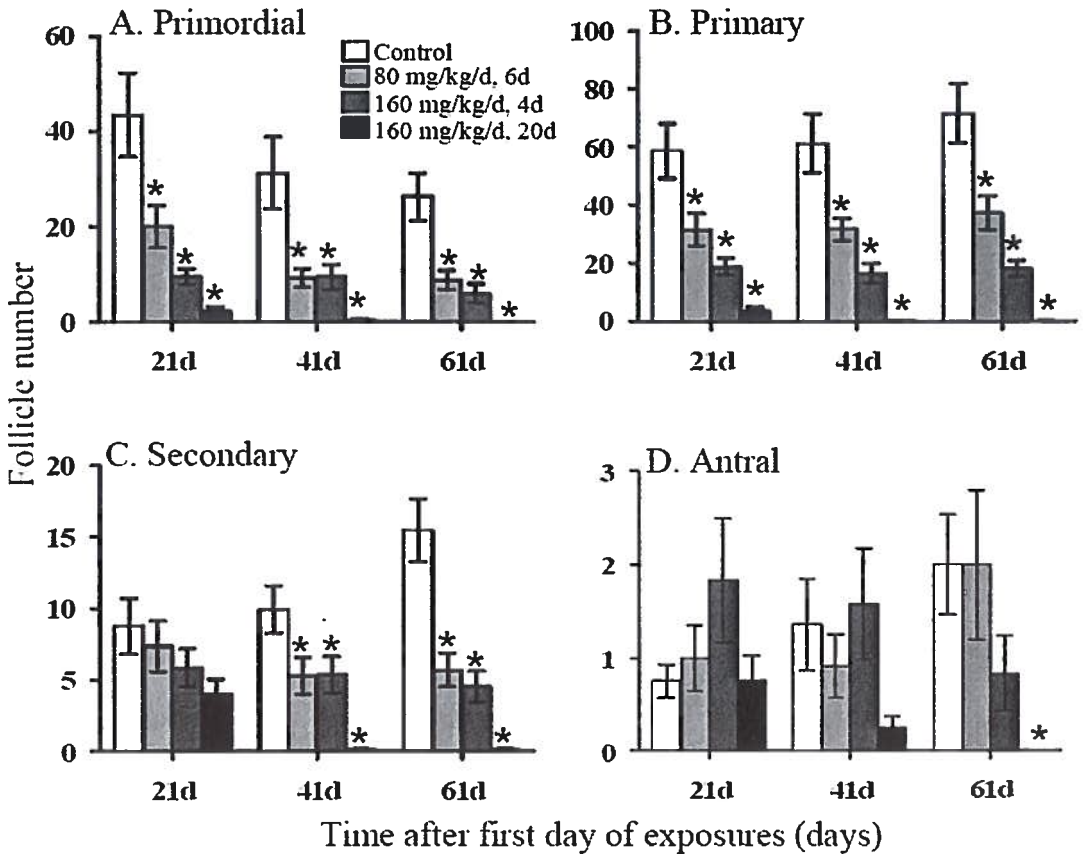
A. Primordial
B. Primary
C. Secondary
D. Antral
Control
80 mg/kg/d, 6d
160 mg/kg/d, 4d
160 mg/kg/d, 20d
Follicle number
21d
41d
61d
Time after first day of exposures (days)

Fig. 1

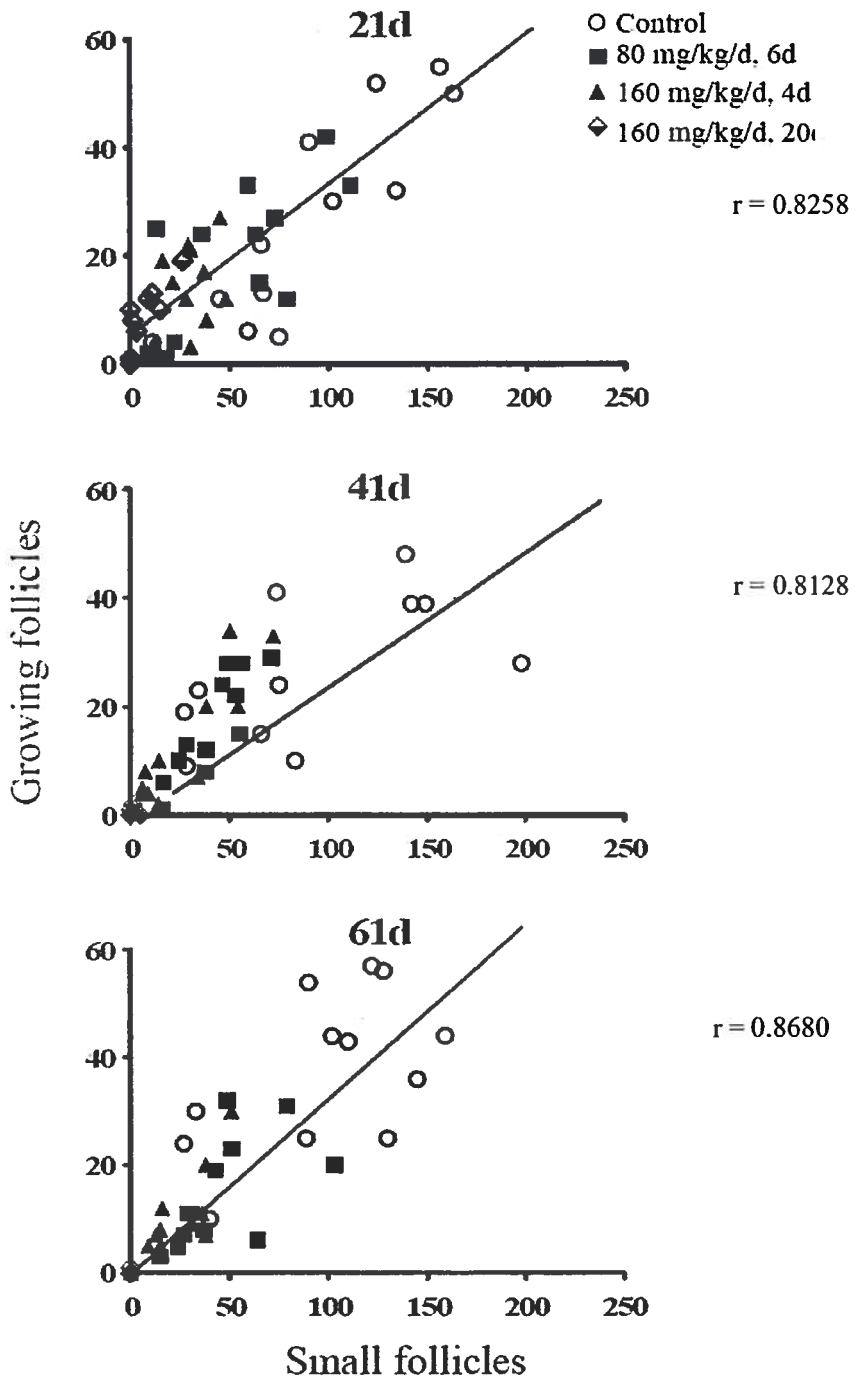
21d
Control
80 mg/kg/d, 6d
160 mg/kg/d, 4d
160 mg/kg/d, 20
r = 0.8258
41d
r = 0.8128
61d
r = 0.8680
Growing follicles
Small follicles
0
20
40
60
0
50
100
150
200
250

Fig: 2

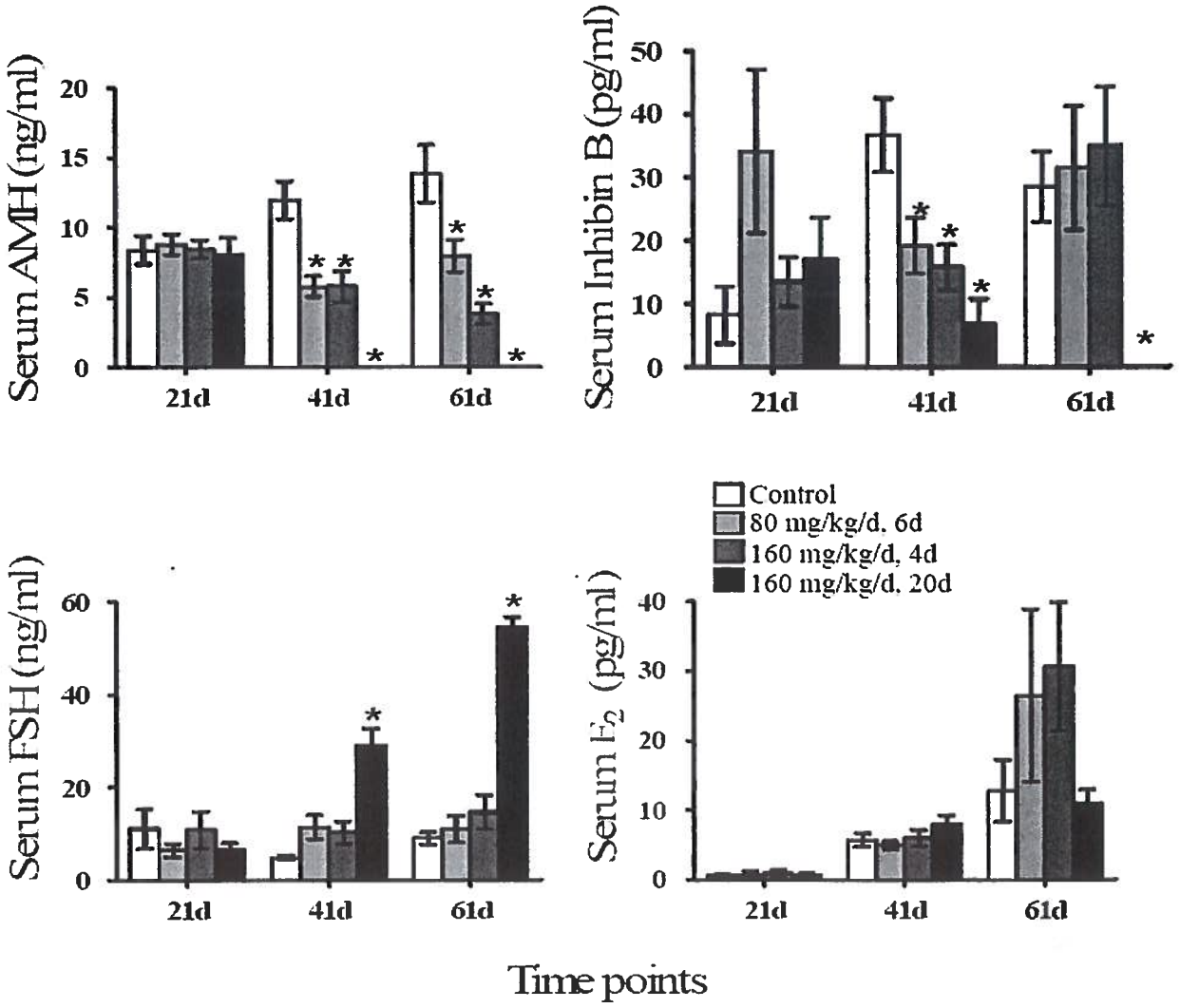
Serum AMH (ng/ml)
20
15
10
5
0
21d
41d
61d
Serum Inhibin B (pg/ml)
50
40
30
20
10
0
21d
41d
61d
Control
80 mg/kg/d, 6d
160 mg/kg/d, 4d
160 mg/kg/d, 20d
Serum FSH (ng/ml)
60
40
20
0
21d
41d
61d
Serum E2 (pg/ml)
40
30
20
10
0
21d
41d
61d
Time points

Fig. 3

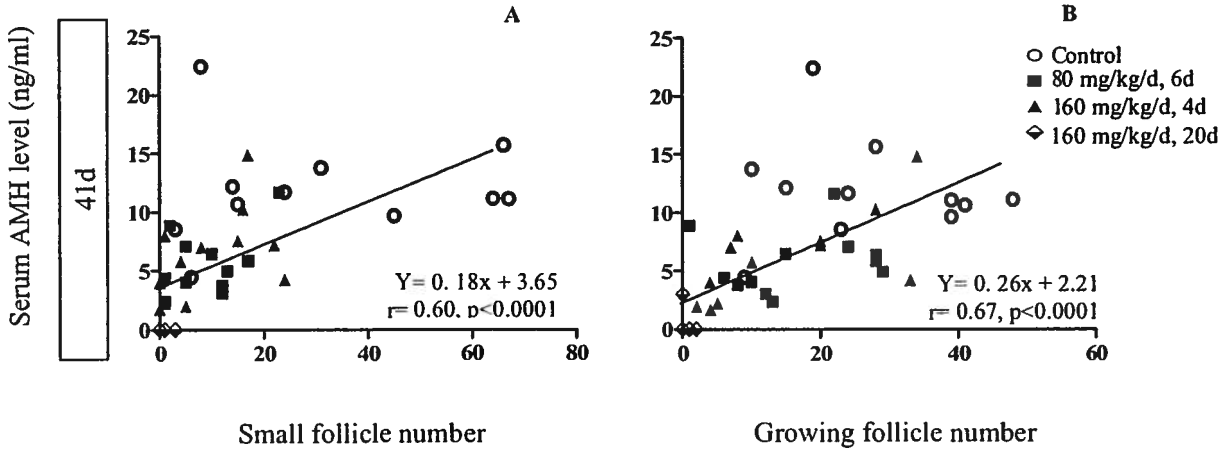
A
B
Serum AMH level (ng/ml)
41d
Y= 0. 18x + 3.65
r= 0.60, p<0.0001
Y= 0. 26x + 2.21
r= 0.67, p<0.0001
Control
80 mg/kg/d, 6d
160 mg/kg/d, 4d
160 mg/kg/d, 20d
Small follicle number
Growing follicle number

Fig. 4

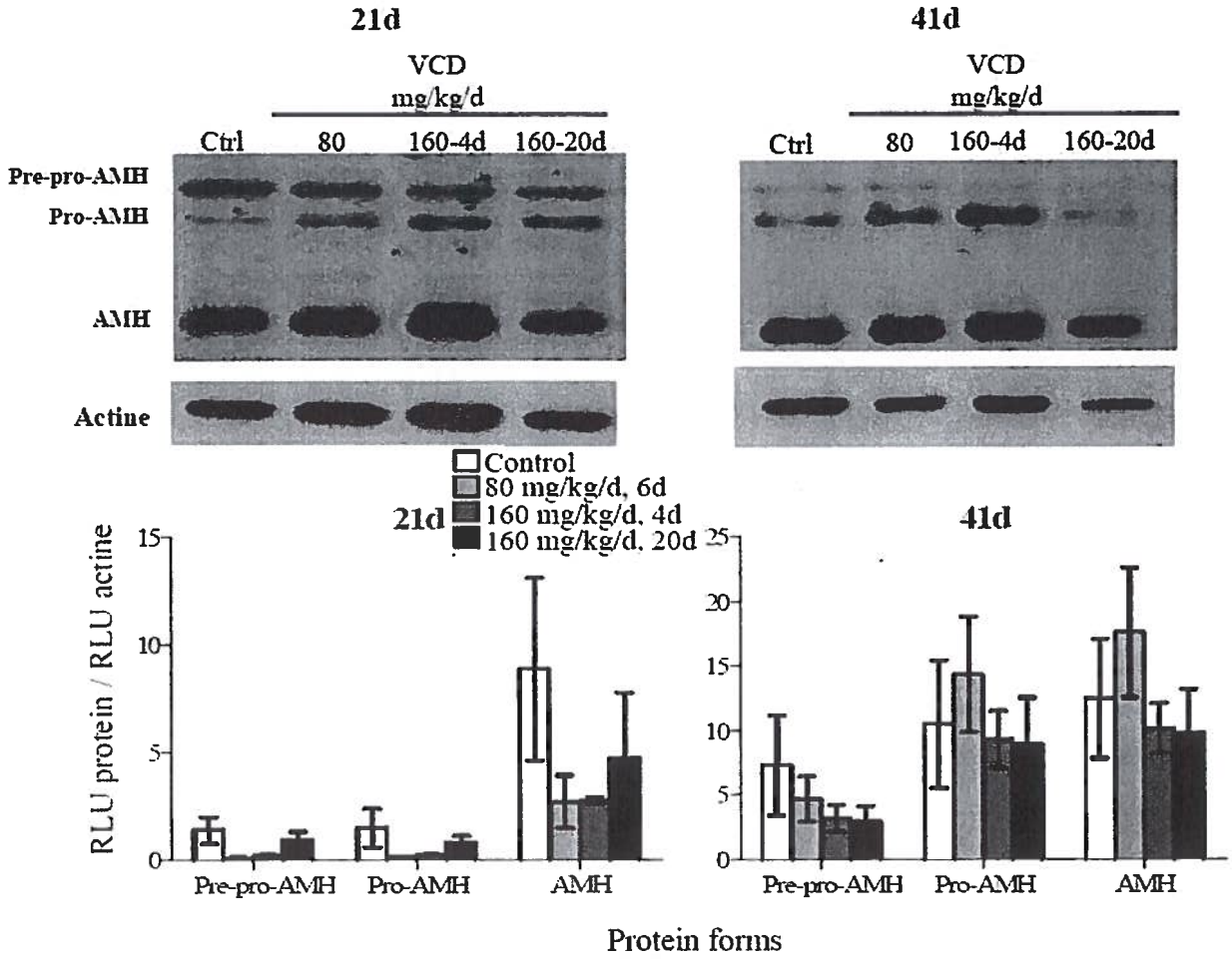
21d
41d
VCD
mg/kg/d
Ctrl
80
160-4d
160-20d
Pre-pro-AMH
Pro-AMH
AMH
Actine
Control
80 mg/kg/d, 6d
160 mg/kg/d, 4d
160 mg/kg/d, 20d
RLU protein / RLU actine
Pre-pro-AMH
Pro-AMH
AMH
Protein forms

Fig. 5

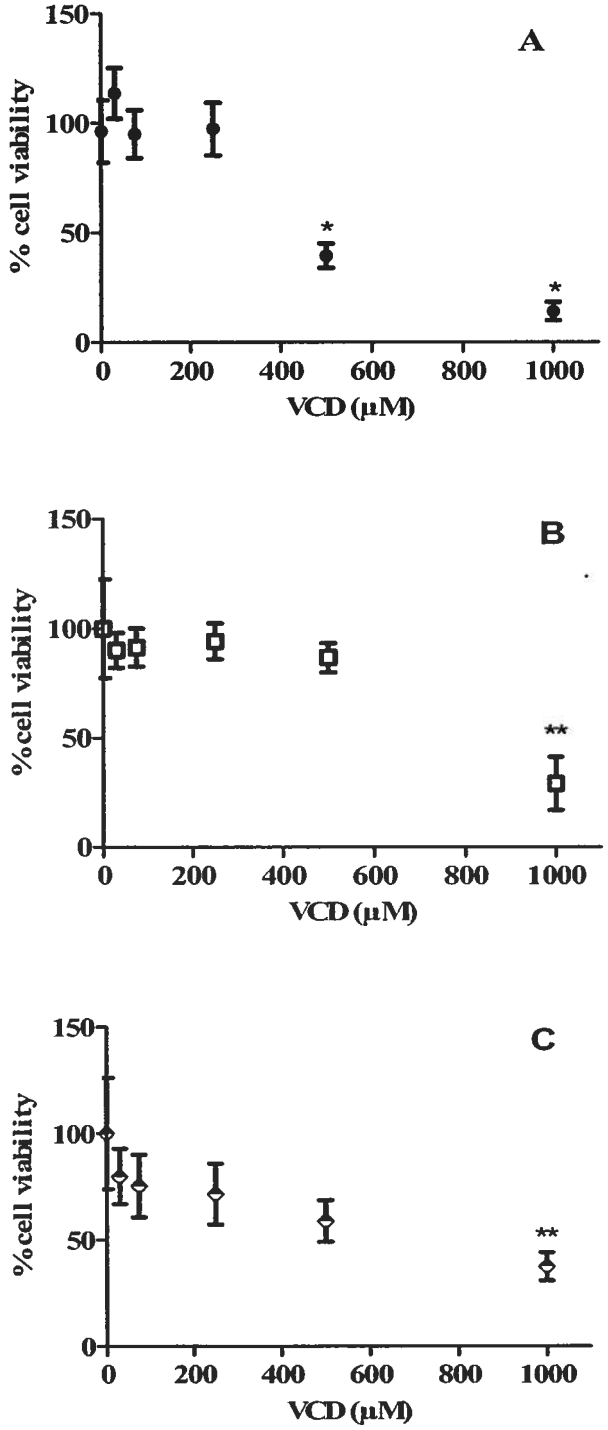
A
% cell viability
150
100
50
0
*
*
0
200
400
600
800
1000
VCD (μM)
B
%cell viability
150
100
50
0
**
0
200
400
600
800
1000
VCD (μM)
C
%cell viability
150
100
50
0
**
0
200
400
600
800
1000
VCD (μM)

Fig. 6

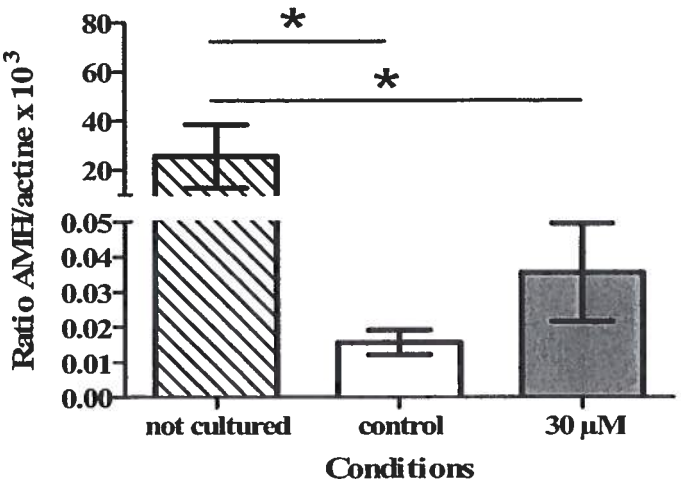
*
*
80
60
40
20
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
Ratio AMH/actine x 10^3
not cultured
control
30 µM
Conditions

Fig.7

III. Discussion générale

La comparaison de différents biomarqueurs de la réserve ovarienne produits par différents organes (ovaires et hypophyse) implique l'utilisation d'un modèle *in vivo*. Aucun système *in vitro* n'est capable de mimer l'endocrinologie d'un organisme dans sa globalité. La fidélité du système *in vivo* dans ce contexte vient du fait que ce système permet de conserver les interactions entre les différentes hormones. Plusieurs études ont démontré l'implication de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique dans la régulation de la synthèse de la FSH, inhibine B et E_2 (Broekmans *et al.* 1998; Perloe *et al.* 2000). Bien que la production d'AMH ne semble pas ni régulée par la FSH ni variée durant le cycle menstruel (Hehenkamp *et al.* 2006; La Marca *et al.* 2006; Tsepelidis *et al.* 2007). la comparaison de son taux sérique aux autres hormones précédemment citées nécessite la présence de toutes les composantes de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. Comparé aux ovaires adultes (études *in vivo*), les ovaires de souris néonatales (études *in vitro*) présentent une grande quantité de follicules primordiaux. Ces ovaires néonatales ne disposent que d'une petite quantité de follicules secondaire et aucun antraux à cause de l'absence de la FSH (Hirshfield, 1991; Gougeon, 1996; Desmeules & Devine, 2006;). En outre, l'AMH est produite par des follicules primaires à antraux, tandis que l'inhibine B et l'œstradiol sont produites en grande quantité par des follicules antraux. L'absence de follicules antraux n'aurait donc pas permis d'effectuer une comparaison entre le taux sérique d'AMH et ceux d'inhibine B et d'œstradiol. L'utilisation d'ovaires cultivés n'est donc pas un modèle adéquat pour la comparaison de biomarqueurs ovariens. La reproduction chez les mammifères étant des processus très similaires, les découvertes effectuées chez une espèce sont faciles à transposer chez l'humain. Toutefois le système *in vivo* ne permet pas d'étudier les interactions entre les différents biomarqueurs au niveau moléculaire. Les souris AMHKO ne fournissent que des données résultantes de l'absence de l'AMH sur la population folliculaire (Durlinger *et al.* 1999). La culture d'ovaires provenant de souris AMHKO exposés à la FSH a permis de démontrer l'effet de l'AMH sur la sensibilité des follicules à la FSH (Durlinger *et al.* 2001). Hormis la culture d'ovaire, l'utilisation de cultures cellulaires (primaires ou tumorales) donne la possibilité de contrôler plusieurs facteurs dans le même temps tels que l'invalidation et la surexpression de gène via des expériences de transfection. Les différentes études portant sur les facteurs de transcriptions impliqués dans l'expression et régulation du gène de l'AMH chez le mâle ou la

femelle témoignent de l'importance de l'utilisation de système *in vitro* (De Santa Barbara *et al.* 1998; Tremblay & Viger, 1999; Anttonen *et al.* 2003; Miyamoto *et al.* 2008).

Au sein de notre laboratoire, l'étude de Sahambi et collègues (2008) a déterminé la capacité du VCD à moduler la population folliculaire pour étudier la corrélation du taux sérique de l'AMH et le nombre de follicules primordiaux. En utilisant la dose de 240 mg/kg/j-15j de VCD il avait induit une diminution de 96% des follicules primordiaux (Sahambi *et al.* 2008). Une modulation moins sévère de la réserve ovarienne permet dorénavant de comparer différents biomarqueurs pour les différents stades folliculaires (Chapitre II). La modulation de la réserve ovarienne est basée sur la spécificité du VCD à induire la mort des petits follicules comme il a été démontré par plusieurs études (Flaws *et al.* 1994; Devine *et al.* 2004; Hoyer, Sipes, 2007; Sahambi *et al.* 2008). Les différents points de temps où le compte des follicules ont eu lieu soit 21, 41 et 61 jours après la première injection, a mis en évidence le fait que la perte des petits follicules entraîne une diminution progressive des follicules en croissance (Chapitre II). En effet, le fait que la perte significative de follicules secondaires n'intervienne que 41j après la première injection confirmait d'une part que le VCD avait bien pour cible spécifique les petits follicules. D'autre part, que cette diminution est imputable aux follicules primordiaux éliminés au point de temps précédent qui aurait normalement évolué en follicules secondaires. Ce paramètre est confirmé par la suite puisque les follicules antraux ne sont affectés significativement que 61j après la première injection chez les groupes traités avec la plus forte concentration de VCD. Ces résultats sont également en accord avec le fait que le nombre de petits follicules détermine le nombre de follicules en croissance (Hirshfield, 1991; Fortune, 2003). C'est l'atteinte progressive du nombre des follicules secondaires à antraux suite à la perte des petits follicules qui permet la comparaison des différents biomarqueurs pour les différents stades folliculaires.

Il était nécessaire de comparer les différents biomarqueurs dans un même modèle d'étude qui permet d'évaluer la capacité de chaque biomarqueur à refléter chaque stade folliculaire. Les hormones testées ont été choisi parce qu'elles sont couramment utilisés dans le cadre de programme de fécondation *in vitro* (FIV) chez la femme (Muttukrishna *et al.* 2005; van Rooij *et al.* 2005; Ebner *et al.* 2006; La Marca *et al.* 2007). Les tests effectués lors des FIV pour évaluer

la réserve ovarienne sont réalisés dans le but de déterminer le nombre et la qualité des ovocytes récupérés et de prédire la survenue des grossesses (Broekmans *et al.* 2006; Muttukrishna *et al.* 2005; Perloe *et al.* 2000; Templeton *et al.* 1996; van Rooij *et al.* 2002; Ebner *et al.* 2006; La Marca *et al.* 2007; van Rooij *et al.* 2005). Bien que l'estimation du nombre de follicules primordiaux soit nécessaire pour l'estimation de la fertilité à long terme peu d'études sont menées dans le but de déterminer un biomarqueur pour ceux-ci (Kevenaar *et al.* 2006; Sahambi *et al.* 2008). La biopsie ovarienne semble être la seule technique permettant d'évaluer le nombre de follicules primordiaux directement mais elle ne fournirait en réalité que des données sur la densité des follicules dans l'ovaire (Webber *et al.* 2003; Schmidt *et al.* 2003; Lambalk *et al.* 2004).

L'impact d'une perte des petits follicules ovariens a des répercussions directes sur la fertilité à long terme (bien que pas à court terme). La survenue d'une ménopause précoce est le résultat final de cette diminution (Chiarelli *et al.* 1999; Thomson *et al.* 2002; Chemaitilly *et al.* 2006). La chimiothérapie est un exemple concret d'expositions chroniques aux ovo-toxiques puisqu'elle renferme pour la plupart des ovo-toxiques connus qui causent la perte des follicules primordiaux selon l'agent et la dose utilisée (Chapman *et al.* 1979; Himelstein-Braw *et al.* 1978 ; Sonmezer, Oktay, 2004). Il est important de s'intéresser aux conséquences d'une perte importante des petits follicules ovariens puisque le taux de survie aux cancers de femmes ne cesse d'augmenter avec les années et les progrès de la médecine (Baili *et al.* 2008; Coleman *et al.* 2008). Nos résultats suggèrent l'établissement d'un nouvel équilibre au sein de la population folliculaire chez les groupes exposés au VCD. En effet, le nombre de follicules en croissance diminue lorsque le nombre de petits follicules diminue également. De plus, on observe une corrélation entre le nombre de petits follicules et le nombre de follicules en croissance à tous les points de temps testés même suite à une perte de follicules de plus de 50%. Il est logique qu'avec moins de follicules primordiaux, on a moins de follicules en croissance comme le montre de précédentes études (Hirshfield, 1991; Gougeon, 1996; Kevenaar *et al.* 2006; Scheffer *et al.* 1999). Toutefois l'établissement aussi rapide d'un équilibre au sein de la population folliculaire est démontré directement par nos résultats et mérite d'être approfondie. Il serait utile d'induire la perte des follicules primordiaux uniquement en utilisant le VCD et suivre l'évolution de la population des follicules ultérieurs à différents points de temps. Il serait intéressant également de

suivre la population folliculaire suite à la perte de follicules en croissance. Pour se faire, des souris pourraient être exposées au MTX qui cible les follicules antraux à différentes concentrations (Uzumcu *et al.* 2006). L'évolution de la population folliculaire serait également suivie à différents points de temps. La comparaison entre l'impact d'une perte de follicules primordiaux et la perte de follicules antraux pourrait alors être effectuée. Ces données permettraient de mieux comprendre la dynamique qui siège dans l'ovaire quant à l'établissement de la population folliculaire.

Au niveau des hormones dosées (FSH, E_2 et AMH), on ne constate aucun changement significatif des taux sériques des bio-marqueurs étudiés 21 jours après la première injection alors qu'à ce point de temps on observait une baisse significative des petits follicules (primordiaux et petits primaires) chez tous les groupes traités au VCD. Ce fait n'est pas surprenant puisque les follicules primordiaux ne contribuent pas à la production de FSH, E_2, inhibine B et AMH et que les follicules primaires ne contribuent pas à la production de FSH, E_2 et inhibine B et peu à celle d'AMH. Par contre, 41 jours après la première injection de VCD, on observe une diminution significative du taux sérique d'AMH et d'inhibine B chez tous les groupes traités avec le VCD tandis qu'une augmentation du taux de FSH est observée chez le groupe avec le moins de follicules soit ceux traité avec la plus forte concentration de VCD (160 mg/kg/j-20j). La diminution du taux sérique d'AMH et d'inhibine B coïncide avec la diminution significative du nombre de follicules secondaires qui est le stade folliculaire qui contribue le plus à la sécrétion d'AMH avec les petits antraux chez les souris (Durlinger *et al.* 2000; Weenen *et al.* 2004) et de manières importante à celle de l'inhibine B (Perloe *et al.* 2000). L'augmentation du taux sérique de FSH reflète la perte de 90% des follicules secondaires observée chez le groupe traité avec la plus forte dose de VCD. La perte sévère des follicules secondaires entraîne la diminution du taux sérique de l'inhibine B qui est un inhibiteur de la sécrétion de FSH (Brockmans *et al.* 1998; Perloe *et al.* 2000). Le fait que les groupes traités avec une moindre dose de VCD ne présentent pas une augmentation du taux de FSH plus précocement suggère que la diminution significative de l'inhibine B ne soit pas suffisante pour lever le rétrocontrôle négatif sur la production de FSH. En outre, l'autre inhibiteur de la production de FSH, l'œstradiol, ne présente pas une diminution significative de son taux sérique.

À 61j, la diminution significative du taux sérique d'AMH se maintient chez les souris exposées au VCD tandis que celle de l'inhibine B ne persiste que chez le groupe traité avec la plus forte dose de VCD. Le fait que le taux d'inhibine B ne diminue pas chez les souris exposées au plus petites doses de VCD pourrait s'expliquer par une augmentation de la production d'inhibine B par les cellules de la granulosa des follicules qui restent. Bien que le taux de FSH n'augmente pas significativement chez les souris exposées aux plus petites doses de VCD, il existe tout de même une tendance à la hausse qui pourrait être suffisante pour stimuler la production d'inhibine B. De plus, il existe une tendance à la baisse du taux sérique d'œstradiol des souris traitées avec la plus forte dose de VCD (160 mg/kg/j-20j). Si nous disposions d'un point de temps plus éloigné que 61j nous aurions probablement observé une diminution significative du taux sérique d'E_2 chez les souris exposées au VCD. Le changement au sein des taux sériques d'inhibine B à 61j est surprenant compte-tenu de la perte folliculaire qui siège au niveau des ovaires. Une étude de l'expression de l'inhibine B dans les ovaires seraient nécessaires pour tenter d'expliquer les changements de sa concentration sérique. Nos résultats suggèrent que la diminution du taux sérique de l'AMH s'effectue avant un changement notable in situ par l'immunobuvardage de type western (Chapitre II). Une précédente étude a démontré une diminution du taux sérique et protéique de l'AMH chez des rattes exposées au cisplatine et stimulées par la suite avec des gonadotrophines (Yeh *et al.* 2006). Nous sommes les premiers a démontré que le taux sérique d'AMH diminue significativement au niveau sérique avant que cette diminution ne soit visible de manières significatives in situ. Il pourrait avoir une augmentation du nombre de follicules de la granulosa au sein des follicules en croissance non éliminés par les expositions au VCD mais également une surexpression du gène de l'AMH au sein des cellules de la granulosa exposées au VCD.

Aucun des biomarqueurs connus de la réserve ovarienne ne sont produits par les follicules primordiaux. Toutefois, la corrélation de leur taux sérique avec le nombre de follicules primordiaux serait un outil indéniable pour l'estimation de la fertilité à long terme. Nous avons démontré directement la corrélation entre le taux sérique d'AMH et le nombre de follicules primordiaux (Annexe 1). Nos résultats permettent de confirmer des résultats similaires obtenus par (Kevenaar *et al.* 2006). De plus, nous avons constaté que son taux sérique était corrélé au nombre de follicules en croissance au sein de l'ovaire à tous les points de temps testés (Annexe

1). Le fait que l'AMH soit produite par les follicules en croissance influence certainement la corrélation de son taux sérique aux follicules en croissance. L'AMH serait donc un biomarqueur direct des follicules en croissance (Kevenaar *et al.* 2006; Visser *et al.* 2006). Notre modèle d'étude a permis de mettre en évidence les différentes corrélations existant entre les différents stades folliculaires et les biomarqueurs testés (Tableau 2). Ces corrélations suggèrent que l'AMH est le biomarqueur dont le taux sérique reflète le plus précocement la perte des follicules primordiaux (Tableau 2). Toutefois, la FSH et l'inhibine B reste toutefois de bons biomarqueurs de la réserve en follicules primordiaux par la suite. Seule l'E_2 semble être un mauvais biomarqueur de la réserve ovarienne dans le cadre de notre modèle d'étude. En effet, aucune corrélation avec les follicules ovariens et/ou changement significatif de son taux sérique n'a été observée malgré des pertes sévères de follicules ovariens dans notre modèle d'étude (Tableau 2).

		Corrélation (test de Pearson)			
		AMH	FSH	Inhibine B	E2
21j	Primordiaux	*	ns	Ns	ns
	Primaires	ns	ns	Ns	ns
	Secondaires	**	ns	Ns	ns
	Antraux	ns	ns	Ns	ns
	Petits follicules	*	ns	Ns	ns
	En croissance	*	ns	Ns	ns
	Total	*	ns	Ns	ns
41j	Primordiaux	***	**	*	ns
	Primaires	***	**	*	ns
	Secondaires	***	***	*	ns
	Antraux	**	*	Ns	ns
	Petits follicules	***	**	*	ns
	En croissance	***	***	*	ns
	Total	***	***	*	ns
61j	Primordiaux	**	***	Ns	ns
	Primaires	**	***	**	ns
	Secondaires	***	***	*	ns
	Antraux	***	*	Ns	ns
	Petits follicules	***	***	**	ns
	En croissance	***	***	*	ns
	Total	***	***	**	ns

Tableau 2: Récapitulatif des corrélations observées dans le cadre de notre étude in vivo. Petits follicules= primordiaux + petits primaires; En croissance= grands primaires à antraux; Total= somme des follicules primordiaux à antraux. ns= corrélation non significative; * ,**,*** = corrélation petite ($p<0.05$; Test de Pearson), moyenne ($p<0.01$; Test de Pearson) à forte ($p<0.001$; Test de Pearson), respectivement.

Sur le plan clinique, le taux sérique d'AMH permettrait d'effectuer le suivi de la fertilité des femmes exposées à des ovo-toxiques dans un cadre thérapeutique (ex : chimiothérapie) ou professionnel (ex : exposition aux pesticides, solvants, etc.). Notre étude fournit d'ailleurs l'une des premières limitations du taux sérique d'AMH comme bio-marqueur de la réserve ovarienne. En effet, le délai observé entre une diminution significative du taux d'AMH et la diminution significative de follicules suggère l'utilisation d'au moins deux dosages séparés de plusieurs mois pour évaluer avec la fertilité d'une femme exposée consciemment ou non à des ovo-toxiques. De plus, le taux sérique d'AMH serait un outil pour diagnostiquer la survenue de pathologies de types cancer où l'on observe une prolifération des cellules qui la produisent (ex : cancers ovariens). Il semble être le seul indicateur suffisamment sensible pour détecter des dommages ovariens à un stade précoce (Giuseppe *et al.* 2007; Hehenkamp *et al.* 2006; Lie Fong *et al.* 2008; Rohr *et al.* 2008; van Beek *et al.* 2007).

IV. Perspectives

Les changements observés au niveau du dosage sérique de l'AMH pourraient être le reflet d'une diminution de l'expression protéique de l'AMH dans les ovaires. L'exposition du VCD est certainement responsable de la perte des follicules qui pourrait se traduire par une diminution de l'expression protéique de l'AMH dans les ovaires. Bien que fiable les dosages sanguins ne reflètent pas toujours les concentrations et tendances observées au niveau de l'organe d'intérêt. D'autres techniques peuvent être employées tel que le dosage du fluide folliculaire pour approfondir les données obtenues dans le sang (Fanchin *et al.* 2007). L'étude de l'expression du gène de l'AMH pourrait fournir des données intéressantes qui permettraient de déterminer les facteurs pouvant influencer la production d'AMH (Annexe 2). Il serait également intéressant de déterminer l'expression ovarienne de l'inhibine B également puisque les changements qui ont lieu au niveau du sang sont particulièrement surprenant à 61j dans notre modèle d'étude. L'absence d'échantillons d'ovaires de souris exposées au VCD pour le point de temps de 61j limite la discussion des résultats obtenus au niveau des western-blot. La réalisation d'une nouvelle expérience *in vivo* et de western blot pour ce point de temps serait utile.

Notre modèle d'étude in vivo ne nous permet pas d'expliquer le maintien du taux protéique d'AMH au niveau des ovaires de souris exposées au VCD comparé à la diminution

sérique d'AMH chez ces mêmes souris. La première alternative serait de prélever des cellules de la granulosa de souris pour les exposées au VCD ou le véhicule afin de procéder par la suite au dosage de la production d'AMH (ex : immunobuvardage de type western), et à l'estimation de l'expression du gène de l'AMH (ex : RT-PCR en temps réel). Une étude préliminaire dans notre laboratoire a déterminé que 20µM de VCD induisait une diminution significative du nombre de follicules dans les ovaires de souris néonatales *in vitro*. Les cellules prélevées pourraient donc être exposées à des doses croissantes de VCD à partir de cette concentration durant différents points de temps afin de suivre la production d'AMH. Si la limite de quantification le permet, la concentration cellulaire d'AMH pourrait être comparée à celle présente dans le milieu de culture. Cette comparaison fournirait des données sur la sécrétion de l'AMH suite à l'exposition au VCD. Une alternative intéressante serait de transfecter des cellules de la granulosa primaire et/ou des lignées cellulaires avec un plasmide contenant le gène de la luciférase ou de la beta-galactosidase sous le contrôle du promoteur de l'AMH (région effectrice ou promoteur complet). Les changements affectant l'expression du gène de l'AMH pourront être suivis plus aisément. La sensibilité des cellules de la granulosa provenant de souris et celle des lignées cellulaires KK-1 et COV434 suite à des expositions au VCD durant 48h sont différentes mais elle n'empêche pas cette étude (Chapitre II). De plus, cette technique peut permettre de mieux comprendre les facteurs impliqués dans l'expression et régulation du gène de l'AMH. L'utilisation de la mutagenèse dirigée ou d'ARN interférant (ARNi) pour abolir le site de fixation d'un facteur de transcription sur le promoteur du gène de l'AMH ou l'expression d'un facteur de transcription respectivement sont quelques techniques envisageables. La surexpression de certains facteurs de transcription via une co-transfection de deux plasmides (celui contenant le promoteur de l'AMH et le gène du facteur étudié sous le contrôle d'un promoteur viral) serait également possible. L'implication de l'AMH dans l'expression et régulation de son gène pourrait être également étudiée plus facilement. La présence de l'AMHRII dans des tissus autres que l'ovaire tels que l'endomètre chez l'humain (Wang *et al.* 2009), cellules cancéreuses du col de l'utérus (Barbie *et al.* 2003) et les seins (Segev *et al.* 2000) suggèrent l'implication de l'AMH dans des processus autres que la folliculogenèse.

Le taux sérique d'AMH pourrait être utilisé en clinique pour déterminer précocement le développement de tumeurs de cellules de la granulosa. Son utilité à prédire la qualité des

ovocytes et la survenue de grossesses a été déterminée par plusieurs études dans le cadre de FIV (Cupisti *et al.* 2007; Ebner *et al.* 2006; Eldar-Geva *et al.* 2005). Dans le cadre de programme de FIV, il a été démontré que l'AMH pourrait également servir de biomarqueur pour déterminer la réponse ovarienne à la stimulation par la FSH (Muttukrishna *et al.* 2004; Nelson *et al.* 2007; Seifer *et al.* 2002). Le taux sérique de l'AMH serait un excellent outil pour déterminer l'impact de traitements chimiothérapeutiques sur la réserve ovarienne (Anderson *et al.* 2006; Bath *et al.* 2003). D'autre part, il permettrait de faire le suivi de la fertilité de femmes exposées à des facteurs environnementaux ovo-toxiques en industrie et/ou de déterminer le caractère ovotoxique d'un agent.

V. Conclusion

Nos résultats démontrent la possibilité de moduler la population folliculaire en utilisant un ovo-toxique connu, le VCD. C'est le premier modèle d'étude direct de la corrélation entre des biomarqueurs et les différents stades folliculaires de l'ovaire. Les trois points de temps utilisés ont permis de suivre les changements affectant les taux sériques de l'AMH, de l'inhibine B et de la FSH. Bien que le taux sérique de l'AMH soit affecté tardivement, il est le seul biomarqueur a reflété une diminution de la réserve ovarienne chez toutes les souris exposées au VCD de la plus petite dose à la plus haute. La persistance de cettc diminution par la suite confirme le statut de bio-marqueur fiable de l'AMH dans ce modèle d'étude. Contrairement aux autres biomarqueurs testés, le taux sérique d'AMH est corrélé au nombre de follicules primordiaux à tous les points de temps (malgré l'absence de changement significatif 21j après la première injection). Par conséquent la diminution du taux sérique d'AMH reflète une diminution de la réserve ovarienne, de manières directes pour les follicules en croissance qui la produise et indirecte pour les follicules primordiaux. De plus, l'indépendance du taux sérique de l'AMH au cycle menstruel est un atout non négligeable par rapport aux autres biomarqueurs sanguins de la réserve ovarien. Notre modèle nous a également permis de confirmer le fait que la perte de petits follicules engendre une diminution des follicules en croissance. Toutefois ce modèle ne nous permet pas d'étudier les changements affectant l'expression du gène de l'AMH. Des études supplémentaires seront nécessaires afin de mieux comprendre les différents facteurs impliqués dans l'expression du gène de l'AMH et sa régulation. Enfin le taux sérique d'AMH semble être un bon outil pour évaluer l'impact d'ovo-toxique sur la réserve ovarienne.

RÉFÉRENCES

Anderson D, Bishop JB, Garner RC, Ostrosky-Wegman P, Selby PB, 1995. Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. Mutat Res 330:115-81

Anderson E, Albertini DF, 1976. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. J Cell Biol 71:680-6

Anderson R, Fassler R, Georges-Labouesse E, Hynes RO, Bader BL, Kreidberg JA, Schaible K, Heasman J, Wylie C, 1999. Mouse primordial germ cells lacking beta1 integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. Development 126:1655-64

Anderson RA, Themmen AP, Al-Qahtani A, Groome NP, Cameron DA, 2006. The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer. Hum Reprod 21:2583-92

Antonicelli R, Olivieri F, Morichi V, Urbani E, Mais V, 2008. Prevention of cardiovascular events in early menopause: a possible role for hormone replacement therapy. Int J Cardiol 130:140-6

Anttonen M, Ketola I, Parviainen H, Pusa AK, Heikinheimo M, 2003. FOG-2 and GATA-4 Are coexpressed in the mouse ovary and can modulate mullerian-inhibiting substance expression. Biol Reprod 68:1333-40

Appt SE, Clarkson TB, Chen H, Adams MR, Christian PJ, Hoyer PB, Wilson ME, Kaplan JR, 2009. Serum antimullerian hormone predicts ovarian reserve in a monkey model. Menopause

Appt SE, Kaplan JR, Clarkson TB, Cline JM, Christian PJ, Hoyer PB, 2006. Destruction of primordial ovarian follicles in adult cynomolgus macaques after exposure to 4-vinylcyclohexene diepoxide: a nonhuman primate model of the menopausal transition. Fertil Steril 86:1210-6

Arango NA, Lovell-Badge R, Behringer RR, 1999. Targeted mutagenesis of the endogenous mouse Mis gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. Cell 99:409-19

Baarends WM, Hoogerbrugge JW, Post M, Visser JA, De Rooij DG, Parvinen M, Themmen AP, Grootegoed JA, 1995. Anti-mullerian hormone and anti-mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression during postnatal testis development and in the adult testis of the rat. Endocrinology 136:5614-22

Baarends WM, van Helmond MJ, Post M, van der Schoot PJ, Hoogerbrugge JW, de Winter JP, Uilenbroek JT, Karels B, Wilming LG, Meijers JH, et al, 1994. A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the mullerian duct. Development 120:189-

Baili P, Micheli A, De Angelis R, Weir HK, Francisci S, Santaquilani M, Hakulinen T, Quaresmas M, Coleman MP, 2008. Life tables for world-wide comparison of relative survival for cancer (CONCORD study). Tumori 94:658-68

Baird DT, Collins J, Egozcue J, Evers LH, Gianaroli L, Leridon H, Sunde A, Templeton A, Van Steirteghem A, Cohen J, Crosignani PG, Devroey P, Diedrich K, Fauser BC, Fraser L, Glasier A, Liebaers I, Mautone G, Penney G, Tarlatzis B, 2005. Fertility and ageing. Hum Reprod Update 11:261-76

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

Baker TG, Eastwood J, 1983. Origin and differentiation of germ cells in man. Bibl Anat 24:67-76

Balasch J, Creus M, Fabregues F, Carmona F, Casamitjana R, Ascaso C, Vanrell JA, 1996. Inhibin, follicle-stimulating hormone, and age as predictors of ovarian response in in vitro fertilization cycles stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist-gonadotropin treatment. Am J Obstet Gynecol 175:1226-30

Bancsi LF, Broekmans FJ, Eijkemans MJ, de Jong FH, Habbema JD, te Velde ER, 2002. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. Fertil Steril 77:328-36

Barbie TU, Barbie DA, MacLaughlin DT, Maheswaran S, Donahoe PK, 2003. Mullerian Inhibiting Substance inhibits cervical cancer cell growth via a pathway involving p130 and p107. Proc Natl Acad Sci U S A 100:15601-6

Barnhart K, Osheroff J, 1998. Follicle stimulating hormone as a predictor of fertility. Curr Opin Obstet Gynecol 10:227-32

Bath LE, Wallace WH, Shaw MP, Fitzpatrick C, Anderson RA, 2003. Depletion of ovarian reserve in young women after treatment for cancer in childhood: detection by anti-Mullerian hormone, inhibin B and ovarian ultrasound. Hum Reprod 18:2368-74

Beau C, Rauch M, Joulin V, Jegou B, Guerrier D, 2000. GATA-1 is a potential repressor of anti-Mullerian hormone expression during the establishment of puberty in the mouse. Mol Reprod Dev 56:124-38

Beau C, Vivian N, Munsterberg A, Dresser DW, Lovell-Badge R, Guerrier D, 2001. In vivo analysis of the regulation of the anti-Mullerian hormone, as a marker of Sertoli cell differentiation during testicular development, reveals a multi-step process. Mol Reprod Dev 59:256-64

Belville C, Van Vlijmen H, Ehrenfels C, Pepinsky B, Rezaie AR, Picard JY, Josso N, di Clemente N, Cate RL, 2004. Mutations of the anti-mullerian hormone gene in patients

with persistent mullerian duct syndrome: biosynthesis, secretion, and processing of the abnormal proteins and analysis using a three-dimensional model. Mol Endocrinol 18:708-21

Bendel-Stenzel M, Anderson R, Heasman J, Wylie C, 1998. The origin and migration of primordial germ cells in the mouse. Semin Cell Dev Biol 9:393-400

Berin I, Teixeira J, 2008. Utility of serum antimullerian hormone/Mullerian-inhibiting substance for predicting ovarian reserve in older women. Menopause 15:824-6

Black WP, Govan AD, 1972. Laparoscopy and ovarian biopsy for the assessment of secondary amenorrhea. Am J Obstet Gynecol 114:739-47

Borgeest C, Symonds D, Mayer LP, Hoyer PB, Flaws JA, 2002. Methoxychlor may cause ovarian follicular atresia and proliferation of the ovarian epithelium in the mouse. Toxicol Sci 68:473-8

Borman SM, Christian PJ, Sipes IG, Hoyer PB, 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

Borovskaya TG, Goldberg VE, Fomina TI, Pakhomova AV, Kseneva SI, Poluektova ME, Goldberg ED, 2004. Morphological and functional state of rat ovaries in early and late periods after administration of platinum cytostatics. Bull Exp Biol Med 137:331-5

Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB, 2006. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. Hum Reprod Update 12:685-718

Broekmans FJ, Scheffer GJ, Bancsi LF, Dorland M, Blankenstein MA, te Velde ER, 1998. Ovarian reserve tests in infertility practice and normal fertile women. Maturitas 30:205-14

Budzik GP, Powell SM, Kamagata S, Donahoe PK, 1983. Mullerian inhibiting substance fractionation by dye affinity chromatography. Cell 34:307-14

Budzik GP, Swann DA, Hayashi A, Donahoe PK, 1980. Enhanced purification of Mullerian inhibiting substance by lectin affinity chromatography. Cell 21:909-15

Bulger WH, Feil VJ, Kupfer D, 1985. Role of hepatic monooxygenases in generating estrogenic metabolites from methoxychlor and from its identified contaminants. Mol Pharmacol 27:115-24

Bulger WH, Muccitelli RM, Kupfer D, 1978. Interactions of methoxychlor, methoxychlor base-soluble contaminant, and 2,2-bis(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane with rat uterine estrogen receptor. J Toxicol Environ Health 4:881-93

Bullejos M, Koopman P, 2004. Germ cells enter meiosis in a rostro-caudal wave during development of the mouse ovary. Mol Reprod Dev 68:422-8

Bulun S. & Adashi Y., 2007. The Physiology and Pathology of the Female Reproductive Axis - Williams Textbook of Endocrinology, Henry M. Kronenberg, Shlomo Melmed, Kenneth S. Polonsky, P. Reed Larsen Reprint: 11th edition, 2007

Burger HG, 2000. Inhibin and reproductive aging. Exp Gerontol 35:33-9

Burger HG, Hale GE, Robertson DM, Dennerstein L, 2007. A review of hormonal changes during the menopausal transition: focus on findings from the Melbourne Women's Midlife Health Project. Hum Reprod Update 13:559-65

Byskov AG, Faddy MJ, Lemmen JG, Andersen CY, 2005. Eggs forever? Differentiation 73:438-46

Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA, 2003. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. Science 301:215-8

Catala M., 2003. Embryologie- Développement précoce chez l'humain, Masson Reprint: 2e édition, 2003

Catlin EA, Manganaro TF, Donahoe PK, 1988. Mullerian inhibiting substance depresses accumulation in vitro of disaturated phosphatidylcholine in fetal rat lung. Am J Obstet Gynecol 159:1299-303

Chang W, Parra M, Ji C, Liu Y, Eickelberg O, McCarthy TL, Centrella M, 2002. Transcriptional and post-transcriptional regulation of transforming growth factor beta type II receptor expression in osteoblasts. Gene 299:65-77

Chapman RM, Sutcliffe SB, Malpas JS, 1979. Cytotoxic-induced ovarian failure in women with Hodgkin's disease. I. Hormone function. JAMA 242:1877-81

Chemaitilly W, Mertens AC, Mitby P, Whitton J, Stovall M, Yasui Y, Robison LL, Sklar CA, 2006. Acute ovarian failure in the childhood cancer survivor study. J Clin Endocrinol Metab 91:1723-8

Chiarelli AM, Marrett LD, 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

Chin TW, Parry RL, Donahoe PK, 1991. Human mullerian inhibiting substance inhibits tumor growth in vitro and in vivo. Cancer Res 51:2101-6

Clarke TR, Hoshiya Y, Yi SE, Liu X, Lyons KM, Donahoe PK, 2001. Mullerian inhibiting substance signaling uses a bone morphogenetic protein (BMP)-like pathway mediated by ALK2 and induces SMAD6 expression. Mol Endocrinol 15:946-59

Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R, Capocaccia R, Baili P, Rachet B, Gatta G, Hakulinen T, Micheli A, Sant M, Weir HK, Elwood JM, Tsukuma H, Koifman

S, E Silva GA, Francisci S, Santaquilani M, Verdecchia A, Storm HH, Young JL, 2008. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). Lancet Oncol 9:730-56

Colvin OM, 1999. An overview of cyclophosphamide development and clinical applications. Curr Pharm Des 5:555-60

Cooke BA, 1999. Signal transduction involving cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanisms in the control of steroidogenesis. Mol Cell Endocrinol 151:25-35

Cortvrindt RG, Smitz JE, 2002. Follicle culture in reproductive toxicology: a tool for in-vitro testing of ovarian function? Hum Reprod Update 8:243-54

Creus M, Penarrubia J, Fabregues F, Vidal E, Carmona F, Casamitjana R, Vanrell JA, Balasch J, 2000. Day 3 serum inhibin B and FSH and age as predictors of assisted reproduction treatment outcome. Hum Reprod 15:2341-6

Cummings AM, 1997. Methoxychlor as a model for environmental estrogens. Crit Rev Toxicol 27:367-79

Cummings AM, Gray LE Jr, 1989. Antifertility effect of methoxychlor in female rats: dose- and time-dependent blockade of pregnancy. Toxicol Appl Pharmacol 97:454-62

Cupisti S, Dittrich R, Mueller A, Strick R, Stiegler E, Binder H, Beckmann MW, Strissel P, 2007. Correlations between anti-mullerian hormone, inhibin B, and activin A in follicular fluid in IVF/ICSI patients for assessing the maturation and developmental potential of oocytes. Eur J Med Res 12:604-8

de Kleijn MJ, van der Schouw YT, Verbeek AL, Peeters PH, Banga JD, van der Graaf Y, 2002a. Endogenous estrogen exposure and cardiovascular mortality risk in postmenopausal women. Am J Epidemiol 155:339-45

de Kleijn MJ, van der Schouw YT, Wilson PW, Grobbee DE, Jacques PF, 2002b. Dietary intake of phytoestrogens is associated with a favorable metabolic cardiovascular risk profile in postmenopausal U.S.women: the Framingham study. J Nutr 132:276-82

De Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, Desclozeaux M, Moniot B, Sudbeck P, Scherer G, Poulat F, Berta P, 1998. Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. Mol Cell Biol 18:6653-65

Desmeules P, Devine PJ, 2006. Characterizing the ovotoxicity of cyclophosphamide metabolites on cultured mouse ovaries. Toxicol Sci 90:500-9

Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Hoyer PB, 2000. Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. Biol Reprod 63:1245-52

Devine PJ, Sipes IG, Hoyer PB, 2004. Initiation of delayed ovotoxicity by in vitro and in vivo exposures of rat ovaries to 4-vinylcyclohexene diepoxide. Reprod Toxicol 19:71-7

di Clemente N, Ghaffari S, Pepinsky RB, Pieau C, Josso N, Cate RL, Vigier B, 1992. A quantitative and interspecific test for biological activity of anti-mullerian hormone: the fetal ovary aromatase assay. Development 114:721-7

di Clemente N, Josso N, Gouedard L, Belville C, 2003. Components of the anti-Mullerian hormone signaling pathway in gonads. Mol Cell Endocrinol 211:9-14

di Clemente N, Wilson C, Faure E, Boussin L, Carmillo P, Tizard R, Picard JY, Vigier B, Josso N, Cate R, 1994. Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Mullerian hormone. Mol Endocrinol 8:1006-20

Donahoe PK, Fuller AF Jr, Scully RE, Guy SR, Budzik GP, 1981. Mullerian inhibiting substance inhibits growth of a human ovarian cancer in nude mice. Ann Surg 194:472-80

Donahoe PK, Swann DA, Hayashi A, Sullivan MD, 1979. Mullerian duct regression in the embryo correlated with cytotoxic activity against human ovarian cancer. Science 205:913-5

Dresser DW, Hacker A, Lovell-Badge R, Guerrier D, 1995. The genes for a spliceosome protein (SAP62) and the anti-Mullerian hormone (AMH) are contiguous. Hum Mol Genet 4:1613-8

Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP, 2002. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. Endocrinology 143:1076-84

Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP, 2001. Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. Endocrinology 142:4891-9

Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP, 1999. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. Endocrinology 140:5789-96

Durlinger AL, Kramer P, Karels B, Grootegoed JA, Uilenbroek JT, Themmen AP, 2000. Apoptotic and proliferative changes during induced atresia of pre-ovulatory follicles in the rat. Hum Reprod 15:2504-11

Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP, 2002. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. Reproduction 124:601-9

Ebner T, Sommergruber M, Moser M, Shebl O, Schreier-Lechner E, Tews G, 2006. Basal level of anti-Mullerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles. Hum Reprod 21:2022-6

Eggan K, Jurga S, Gosden R, Min IM, Wagers AJ, 2006. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. Nature 441:1109-14

Egger H, 1975. The representability of laparoscopic ovarian biopsies for the cellular structure and function of the ovaries. Arch Gynakol 218:323-9

Eldar-Geva T, Ben-Chetrit A, Spitz IM, Rabinowitz R, Markowitz E, Mimoni T, Gal M, Zylber-Haran E, Margalioth EJ, 2005. Dynamic assays of inhibin B, anti-Mullerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. Hum Reprod 20:3178-83

Elter K, Sismanoglu A, Durmusoglu F, 2005. Intercycle variabilities of basal antral follicle count and ovarian volume in subfertile women and their relationship to reproductive aging: a prospective study. Gynecol Endocrinol 20:137-43

Encha-rzavi F. & Escudier E. Embryologie humaine - De la molécule à la clinique. Masson. Abreges.
Reprint: 3e édition, 2003

Erdem M, Erdem A, Gursoy R, Biberoglu K, 2004. Comparison of basal and clomiphene citrate induced FSH and inhibin B, ovarian volume and antral follicle counts as ovarian reserve tests and predictors of poor ovarian response in IVF. J Assist Reprod Genet 21:37-45

Erickson GF, Shimasaki S, 2003. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. Reprod Biol Endocrinol 1:9

Escobar ML, Echeverria OM, Ortiz R, Vazquez-Nin GH, 2008. Combined apoptosis and autophagy, the process that eliminates the oocytes of atretic follicles in immature rats. Apoptosis 13:1253-66

Eusebe D, di Clemente N, Rey R, Pieau C, Vigier B, Josso N, Picard JY, 1996. Cloning and expression of the chick anti-Mullerian hormone gene. J Biol Chem 271:4798-804

Fabregues F, Balasch J, Creus M, Carmona F, Puerto B, Quinto L, Casamitjana R, Vanrell JA, 2000. Ovarian reserve test with human menopausal gonadotropin as a predictor of in vitro fertilization outcome. J Assist Reprod Genet 17:13-9

Faddy MJ, Gosden RG, 1996. A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women. Hum Reprod 11:1484-6

Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N, Gougeon A, di Clemente N, Frydman R, Taieb J, 2007. Anti-Mullerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. J Clin Endocrinol Metab 92:1796-802

Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J, 2003. Serum anti-Mullerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin

B, estradiol, FSH and LH on day 3. Hum Reprod 18:323-7

Fayez JA, Jonas HS, 1976. Assessment of the role of laparoscopic ovarian biopsy. Obstet Gynecol 48:397-402

Fernandez SM, Keating AF, Christian PJ, Sen N, Hoying JB, Brooks HL, Hoyer PB, 2008. Involvement of the KIT/KITL signaling pathway in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovarian follicle loss in rats. Biol Reprod 79:318-27

Feyereisen E, Mendez Lozano DH, Taieb J, Hesters L, Frydman R, Fanchin R, 2006. Anti-Mullerian hormone: clinical insights into a promising biomarker of ovarian follicular status. Reprod Biomed Online 12:695-703

Ficicioglu C, Kutlu T, Demirbasoglu S, Mulayim B, 2003. The role of inhibin B as a basal determinant of ovarian reserve. Gynecol Endocrinol 17:287-93

Flaws JA, Doerr JK, Sipes IG, Hoyer PB, 1994. Destruction of preantral follicles in adult rats by 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide. Reprod Toxicol 8:509-14

Fortune JE, 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. Anim Reprod Sci 78:135-63

Fortune JE, Cushman RA, Wahl CM, Kito S, 2000. The primordial to primary follicle transition. Mol Cell Endocrinol 163:53-60

Franchi L.L., Mandl A. M. and Zuckerman S. The development of the ovary and the process of oogenesis. The Ovary. I(Chapter 1). Academic Press London. Reprint: 62

Fuller AF Jr, Guy S, Budzik GP, Donahoe PK, 1982. Mullerian inhibiting substance inhibits colony growth of a human ovarian carcinoma cell line. J Clin Endocrinol Metab 54:1051-5

Fuller AF Jr, Krane IM, Budzik GP, Donahoe PK, 1985. Mullerian inhibiting substance reduction of colony growth of human gynecologic cancers in a stem cell assay. Gynecol Oncol 22:135-48

Giuili G, Shen WH, Ingraham HA, 1997. The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Mullerian Inhibiting Substance, in vivo. Development 124:1799-807

Giuseppe L, Attilio G, Edoardo DN, Loredana G, Cristina L, Vincenzo L, 2007. Ovarian function after cancer treatment in young women affected by Hodgkin disease (HD). Hematology 12:141-7

Glamoclija V, Vilovic K, Saraga-Babic M, Baranovic A, Sapunar D, 2005. Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. Fertil Steril 83:426-31

Gondos B, Westergaard L, Byskov AG, 1986. Initiation of oogenesis in the human fetal ovary:

ultrastructural and squash preparation study. Am J Obstet Gynecol 155:189-95

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

Gouedard L, Chen YG, Thevenet L, Racine C, Borie S, Lamarre I, Josso N, Massague J, di Clemente N, 2000. Engagement of bone morphogenetic protein type IB receptor and Smad1 signaling by anti-Mullerian hormone and its type II receptor. J Biol Chem 275:27973-8

Gougeon A, 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. Endocr Rev 17:121-55

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

Gougeon A, Ecochard R, Thalabard JC, 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

Greenfeld C, Flaws JA, 2004. Renewed debate over postnatal oogenesis in the mammalian ovary. Bioessays 26:829-32

Gruijters MJ, Visser JA, Durlinger AL, Themmen AP, 2003. Anti-Mullerian hormone and its role in ovarian function. Mol Cell Endocrinol 211:85-90

Gupta RK, Aberdeen G, Babus JK, Albrecht ED, Flaws JA, 2007. Methoxychlor and its metabolites inhibit growth and induce atresia of baboon antral follicles. Toxicol Pathol 35:649-56

Gupta RK, Miller KP, Babus JK, Flaws JA, 2006a. Methoxychlor inhibits growth and induces atresia of antral follicles through an oxidative stress pathway. Toxicol Sci 93:382-9

Gupta RK, Schuh RA, Fiskum G, Flaws JA, 2006b. Methoxychlor causes mitochondrial dysfunction and oxidative damage in the mouse ovary. Toxicol Appl Pharmacol 216:436-45

Hall DL, Payne LA, Putnam JM, Huet-Hudson YM, 1997. Effect of methoxychlor on implantation and embryo development in the mouse. Reprod Toxicol 11:703-8

Haqq CM, King CY, Donahoe PK, Weiss MA, 1993. SRY recognizes conserved DNA sites in sex-specific promoters. Proc Natl Acad Sci U S A 90:1097-101

Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, van Duin M, Hsueh AJ, 1999. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. Endocrinology 140:1236-44

Hayashi M, Shima H, Hayashi K, Trelstad RL, Donahoe PK, 1984. Immunocytochemical

localization of Mullerian inhibiting substance in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in Sertoli cells of the neonatal calf testis using a monoclonal antibody. J Histochem Cytochem 32:649-54

Hehenkamp WJ, Looman CW, Themmen AP, de Jong FH, Te Velde ER, Broekmans FJ, 2006. Anti-Mullerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. J Clin Endocrinol Metab 91:4057-63

Hendriks DJ, Mol BW, Bancsi LF, Te Velde ER, Broekmans FJ, 2005. Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level. Fertil Steril 83:291-301

Hillier SG, Reichert LE Jr, Van Hall EV, 1981. Control of preovulatory follicular estrogen biosynthesis in the human ovary. J Clin Endocrinol Metab 52:847-56

Himelstein-Braw R, Peters H, Faber M, 1978. Morphological study of the ovaries of leukaemic children. Br J Cancer 38:82-7

Hirobe S, He WW, Gustafson ML, MacLaughlin DT, Donahoe PK, 1994. Mullerian inhibiting substance gene expression in the cycling rat ovary correlates with recruited or graafian follicle selection. Biol Reprod 50:1238-43

Hirshfield AN, 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. Int Rev Cytol 124:43-101

Hirshfield AN, 1994. Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. Biol Reprod 50:421-8

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

Hirshfield AN, Schmidt VA, 1989. [Kinetic aspects of follicle development in the rat]. Ontogenez 20:5-27

Hodis HN, Mack WJ, 2008. Postmenopausal hormone therapy and cardiovascular disease in perspective. Clin Obstet Gynecol 51:564-80

Hosaka T, Biggs WH 3rd, Tieu D, Boyer AD, Varki NM, Cavenee WK, Arden KC, 2004. Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. Proc Natl Acad Sci U S A 101:2975-80

Hoyer PB, 2005. Damage to ovarian development and function. Cell Tissue Res 322:99-106

Hoyer PB, Devine PJ, Hu X, Thompson KE, Sipes IG, 2001. Ovarian toxicity of 4-vinylcyclohexene diepoxide: a mechanistic model. Toxicol Pathol 29:91-9

Hoyer PB, Sipes IG, 2007. Development of an animal model for ovotoxicity using 4-

vinylcyclohexene: a case study. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 80:113-25

Hreinsson JG, Scott JE, Rasmussen C, Swahn ML, Hsueh AJ, Hovatta O, 2002. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. J Clin Endocrinol Metab 87:316-21

Hsueh AJ, Eisenhauer K, Chun SY, Hsu SY, Billig H, 1996. Gonadal cell apoptosis. Recent Prog Horm Res 51:433-55; discussion 455-6

Hu X, Christian P, Sipes IG, Hoyer PB, 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 PJ, Thompson KE, Sipes IG, Hoyer PB, 2001b. Apoptosis induced in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide is associated with activation of the caspase cascades. Biol Reprod 65:87-93

Hu X, Flaws JA, Sipes IG, Hoyer PB, 2002. Activation of mitogen-activated protein kinases and AP-1 transcription factor in ovotoxicity induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide in rats. Biol Reprod 67:718-24

Hunt PA, Hassold TJ, 2008. Human female meiosis: what makes a good egg go bad? Trends Genet 24:86-93

Hurley LH, 2002. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. Nat Rev Cancer 2:188-200

Hussein MR, 2005. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. Hum Reprod Update 11:162-77

Hutson JM, 1986. Testicular feminization: a model for testicular descent in mice and men. J Pediatr Surg 21:195-8

Igawa Y, Keating AF, Rajapaksa KS, Sipes IG, Hoyer PB, 2009. Evaluation of ovotoxicity induced by 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene and its 3,4-diol metabolite utilizing a rat in vitro ovarian culture system. Toxicol Appl Pharmacol 234:361-9

Ikeda Y, Swain A, Weber TJ, Hentges KE, Zanaria E, Lalli E, Tamai KT, Sassone-Corsi P, Lovell-Badge R, Camerino G, Parker KL, 1996. Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: potential links in endocrine development. Mol Endocrinol 10:1261-72

Ingraham HA, Hirokawa Y, Roberts LM, Mellon SH, McGee E, Nachtigal MW, Visser JA, 2000. Autocrine and paracrine Mullerian inhibiting substance hormone signaling in reproduction. Recent Prog Horm Res 55:53-67; discussion 67-8

Jagarlamudi K, Liu L, Adhikari D, Reddy P, Idahl A, Ottander U, Lundin E, Liu K, 2009. Oocyte-specific deletion of Pten in mice reveals a stage-specific function of PTEN/PI3K

signaling in oocytes in controlling follicular activation. PLoS One 4:e6186

Jamin SP, Arango NA, Mishina Y, Behringer RR, 2002. Genetic studies of MIS signalling in sexual development. Novartis Found Symp 244:157-64; discussion 164-8, 203-6, 253-7

Jick H, Porter J, 1977. Relation between smoking and age of natural menopause. Report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program, Boston University Medical Center. Lancet 1:1354-5

John GB, Gallardo TD, Shirley LJ, Castrillon DH, 2008. Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. Dev Biol 321:197-204

Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Niikura Y, Tschudy KS, Tilly JC, Cortes ML, Forkert R, Spitzer T, Iacomini J, Scadden DT, Tilly JL, 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 JK, Tilly JL, 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. Nature 428:145-50

Josso N, 1992. Anti-mullerian hormone and Sertoli cell function. Horm Res 38 Suppl 2:72-6

Josso N, Clemente N, 2003. Transduction pathway of anti-Mullerian hormone, a sex-specific member of the TGF-beta family. Trends Endocrinol Metab 14:91-7

Josso N, Picard JY, Tran D, 1977. The anti-Mullerian hormone. Birth Defects Orig Artic Ser 13:59-84

Joyce IM, Pendola FL, Wigglesworth K, Eppig JJ, 1999. Oocyte regulation of kit ligand expression in mouse ovarian follicles. Dev Biol 214:342-53

Kaipia A, Hsueh AJ, 1997. Regulation of ovarian follicle atresia. Annu Rev Physiol 59:349-63

Kao SW, Sipes IG, Hoyer PB, 1999. Early effects of ovotoxicity induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide in rats and mice. Reprod Toxicol 13:67-75

Kevenaar ME, Meerasahib MF, Kramer P, van de Lang-Born BM, de Jong FH, Groome NP, Themmen AP, Visser JA, 2006. Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. Endocrinology 147:3228-34

Kezele PR, Nilsson EE, Skinner MK, 2002. Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. Mol Cell Endocrinol 192:37-43

Kidder GM, Mhawi AA, 2002. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. Reproduction 123:613-20

Kierszenbaum AL, Tres LL, 2001. Primordial germ cell-somatic cell partnership: a balancing cell signaling act. Mol Reprod Dev 60:277-80

Kinney A, Kline J, Kelly A, Reuss ML, Levin B, 2007. Smoking, alcohol and caffeine in relation to ovarian age during the reproductive years. Hum Reprod 22:1175-85

Klein NA, Illingworth PJ, Groome NP, McNeilly AS, Battaglia DE, Soules MR, 1996. Decreased inhibin B secretion is associated with the monotropic FSH rise in older, ovulatory women: a study of serum and follicular fluid levels of dimeric inhibin A and B in spontaneous menstrual cycles. J Clin Endocrinol Metab 81:2742-5

Klinkert ER, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER, 2005. Expected poor responders on the basis of an antral follicle count do not benefit from a higher starting dose of gonadotrophins in IVF treatment: a randomized controlled trial. Hum Reprod 20:611-5

Knight PG, Glister C, 2006. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. Reproduction 132:191-206

Kobayashi A, Behringer RR, 2003. Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. Nat Rev Genet 4:969-80

Koyama H, Wada T, Nishizawa Y, Iwanaga T, Aoki Y, 1977. Cyclophosphamide-induced ovarian failure and its therapeutic significance in patients with breast cancer. Cancer 39:1403-9

La Marca A, Giulini S, Tirelli A, Bertucci E, Marsella T, Xella S, Volpe A, 2007. Anti-Mullerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. Hum Reprod 22:766-71

La Marca A, Stabile G, Artenisio AC, Volpe A, 2006. Serum anti-Mullerian hormone throughout the human menstrual cycle. Hum Reprod 21:3103-7

Lambalk CB, de Koning CH, Flett A, Van Kasteren Y, Gosden R, Homburg R, 2004. Assessment of ovarian reserve. Ovarian biopsy is not a valid method for the prediction of ovarian reserve. Hum Reprod 19:1055-9

Laurich VM, Trbovich AM, O'Neill FH, Houk CP, Sluss PM, Payne AH, Donahoe PK, Teixeira J, 2002. Mullerian inhibiting substance blocks the protein kinase A-induced expression of cytochrome p450 17alpha-hydroxylase/C(17-20) lyase mRNA in a mouse Leydig cell line independent of cAMP responsive element binding protein phosphorylation. Endocrinology 143:3351-60

Laws SC, Carey SA, Ferrell JM, Bodman GJ, Cooper RL, 2000. Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. Toxicol Sci 54:154-67

Lawson KA, Hage WJ, 1994. Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. Ciba Found Symp 182:68-84; discussion 84-91

Lee HJ, Selesniemi K, Niikura Y, Niikura T, Klein R, Dombkowski DM, Tilly JL, 2007. Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a

preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. J Clin Oncol 25:3198-204

Lee MM, Donahoe PK, 1993. Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. Endocr Rev 14:152-64

Leridon H, 1998. [30 years of contraception in France]. Contracept Fertil Sex 26:435-8

Lie Fong S, Lugtenburg PJ, Schipper I, Themmen AP, de Jong FH, Sonneveld P, Laven JS, 2008. Anti-mullerian hormone as a marker of ovarian function in women after chemotherapy and radiotherapy for haematological malignancies. Hum Reprod 23:674-8

Lodovici M, Akpan V, Evangelisti C, Dolara P, 2004. Sidestream tobacco smoke as the main predictor of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. J Appl Toxicol 24:277-81

Lohff JC, Christian PJ, Marion SL, Arrandale A, Hoyer PB, 2005. Characterization of cyclicity and hormonal profile with impending ovarian failure in a novel chemical-induced mouse model of perimenopause. Comp Med 55:523-7

Lohff JC, Christian PJ, Marion SL, Hoyer PB, 2006. Effect of duration of dosing on onset of ovarian failure in a chemical-induced mouse model of perimenopause. Menopause 13:482-8

Lovekamp-Swan T, Davis BJ, 2003. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. Environ Health Perspect 111:139-45

Ludeman SM, 1999. The chemistry of the metabolites of cyclophosphamide. Curr Pharm Des 5:627-43

MacLaughlin DT, Donahoe PK, 2002. Mullerian inhibiting substance: an update. Adv Exp Med Biol 511:25-38; discussion 38-40

MANDL AM, ZUCKERMAN S, 1951. The relation of age to numbers of oocytes. J Endocrinol 7:190-3

Martinez EM, Swartz WJ, 1991. Effects of methoxychlor on the reproductive system of the adult female mouse. 1. Gross and histologic observations. Reprod Toxicol 5:139-47

Masiakos PT, MacLaughlin DT, Maheswaran S, Teixeira J, Fuller AF Jr, Shah PC, Kehas DJ, Kenneally MK, Dombkowski DM, Ha TU, Preffer FI, Donahoe PK, 1999. Human ovarian cancer, cell lines, and primary ascites cells express the human Mullerian inhibiting substance (MIS) type II receptor, bind, and are responsive to MIS. Clin Cancer Res 5:3488-99

Massague J, 2000. How cells read TGF-beta signals. Nat Rev Mol Cell Biol 1:169-78

Massague J, Wotton D, 2000. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. EMBO J 19:1745-54

Mattison DR, Nightingale MS, 1982. Oocyte destruction by polycyclic aromatic hydrocarbons is not linked to the inducibility of ovarian aryl hydrocarbon (benzo(a)pyrene) hydroxylase activity in (DBA/2N X C57BL/6N) F1 X DBA/2N backcross mice. Pediatr Pharmacol (New York) 2:11-21

Mattison DR, Singh H, Takizawa K, Thomford PJ, 1989. Ovarian toxicity of benzo(a)pyrene and metabolites in mice. Reprod Toxicol 3:115-25

Mattison DR, White NB, Nightingale MR, 1980. The effect of benzo(a)pyrene on fertility, primordial oocyte number, and ovarian response to pregnant mare's serum gonadotropin. Pediatr Pharmacol (New York) 1:143-51

Mayer LP, Devine PJ, Dyer CA, Hoyer PB, 2004. The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. Biol Reprod 71:130-8

McGee EA, Hsueh AJ, 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocr Rev 21:200-14

McLaren A, 2000. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. Mol Cell Endocrinol 163:3-9

Meirow D, Lewis H, Nugent D, 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, Nugent D, 2001. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. Hum Reprod Update 7:535-43

Messika-Zeitoun L, Gouedard L, Belville C, Dutertre M, Lins L, Imbeaud S, Hughes IA, Picard JY, Josso N, di Clemente N, 2001. Autosomal recessive segregation of a truncating mutation of anti-Mullerian type II receptor in a family affected by the persistent Mullerian duct syndrome contrasts with its dominant negative activity in vitro. J Clin Endocrinol Metab 86:4390-7

Mikkelsen TF, Graff-Iversen S, Sundby J, Bjertness E, 2007. Early menopause, association with tobacco smoking, coffee consumption and other lifestyle factors: a cross-sectional study. BMC Public Health 7:149

Miller KP, Gupta RK, Flaws JA, 2006. Methoxychlor metabolites may cause ovarian toxicity through estrogen-regulated pathways. Toxicol Sci 93:180-8

Miller KP, Gupta RK, Greenfeld CR, Babus JK, Flaws JA, 2005. Methoxychlor directly affects ovarian antral follicle growth and atresia through Bcl-2- and Bax-mediated pathways. Toxicol Sci 88:213-21

Miyamoto Y, Taniguchi H, Hamel F, Silversides DW, Viger RS, 2008. A GATA4/WT1 cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation. BMC Mol Biol 9:44

Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K, 2002. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. Genes Cells 7:1191-204

Mlynarcikova A, Kolena J, Fickova M, Scsukova S, 2005. Alterations in steroid hormone production by porcine ovarian granulosa cells caused by bisphenol A and bisphenol A dimethacrylate. Mol Cell Endocrinol 244:57-62

Moore MJ, 1991. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. Clin Pharmacokinet 20:194-208

Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R, 1996. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. Nat Genet 14:62-8

Motashaw ND, Haji HK, Aloorkar SD, Sheth AR, Vaidya RA, 1977. The scope and limitations of laparoscopic ovarian biopsy in the diagnosis of secondary amenorrhea. J Reprod Med 18:278-80

Munsterberg A, Lovell-Badge R, 1991. Expression of the mouse anti-mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. Development 113:613-24

Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, Khadum I, Ranieri DM, Serhal P, 2005. Antral follicle count, anti-mullerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? BJOG 112:1384-90

Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H, Sathanandan M, 2004. Inhibin B and anti-Mullerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? BJOG 111:1248-53

Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten DL, Flanagan JN, Hammer GD, Ingraham HA, 1998. Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. Cell 93:445-54

Nachtigal MW, Ingraham HA, 1996. Bioactivation of Mullerian inhibiting substance during gonadal development by a kex2/subtilisin-like endoprotease. Proc Natl Acad Sci U S A 93:7711-6

Nardo LG, Christodoulou D, Gould D, Roberts SA, Fitzgerald CT, Laing I, 2007. Anti-Mullerian hormone levels and antral follicle count in women enrolled in in vitro fertilization cycles: relationship to lifestyle factors, chronological age and reproductive history. Gynecol Endocrinol 23:486-93

Nelson SM, Yates RW, Fleming R, 2007. Serum anti-Mullerian hormone and FSH: prediction of live birth and extremes of response in stimulated cycles--implications for individualization of therapy. Hum Reprod 22:2414-21

Nilsson EE, Skinner MK, 2002. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. Biol Reprod 67:1018-24

Nilsson EE, Skinner MK, 2003. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. Biol Reprod 69:1265-72

Notarnicola C, Malki S, Berta P, Poulat F, Boizet-Bonhoure B, 2006. Transient expression of SOX9 protein during follicular development in the adult mouse ovary. Gene Expr Patterns 6:695-702

Otsuka F, Shimasaki S, 2002. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. Proc Natl Acad Sci U S A 99:8060-5

Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S, 2000. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. J Biol Chem 275:39523-8

Ousterhout J, Struck RF, Nelson JA, 1981. Estrogenic activities on methoxychlor metabolites. Biochem Pharmacol 30:2869-71

Packer AI, Hsu YC, Besmer P, Bachvarova RF, 1994. The ligand of the c-kit receptor promotes oocyte growth. Dev Biol 161:194-205

Padua D, Massague J, 2009. Roles of TGFbeta in metastasis. Cell Res 19:89-102

Pal L, Santoro N, 2002. Premature ovarian failure (POF): discordance between somatic and reproductive aging. Ageing Res Rev 1:413-23

Parrott JA, Skinner MK, 1999. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. Endocrinology 140:4262-71

Parry RL, Chin TW, Epstein J, Hudson PL, Powell DM, Donahoe PK, 1992. Recombinant human mullerian inhibiting substance inhibits human ocular melanoma cell lines in vitro and in vivo. Cancer Res 52:1182-6

Pedersen T, Peters H, 1968. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. J Reprod Fertil 17:555-7

Pelletier J, Schalling M, Buckler AJ, Rogers A, Haber DA, Housman D, 1991. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. Genes Dev 5:1345-56

Penarrubia J, Balasch J, Fabregues F, Carmona F, Casamitjana R, Moreno V, Calafell JM, Vanrell JA, 2000. Day 5 inhibin B serum concentrations as predictors of assisted reproductive technology outcome in cycles stimulated with gonadotrophin-releasing hormone agonist-gonadotrophin treatment. Hum Reprod 15:1499-504

Perez GI, Jurisicova A, Matikainen T, Moriyama T, Kim MR, Takai Y, Pru JK, Kolesnick RN, Tilly JL, 2005. A central role for ceramide in the age-related acceleration of apoptosis in the female germline. FASEB J 19:860-2

Perez GI, Tao XJ, Tilly JL, 1999. Fragmentation and death (a.k.a. apoptosis) of ovulated oocytes. Mol Hum Reprod 5:414-20

Perloe M, Levy DP, Sills ES, 2000. Strategies for ascertaining ovarian reserve among women suspected of subfertility. Int J Fertil Womens Med 45:215-24

Peters H, 1969. The development of the mouse ovary from birth to maturity. Acta Endocrinol (Copenh) 62:98-116

Picard JY, Josso N, 1984. Purification of testicular anti-Mullerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor. Mol Cell Endocrinol 34:23-9

Plowchalk DR, Mattison DR, 1991. Phosphoramide mustard is responsible for the ovarian toxicity of cyclophosphamide. Toxicol Appl Pharmacol 107:472-81

Plowchalk DR, Mattison DR, 1992. Reproductive toxicity of cyclophosphamide in the C57BL/6N mouse: 1. Effects on ovarian structure and function. Reprod Toxicol 6:411-21

Pouilles JM, Tremollieres F, Bonneu M, Ribot C, 1994. Influence of early age at menopause on vertebral bone mass. J Bone Miner Res 9:311-5

Racine C, Rey R, Forest MG, Louis F, Ferre A, Huhtaniemi I, Josso N, di Clemente N, 1998. Receptors for anti-mullerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A 95:594-9

Rajapaksa KS, Sipes IG, Hoyer PB, 2007. involvement of microsomal epoxide hydrolase enzyme in ovotoxicity caused by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. Toxicol Sci 96:327-34

Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Graem N, Muller J, Cate RL, Skakkebaek NE, 1999. Expression of anti-Mullerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. J Clin Endocrinol Metab 84:3836-44

Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W, Hamalainen T, Peng SL, Lan ZJ, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Liu K, 2008. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. Science 319:611-3

Reddy P, Shen L, Ren C, Boman K, Lundin E, Ottander U, Lindgren P, Liu YX, Sun QY, Liu K, 2005. Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHRL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. Dev Biol 281:160-70

Ren S, Yang JS, Kalhorn TF, Slattery JT, 1997. Oxidation of cyclophosphamide to 4-hydroxycyclophosphamide and deschloroethylcyclophosphamide in human liver microsomes. Cancer Res 57:4229-35

Rey R, Lukas-Croisier C, Lasala C, Bedecarras P, 2003. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. Mol Cell Endocrinol 211:21-31

Rey R, Sabourin JC, Venara M, Long WQ, Jaubert F, Zeller WP, Duvillard P, Chemes H, Bidart JM, 2000. Anti-Mullerian hormone is a specific marker of sertoli- and granulosa-cell origin in gonadal tumors. Hum Pathol 31:1202-8

Rohan TE, Negassa A, Chlebowski RT, Lasser NL, McTiernan A, Schenken RS, Ginsberg M, Wassertheil-Smoller S, Page DL, 2008. Estrogen plus progestin and risk of benign proliferative breast disease. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 17:2337-43

Rohr J, Allen EG, Charen K, Giles J, He W, Dominguez C, Sherman SL, 2008. Anti-Mullerian hormone indicates early ovarian decline in fragile X mental retardation (FMR1) premutation carriers: a preliminary study. Hum Reprod 23:1220-5

Sahambi SK, Visser JA, Themmen AP, Mayer LP, Devine PJ, 2008. Correlation of serum anti-Mullerian hormone with accelerated follicle loss following 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced follicle loss in mice. Reprod Toxicol 26:116-22

Salmon NA, Handyside AH, Joyce IM, 2004. Oocyte regulation of anti-Mullerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice. Dev Biol 266:201-8

Salmon NA, Handyside AH, Joyce IM, 2005. Expression of Sox8, Sf1, Gata4, Wt1, Dax1, and Fog2 in the mouse ovarian follicle: implications for the regulation of Amh expression. Mol Reprod Dev 70:271-7

Santen RJ, Paulsen CA, 1973. Hypogonadotropic eunuchoidism. II. Gonadal responsiveness to exogenous gonadotropins. J Clin Endocrinol Metab 36:55-63

Scheffer GJ, Broekmans FJ, Dorland M, Habbema JD, Looman CW, te Velde ER, 1999. Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. Fertil Steril 72:845-51

Schmidt KL, Byskov AG, Nyboe Andersen A, Muller J, Yding Andersen C, 2003. Density and distribution of primordial follicles in single pieces of cortex from 21 patients and in individual pieces of cortex from three entire human ovaries. Hum Reprod 18:1158-64

Segev DL, Ha TU, Tran TT, Kenneally M, Harkin P, Jung M, MacLaughlin DT, Donahoe PK, Maheswaran S, 2000. Mullerian inhibiting substance inhibits breast cancer cell growth through an NFkappa B-mediated pathway. J Biol Chem 275:28371-9

Seifer DB, Lambert-Messerlian G, Hogan JW, Gardiner AC, Blazar AS, Berk CA, 1997. Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. Fertil Steril 67:110-4

Seifer DB, MacLaughlin DT, Christian BP, Feng B, Shelden RM, 2002. Early follicular serum mullerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. Fertil Steril 77:468-71

Sharara FI, Seifer DB, Flaws JA, 1998. Environmental toxicants and female reproduction. Fertil

Steril 70:613-22

Shen WH, Moore CC, Ikeda Y, Parker KL, Ingraham HA, 1994. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. Cell 77:651-61

Shi Y, Massague J, 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. Cell 113:685-700

Shumaker SA, Legault C, Rapp SR, Thal L, Wallace RB, Ockene JK, Hendrix SL, Jones BN 3rd, Assaf AR, Jackson RD, Kotchen JM, Wassertheil-Smoller S, Wactawski-Wende J, 2003. Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. JAMA 289:2651-62

Simpson JL, Rajkovic A, 1999. Ovarian differentiation and gonadal failure. Am J Med Genet 89:186-200

Skinner MK, 2005. Regulation of primordial follicle assembly and development. Hum Reprod Update 11:461-71

Sklar CA, Mertens AC, Mitby P, Whitton J, Stovall M, Kasper C, Mulder J, Green D, Nicholson HS, Yasui Y, Robison LL, 2006. Premature menopause in survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study. J Natl Cancer Inst 98:890-6

Smith BJ, Plowchalk DR, Sipes IG, Mattison DR, 1991. Comparison of random and serial sections in assessment of ovarian toxicity. Reprod Toxicol 5:379-83

Soares SR, Simon C, Remohi J, Pellicer A, 2007. Cigarette smoking affects uterine receptiveness. Hum Reprod 22:543-7

Sonmezer M, Oktay K, 2004. Fertility preservation in female patients. Hum Reprod Update 10:251-66

Speed RM, 1982. Meiosis in the foetal mouse ovary. I. An analysis at the light microscope level using surface-spreading. Chromosoma 85:427-37

Springer LN, McAsey ME, Flaws JA, Tilly JL, Sipes IG, Hoyer PB, 1996. Involvement of apoptosis in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in rats. Toxicol Appl Pharmacol 139:394-401

Steele SJ, Beilby JO, Papadaki L, 1970. Visualization and biopsy of the ovary in the investigation of amenorrhea. Obstet Gynecol 36:899-902

Stocco DM, 2000. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. J Endocrinol 164:247-53

Strauss JF 3rd, Kallen CB, Christenson LK, Watari H, Devoto L, Arakane F, Kiriakidou M,

Sugawara T, 1999. The steroidogenic acute regulatory protein (StAR): a window into the complexities of intracellular cholesterol trafficking. Recent Prog Horm Res 54:369-94; discussion 394-5

Sutton C, 1974. The limitations of laparoscopic ovarian biopsy. J Obstet Gynaecol Br Commonw 81:317-20

Suzuki A, Sugihara A, Uchida K, Sato T, Ohta Y, Katsu Y, Watanabe H, Iguchi T, 2002. Developmental effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on reproductive organs in female mice. Reprod Toxicol 16:107-16

Swartz WJ, Corkern M, 1992. Effects of methoxychlor treatment of pregnant mice on female offspring of the treated and subsequent pregnancies. Reprod Toxicol 6:431-7

Swartz WJ, Eroschenko VP, 1998. Neonatal exposure to technical methoxychlor alters pregnancy outcome in female mice. Reprod Toxicol 12:565-73

Takahashi M, Koide SS, Donahoe PK, 1986. Mullerian inhibiting substance as oocyte meiosis inhibitor. Mol Cell Endocrinol 47:225-34

Taketo T, Saeed J, Nishioka Y, Donahoe PK, 1991. Delay of testicular differentiation in the B6.YDOM ovotestis demonstrated by immunocytochemical staining for mullerian inhibiting substance. Dev Biol 146:386-95

Teixeira J, Donahoe PK, 1996. Molecular biology of MIS and its receptors. J Androl 17:336-41

Telfer EE, Gosden RG, Byskov AG, Spears N, Albertini D, Andersen CY, Anderson R, Braw-Tal R, Clarke H, Gougeon A, McLaughlin E, McLaren A, McNatty K, Schatten G, Silber S, Tsafriri A, 2005. On regenerating the ovary and generating controversy. Cell 122:821-2

Templeton A, Morris JK, Parslow W, 1996. Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment. Lancet 348:1402-6

Ten Dijke P, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S, 2002. Regulation of cell proliferation by Smad proteins. J Cell Physiol 191:1-16

Thompson KE, Bourguet SM, Christian PJ, Benedict JC, Sipes IG, Flaws JA, Hoyer PB, 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

Thomson AB, Critchley HO, Kelnar CJ, Wallace WH, 2002. Late reproductive sequelae following treatment of childhood cancer and options for fertility preservation. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 16:311-34

Tingen CM, Bristol-Gould SK, Kiesewetter SE, Wellington JT, Shea L, Woodruff TK, 2009. Prepubertal primordial follicle loss in mice is not due to classical apoptotic pathways. Biol Reprod 81:16-25

Toner JP, 2003. Ovarian reserve, female age and the chance for successful pregnancy. Minerva Ginecol 55:399-406

Tran D, Josso N, 1982. Localization of anti-Mullerian hormone in the rough endoplasmic reticulum of the developing bovine sertoli cell using immunocytochemistry with a monoclonal antibody. Endocrinology 111:1562-7

Tremblay JJ, Robert NM, Viger RS, 2001. Modulation of endogenous GATA-4 activity reveals its dual contribution to Mullerian inhibiting substance gene transcription in Sertoli cells. Mol Endocrinol 15:1636-50

Tremblay JJ, Viger RS, 1999. Transcription factor GATA-4 enhances Mullerian inhibiting substance gene transcription through a direct interaction with the nuclear receptor SF-1. Mol Endocrinol 13:1388-401

Tremblay JJ, Viger RS, 2001. Nuclear receptor Dax-1 represses the transcriptional cooperation between GATA-4 and SF-1 in Sertoli cells. Biol Reprod 64:1191-9

Tsepelidis S, Devreker F, Demeestere I, Flahaut A, Gervy Ch, Englert Y, 2007. Stable serum levels of anti-Mullerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo-ovulatory women. Hum Reprod 22:1837-40

Tuttle AM, Stampfli M, Foster WG, 2009. Cigarette smoke causes follicle loss in mice ovaries at concentrations representative of human exposure. Hum Reprod 24:1452-9

Ueno S, Manganaro TF, Donahoe PK, 1988. Human recombinant mullerian inhibiting substance inhibition of rat oocyte meiosis is reversed by epidermal growth factor in vitro. Endocrinology 123:1652-9

Ueno S, Takahashi M, Manganaro TF, Ragin RC, Donahoe PK, 1989. Cellular localization of mullerian inhibiting substance in the developing rat ovary. Endocrinology 124:1000-6

Umland EM, 2008. Treatment strategies for reducing the burden of menopause-associated vasomotor symptoms. J Manag Care Pharm 14:14-9

Utian WH, Archer DF, Bachmann GA, Gallagher C, Grodstein F, Heiman JR, Henderson VW, Hodis HN, Karas RH, Lobo RA, Manson JE, Reid RL, Schmidt PJ, Stuenkel CA, 2008. Estrogen and progestogen use in postmenopausal women: July 2008 position statement of The North American Menopause Society. Menopause 15:584-602

Uzumcu M, Kuhn PE, Marano JE, Armenti AE, Passantino L, 2006. Early postnatal methoxychlor exposure inhibits folliculogenesis and stimulates anti-Mullerian hormone production in the rat ovary. J Endocrinol 191:549-58

van Beek RD, van den Heuvel-Eibrink MM, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Hakvoort-Cammel FG, van den Bos C, van den Berg H, Pieters R, de Muinck Keizer-Schrama SM, 2007. Anti-Mullerian hormone is a sensitive serum marker for gonadal function in women treated for Hodgkin's lymphoma during childhood. J Clin Endocrinol Metab 92:3869-74

Van Blerkom J, Davis PW, 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 den Hurk R, Zhao J, 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. Theriogenology 63:1717-51

van Rooij IA, Broekmans FJ, Scheffer GJ, Looman CW, Habbema JD, de Jong FH, Fauser BJ, Themmen AP, te Velde ER, 2005. Serum antimullerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. Fertil Steril 83:979-87

van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH, Themmen AP, 2002. Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. Hum Reprod 17:3065-71

Vanderhyden BC, Macdonald EA, Nagyova E, Dhawan A, 2003. Evaluation of members of the TGFbeta superfamily as candidates for the oocyte factors that control mouse cumulus expansion and steroidogenesis. Reprod Suppl 61:55-70

Vega EM, Egea MA, Mautalen CÀ, 1994. Influence of the menopausal age on the severity of osteoporosis in women with vertebral fractures. Maturitas 19:117-24

Visser JA, 2003. AMH signaling: from receptor to target gene. Mol Cell Endocrinol 211:65-73

Visser JA, de Jong FH, Laven JS, Themmen AP, 2006. Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. Reproduction 131:1-9

Visser JA, Olaso R, Verhoef-Post M, Kramer P, Themmen AP, Ingraham HA, 2001. The serine/threonine transmembrane receptor ALK2 mediates Mullerian inhibiting substance signaling. Mol Endocrinol 15:936-45

Visser JA, Themmen AP, 2005. Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. Mol Cell Endocrinol 234:81-6

Vitt UA, McGee EA, Hayashi M, Hsueh AJ, 2000. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. Endocrinology 141:3814-20

Wang J, Dicken C, Lustbader JW, Tortoriello DV, 2009. Evidence for a Mullerian-inhibiting substance autocrine/paracrine system in adult human endometrium. Fertil Steril 91:1195-203

Warne GL, Fairley KF, Hobbs JB, Martin FI, 1973. Cyclophosphamide-induced ovarian failure. N Engl J Med 289:1159-62

Watanabe K, Clarke TR, Lane AH, Wang X, Donahoe PK, 2000. Endogenous expression of Mullerian inhibiting substance in early postnatal rat sertoli cells requires multiple

steroidogenic factor-1 and GATA-4-binding sites. Proc Natl Acad Sci U S A 97:1624-9

Weakley BS, 1966. Electron microscopy of the oocyte and granulosa cells in the developing ovarian follicles of the golden hamster (Mesocricetus auratus). J Anat 100:503-34

Webber LJ, Stubbs S, Stark J, Trew GH, Margara R, Hardy K, Franks S, 2003. Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. Lancet 362:1017-21

Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC, Themmen AP, 2004. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. Mol Hum Reprod 10:77-83

Welt CK, 2004. Regulation and function of inhibins in the normal menstrual cycle. Semin Reprod Med 22:187-93

Western PS, Harry JL, Graves JA, Sinclair AH, 1999. Temperature-dependent sex determination in the American alligator: AMH precedes SOX9 expression. Dev Dyn 216:411-9

Wilson CA, di Clemente N, Ehrenfels C, Pepinsky RB, Josso N, Vigier B, Cate RL, 1993. Mullerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the transforming growth factor-beta superfamily. Mol Endocrinol 7:247-57

Wunder DM, Bersinger NA, Yared M, Kretschmer R, Birkhauser MH, 2008. Statistically significant changes of antimullerian hormone and inhibin levels during the physiologic menstrual cycle in reproductive age women. Fertil Steril 89:927-33

Yeh J, Kim B, Liang YJ, Peresie J, 2006. Mullerian inhibiting substance as a novel biomarker of cisplatin-induced ovarian damage. Biochem Biophys Res Commun 348:337-44

Yi SE, LaPolt PS, Yoon BS, Chen JY, Lu JK, Lyons KM, 2001. The type I BMP receptor BmprIB is essential for female reproductive function. Proc Natl Acad Sci U S A 98:7994-9

Yucebilgin MS, Terek MC, Ozsaran A, Akercan F, Zekioglu O, Isik E, Erhan Y, 2004. Effect of chemotherapy on primordial follicular reserve of rat: an animal model of premature ovarian failure and infertility. Aust N Z J Obstet Gynaecol 44:6-9

Zhan Y, Fujino A, MacLaughlin DT, Manganaro TF, Szotek PP, Arango NA, Teixeira J, Donahoe PK, 2006. Mullerian inhibiting substance regulates its receptor/SMAD signaling and causes mesenchymal transition of the coelomic epithelial cells early in Mullerian duct regression. Development 133:2359-69

ANNEXES

Annexe 1: Corrélation entre le taux sérique d'AMH et la population folliculaire de l'ovaire.

Annexe 2: Régulation de l'hormone anti-Müllerienne.

Annexe 1: Corrélation entre le taux sérique d'AMH et la population folliculaire de l'ovaire

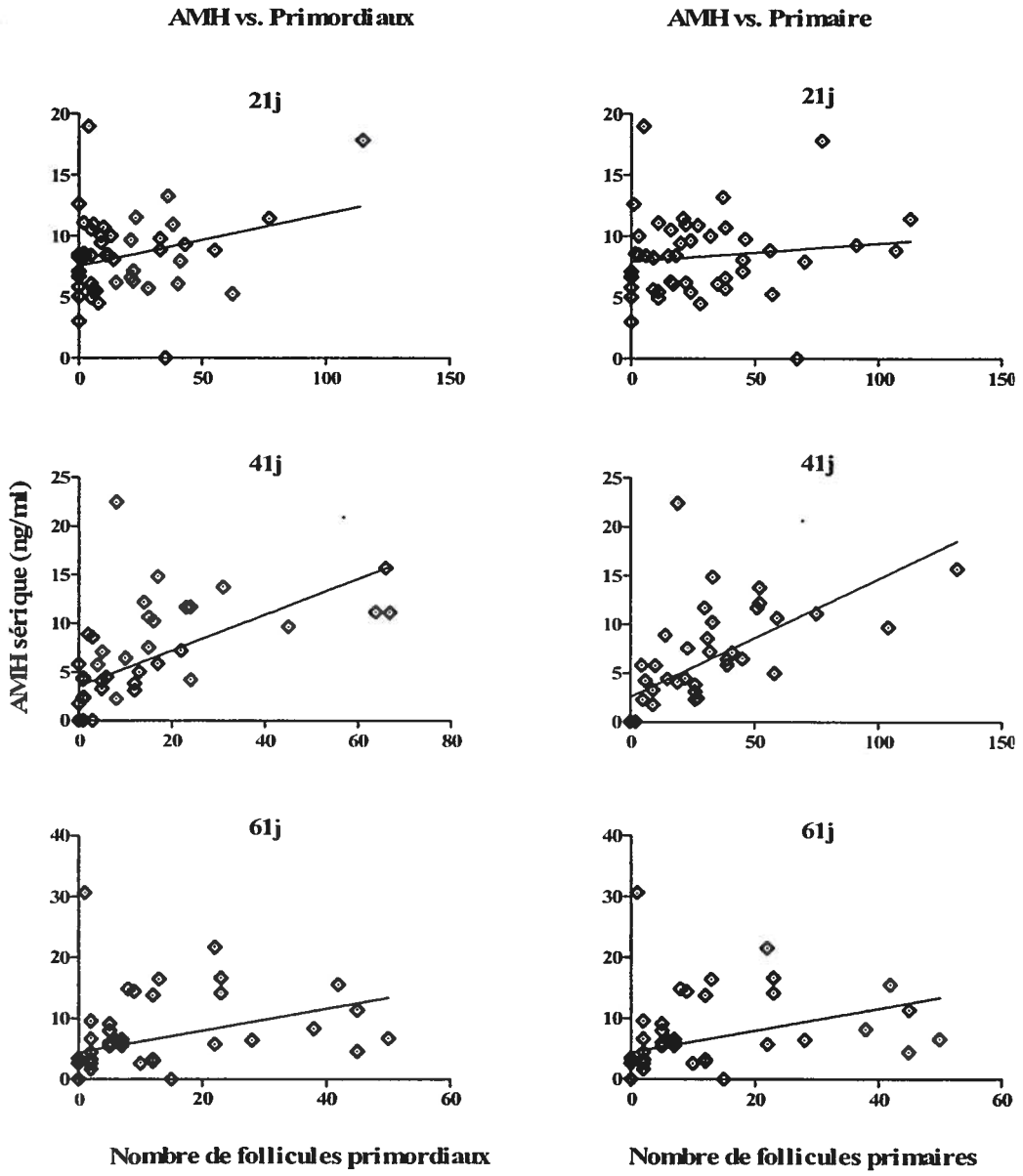

Figure 22: Corrélation des follicules primordiaux et des follicules primaires avec le taux sérique de l'AMH. Quelques soit le point de temps observé, le taux sérique d'AMH est corrélé au nombre de follicules primordiaux et l'est au nombre de follicules primaires à partir de 41j toutefois. (Test de Pearson).

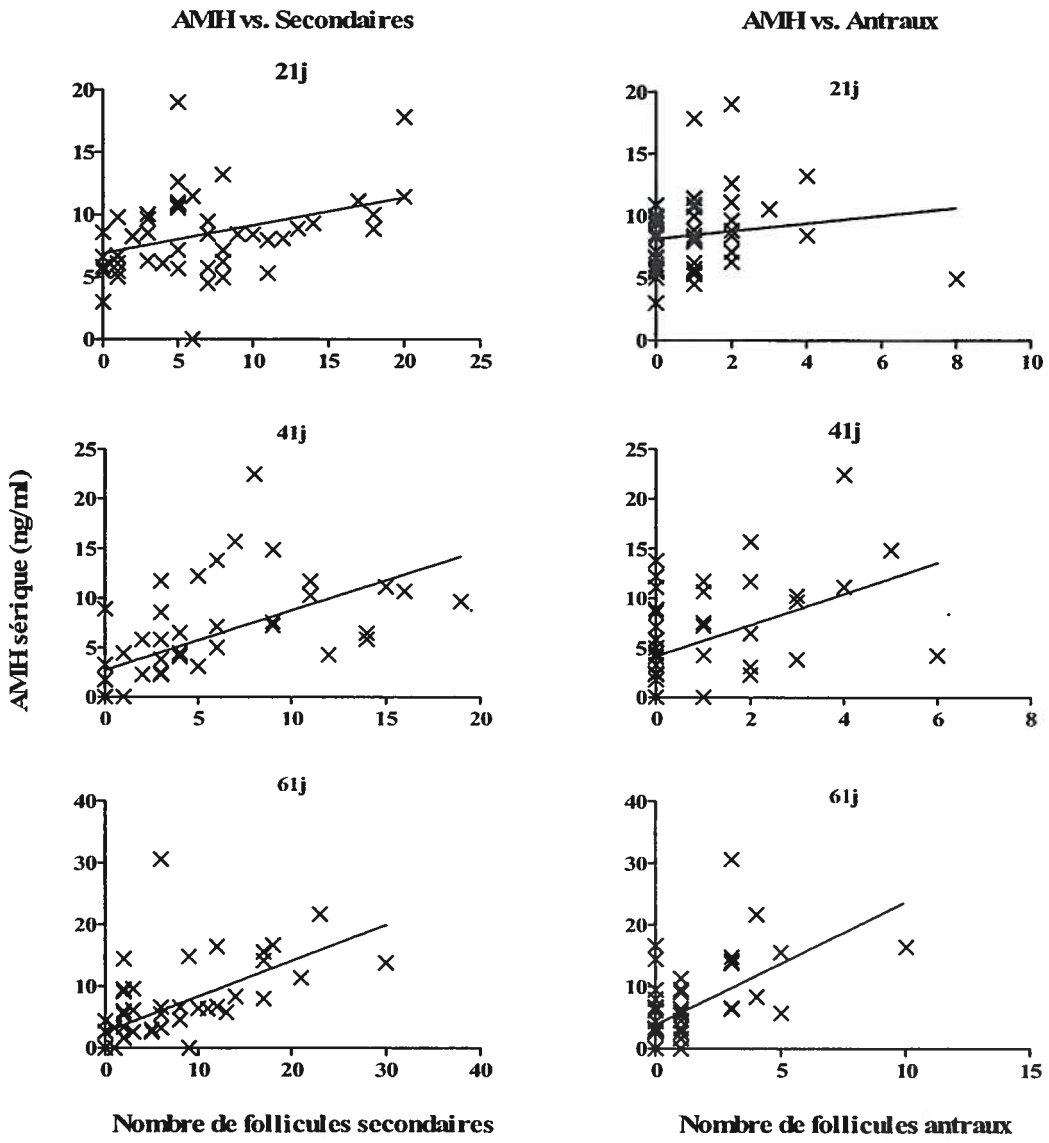

Figure 23: Corrélation des follicules secodaire et des follicules antraux avec le taux sérique de l'AMH. Quelques soit le point de temps observé, le taux sérique d'AMH présente une très forte corrélation avec le nombre des follicules secondaires. 21 jours après la première injection, le taux sérique d'AMH n'est pas corrélé au nombre de follicules antraux mais l'est par la suite à partir de 41j. (Test de Pearson).

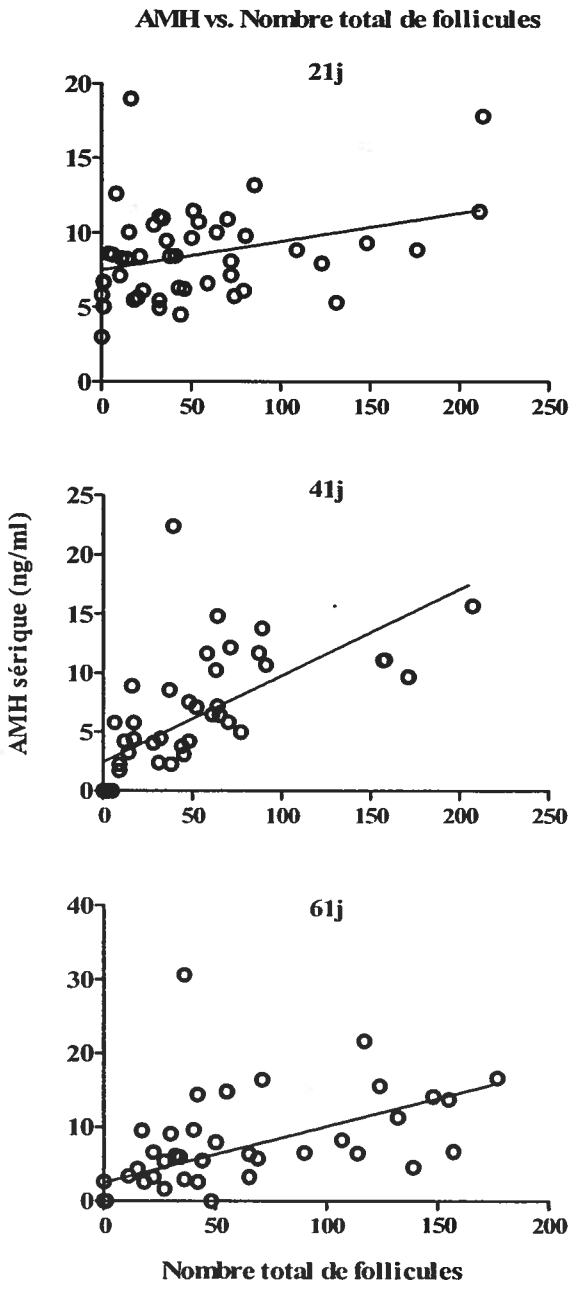

Figure 24: Corrélation des follicules ovariens au taux sérique de l'AMH. Quelques soit le point de temps observé, le taux sérique d'AMH présente une corrélation avec la réserve ovarienne dans son ensemble (follicule primordiaux à antraux). Cette corrélation est très forte à partir de 41j. (Test de Pearson).

Annexe 2 : Activation du promoteur du gène de l'hormone anti-Müllerienne.

Chez le mâle, le promoteur du gène est activé et/ou régulé par les facteurs SF-1, GATA-4, SOX9, WT-1 et DAX-1 (Tremblay *et al.* 2001; Tremblay & Viger, 1999; Tremblay & Viger, 2001). Chez la femelle, l'implication de ces différents facteurs dans l'activité du promoteur du gène AMH est méconnue. Une étude *in silico* nous a permis de déterminer plusieurs sites de liaison pouvant être reconnu par des facteurs de transcription qui seraient impliqués dans l'expression et la régulation du gène de l'AMH chez la femelle. La réalisation de retardation sur gel (electrophoretic mobility shift assay-EMSA) a suggéré l'implication de plusieurs facteurs de transcription déterminés *in silico* dans l'expression du gène de l'AMH chez la femelle.

Méthodes

Outils

Afin de déterminer les sites de fixation des facteurs de transcription, les séquences nucléiques ont été analysées à l'aide du programme Patch de Biobase (Biobase, 2008). L'analyse a été effectuée au sein de la base de données correspondant aux vertébrés. Seuls les facteurs de transcription dont la séquence consensus présente une homologie de séquence comprise entre 87.5% et 100% comparé à la séquence soumise seront sélectionnées. Ces paramètres permettent d'exclure les facteurs de transcription présentant une trop faible homologie de séquences. Ce sont les paramètres par défaut du programme. Le programme utilise la séquence nucléique des sites de liaison de facteurs de transcription provenant de différentes espèces. Une trop grande restriction risque d'exclure des facteurs de transcription en fonction de l'espèce dont provient la séquence analysée. Les alignements de séquences présentés ont été réalisés à l'aide du logiciel ClustalW (ClustalW, 2008).

Détermination de sites de fixation de facteurs de transcription au niveau du promoteur du gène de l'AMH

Les séquences théoriques du promoteur de l'AMH de l'humain, de la souris et du rat ont été analysées séparément à l'aide du programme PATCH. Les facteurs de transcriptions ont été triés selon qu'ils sont présents chez les trois espèces (facteurs communs) ou non (facteurs divergents).

Les facteurs de transcription communs aux trois espèces sont les plus susceptibles à être impliqué dans l'expression et la régulation du gène de l'AMH. Les séquences consensus (chez l'humain lorsque possible) de chaque facteur de transcription en commun répertoriés ont été recherchées en utilisant la base de données du programme PATCH public ou celle du site TESS si nécessaire. Au niveau de la région effectrice du promoteur de l'AMH, quelques sites d'intérêts ont pu être identifiés.

Retardation sur gel (EMSA)

Afin de caractériser les interactions entre les facteurs GATA4, SF-1 et LRH1 avec le promoteur de l'AMH, un gel de retardation (Electrophoretic mobility shift assay, EMSA) a été effectué. Des cellules de la granulosa provenant de souris CD-1 (âgées de 26 jours) ont été prélevées comme décrit précédemment (Chapitre II). La lignée cellulaire de cellule de sertoli, MSC-1, ont été collectée à partir d'un flacon de 75 cm^2 à confluence et une suspension de cellules de rein et de glandes surrénales ont également été utilisées comme contrôles positifs. Les MSC-1 sont connues pour exprimer les facteurs GATA-4 et SF-1 tandis que les cellules rénales/surrénales expriment les facteurs SF-1 et LRH-1. Ces cellules seront donc utilisées comme témoins positifs pour les facteurs qu'elles expriment.

a) Extraction des protéines nucléaires

Que ce soit pour les cellules de la granulosa, les cellules de sertoli et les cellules de rein/surrénales, une extraction de protéines nucléaires a été réalisée. Les cellules ont été centrifugées à 4°C et le culot a été rincé dans du PBS 1X à 4°C. Après la centrifugation, elles ont été resuspendues dans 1 ml de tampon I qui contient 25mM HEPES, 5mM KCl, 0.5mM MgCl2 et un cocktail d'inhibiteur de protéase 1X (Roche diagnostics, Laval, Qc, CANADA). Après avoir ajouté 1ml du tampon II (tampon I + 1% of NP-40), la suspension cellulaire a été agitée doucement Durant 15 min. Suite à une centrifugation d'1 min à 2,500 rpm, le culot cellulaire a été rincé dans 200µl de tampon III (mélange 50:50 de tampon I et II) et centrifugé à 2,500 rpm durant 1 min. Pour Lyser les membranes nucléaires, le culot a été resuspendu dans 100µl de tampon IV (25mM HEPES, 350mM NaCl, 10% sucrose, 0.01% NP-40) et agité délicatement durant 1h. Pour finir, la suspension protéique a été centrifuge à 16,000 rpm durant 10 min et le supernageant (protéines nucléaires) a été prélevé. La concentration protéique a été déterminée en

utilisant la méthode de Bradford en utilisant la BSA comme standard de référence. Le lysat protéique a été conserve à -80°C jusqu'à l'analyse.

b) Marquage des sondes et gel de retardation

Pour marquer les sondes sens GATA, SF1/LRH1 (Tableau 1), 1 unité de poly nucléotide kinase T4 et 10 pmole d'ATP [γ-^{32}P] ont été ajoutés à 50 ng de sondes sens et incubés à 37°C durant 1h. Les sondes marquées ont incubé avec 150 ng de sondes complémentaires non marquées à 95°C durant 5 min puis le mélange a refroidi à température ambiante durant 2h pour appariement. Les oligonucléotides doubles brins ont été purifiés en utilisant une colonne de sephadex G-25 non commercial. 2-5µg d'extraits nucléaires ont incubé à 4°C durant 1h dans un volume final de 20µl contenant approximativement 50 000cpm de sondes marquées, 1µg de poly (dI:dC), 100ng de BSA, 20 mM de Tris-Cl, pH 8.0, 20mM de DTT, 60mM de KCl, 1mM d'EDTA, pH 8.0, 0.2 mM de MgCl2 et 5% de glycérol. Les complexes Protéines/ADN ont été séparés des sondes libres sur un gel de 5% de polyacrylamide (29 :1 acrylamide:bis acrylamide, Biorad, Hercules, CA) dans du TBE 0.5X (22.5mM Tris-Borate, pH 8.2, 0.5 mM EDTA). Les échantillons ont migré sur gel durant 1h30 à 200V. Les gels ont été séchés durant 1h sous vide avant exposition au film à -80°C toute la nuit. Dans le cadre des réactions de compétitions, un excès molaire de 100X de sondes non marquées ou 1 µg d'anticorps anti-GATA4 ou anti-LRH1 (Abcam, Cambridge, MA) ou anti-SF-1 (Santa cruz, CA) ont été ajouté au mélange précédemment décrit.

Tableau 1. Oligonucléotides used in Electrophoretic mobility shift assay (EMSA).

Sites	Oligonucléotides	Séquences (5'–3')
SF-1	Sens	GATCCCCCAAGGTCACCTTTA
	Anti sens	GATCTAAAGGTGACCTTGGGG
SOX	Sens	GGACAGAAAGCCCTTTGAGACAGTCGCCTCC
	Anti sens	GGAGGCGACTGTCTCAAAGGGCTTTCTGTCC
GATA	Sens	GATCCTGGTGTTGATAGGGGCGTA
	Anti sens	GATCTACGCCCCTATCAACACCAC

Résultats

Détermination des facteurs de transcription communs entre les espèces

La séquence du promoteur du gène de l'AMH chez la souris présente des sites possiblement reconnues par environ 180 facteurs ou familles de facteurs de transcription. Celle du rat présente des sites possiblement reconnues par environ 155 facteurs ou familles de facteurs de transcription tandis que celle de l'humain est possiblement reconnue par environ 200 facteurs ou familles de facteurs de transcription. Seuls 61 facteurs ou familles de facteurs de transcription reconnaissent des séquences présentent à la fois dans la séquence promotrice du gène de l'AMH de l'humain, de la souris et du rat. Des séquences consensus reconnues par des facteurs de transcription membre de la superclasse des domaines en doigt de zinc ont été trouvées en grand nombre. La super classe des domaines en doigts de zinc regroupe de nombreux récepteurs aux stéroïdes. Ce sont des facteurs qui sont sensibles à l'environnement de la cellule incluant son environnement métabolique (ex : taux d'estradiol et d'acides gras). Les facteurs de transcription membre de cette superclasse sont probablement fortement impliqués dans l'expression et la régulation du gène de l'AMH du fait qu'ils sont en grande partie le reflet de l'environnement cellulaire. Ils seraient de bons candidats pour une étude plus approfondie (Tableau 3).La présence de sites de fixations pour quelques uns de ces facteurs de transcription au niveau de la région effectrice du promoteur de l'AMH est également observée (Figure 26).

Tableau 3: Sélection de facteurs de transcription à étudier en profondeur avec leur séquence consensus. *(Les séquences consensus proviennent du programme PATCH ou du site TESS. Les références correspondant à chaque facteur s'y trouvent)*

FACTEURS	SEQUENCES CONSENSUS	Synonymes
COUP-TF1	AGGTCAgAGGTCA	COUP; COUP-TF; EAR3; COUP-alpha; NR2F1.
ER	tcAGGTCACAGTGACCTga	ER; estrogen receptor; NR3A1
FXR (souris)	Pas d'informations disponibles pour l'humain	
GATA	**(A/T)GATA(C/G)**	
GR	AGAACAGGATGTTCT	glucocorticoid receptor; GR; NR3C1; GR alpha.
LXR	**AGGTCANNNAGGTCA**	NR1H3; LXR; nuclear orphan receptor LXR-alpha; LXRA; LXR A; LXR-A
MR	**AGAACANNNTGTTC**	mineralocorticoid receptor; MR; NR3C2
p58 (rat)	GTAAGATTCAGGTCATGACCTGAGGAGA	
PPAR	Pas d'informations disponibles pour l'humain	
PPUR	se lie au séquence riche en base purique	
PR	**AGAACANNNTGTTCT**	PR, PR B, progesterone receptor, progesterone receptor form B, NR3C3
R1	TGGGGTGAGTACTCCCTCTCAAAAGCGGGCA	
R2	pas d'informations disponibles	
RAR-alpha	cagGTTCAttttcaGTTCAttgc	RAR-alpha; retinoic acid receptor alpha; NR1B1
RXR	AGGTCAgAGGTCA	retinoid X receptor alpha, RXR-alpha, RXRA, NR2B1, RXR.
RXR beta	**TCAGGTCACAGTGACCTGA**	H2RIIBP; retinoid X receptor beta; RXR-beta; RXRB; NR2B2
SF-1	**TCAAGGTAA**	Ad4BP; NR5A1; steroidogenic factor 1; fushi tarazu factor homolog 1
Sp1	**Se lie aux éléments de la boîte GC**	Sp1; simian-virus-40-protein-1
T3R	**AGGTCATGACCT**	c-ErbA; T3R; thyroid hormone receptor; NR1A1; TR
VDR	**AGGTCANNNAGGTCA**	VDR, vitamin D receptor, NR1I1, 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor.
WT1	**CGCCCCCGC**	Wilms tumor zinc finger protein; WT1 +KTS; WT-ZFP

Gras : Séquences consensus Non Gras : Séquences consensus artificiel ou peu fiable

```
Rat     CCCAGGCAGATGGGA-ACGACCCAAGGACACCTC-GGCCTCTGCAGTTG-GGGGCTGGCT 155
Souris  -CCAGGGAGATGGGA-GCTACTCAAGGACAGCTCAGGCCTCTGCAGTTATGGGCCCAGCT 58
Humain  TGTTGACACATCAGGCCCAG----------CTCTATCACTG---GGGAGGGAGATAGGCT 484
Bovin   GTCTGACAAATGGGTCACAGGCCACACACACTGTATCGCTGCTCAGGAGATAGGCAGGCA 533
            *  * **  *   *                      **     *      *    **
                GR/PR          SRY
Rat     C-TGAGGACAGAAAG--CCTTTTGAGACAGCCGCCTCCCACCTGATGGGCATGCAAAGCG 212
Souris  C-TGAGGACAGAAAG--CCCTTTGAGACAGTCGCCTCCCACCTGCTGGGCATGAAAAGTG 115
Humain  GCCAGGGACAGAAAGGGCTCTTTGAGAAGGCCAC--TCTGCCTGGAGTGGGGGCGC---- 538
Bovin   CGTTCGAACAGAAGGGGC--TTTGAGAAGGCCA---TAGGCCTCCCAGGCTCACAG---- 584
            * ****** *  *  *******  * *        ***     *
                ER-α/β        SF-1                GATA
Rat     CAGCCAGGCACTGTCCCC-AAGGTCACCTC--AGGGGTTGATAGAGG--TGTCCCTCCCA 267
Souris  C---CAGGCACTGTCCCCCAAGGTCACCTT--TGGTGTTGATAGGGG--CGTCCCTCCCA 168
Humain  ----CGGGCACTGTCCCCCAAGGTCGCGGC---AGAGGAGATAGGGGTCTGTCCTGCACA 591
Bovin   ----CAGGCACCAGCCTTCAAGGTCATGTCCCAGGAGGAGATAGGGA-CCGCCCTGCACC 639
            * *****   **   ******          * *  ***** *    * **  * *
                GC box/CAAT box        TATA      WT-1
Rat     AC----CACT--CTGGCTCGA--ATGCATATAAGCAGGACCACCCAGACCCTGCCA--TG 317
Souris  ACCAAGCAAT--CTGGCTCAGCCATACATATAAGCAGGGCCACCCGGACCTTGCTG--TA 224
Humain  AACACCCCACCTTCCACTCGG---CTCACTTAAGGCAGGCAGCCCAGCCCCTGGCAGCAC 648
Bovin   A-CAAACAGC--TCTGCTCCC---TCTTATAAAGTAGGGCAGCCCAGCCCCTGGAAGCTC 693
        *     *         ***           ***   * *  *** * *  **
                M
Rat     CCACCATG 325
Souris  CCACCATG 232
Humain  CCACCATG 656
Bovin   CCAGCATG 701
        ***  ***
```

Figure 25: Mise en évidence de sites de liaisons pouvant être impliqués dans l'expression et la régulation du gène de l'AMH chez la femelle. Plusieurs sites découverts *in silico* sont impliqués dans l'expression du gène chez les mâles (carré noir) et pourrait l'être chez la femelle. Au niveau de la région effectrice du promoteur, on décèle la présence de d'autres sites pouvant être lié par des facteurs de transcription qui nécessiteraient des études supplémentaires (carré rouge).

Le facteur de transcription GATA-4 se lie au promoteur de l'AMH chez la femelle

Les échantillons ayant incubés avec la sonde marquée présente une bande spécifique aussi bien pour les extraits nucléaires provenant des MSC-1 que pour ceux des cellules de la granulosa (Figure 27A). L'ajout de sonde non marqué aux échantillons atténue la bande spécifique des complexes protéines/sondes marquées. La présence d'anticorps anti-GATA4 dans le milieu d'incubation entraîne la disparition de la bande spécifique et l'apparition d'une bande peu intense plus haute dans le gel (super shift). L'échantillon provenant des cellules de la granulosa ayant incubé avec la sonde marquée et l'anticorps anti-GATA4 ne présente aucune bande spécifique (super shift).

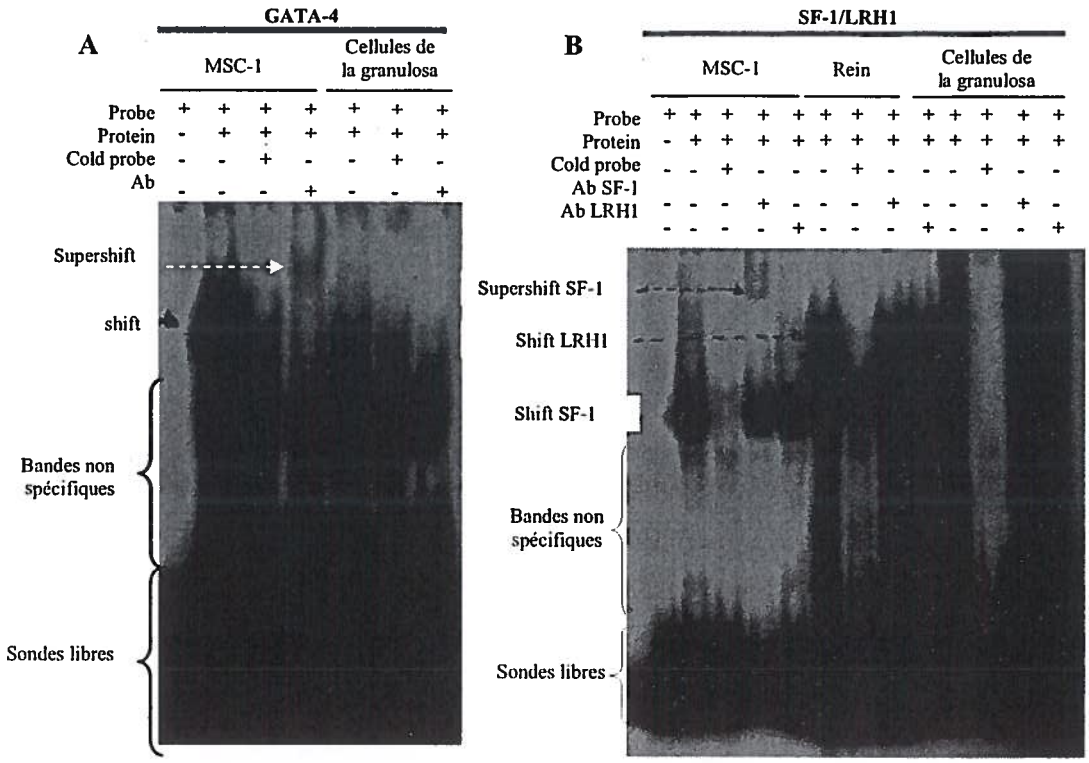

Figure 26: Implication de GATA-4, SF-1 et LRH1 dans l'expression du gène de l'AMH chez la femelle. La formation d'un complexe protéine/sonde GATA marquée induit l'apparition d'une bande spécifique aussi bien dans le cadre de la lignée MSC-1 (contrôle positif) que pour les cellules de la granulosa (A). La présence de sonde froide ou d'anticorps anti-GATA-4 inhibe cette interaction suggérant que le facteur GATA-4 interagirait avec le site GATA présent au niveau du promoteur de l'AMH. L'implication des facteurs SF-1 ou LRH1 dans l'expression du gène AMH chez la femelle est probable mais pas explicite (B). Les interactions entre les protéines SF-1 et la sonde SF-1/LRH1 chez les MSC-1 (témoin positif pour le facteur SF-1) sont reflétées par la présence d'une bande spécifique. Celle-ci disparaît ou atténuée lors de la présence de sonde froide et d'anticorps anti-SF-1 respectivement. Les extraits de reins ayant incubés avec la sonde SF-1/LRH1 marquée présente deux bandes spécifiques qui pourraient correspondre aux interactions entre les protéines SF-1/ sonde et protéines LRH1/ sonde. Les réactions de super shift ne sont toutefois pas concluantes. Aucunes bandes spécifiques ne sont visibles dans le cadre des extraits de cellules de la granulosa.

Possible liaison des facteurs de transcription SF-1 et LRH1 au promoteur du gène de l'AMH chez la femelle

L'extrait nucléaire des MSC-1 ayant incubés avec les sondes marquées présentes une bande spécifique reflétant une interaction protéines/sondes (fig. 27B). Cette bande disparaît avec la présence de sondes froides. L'incubation avec l'anticorps anti-SF-1 aboutit à une bande moins

intense et l'apparition d'une deuxième bande peu intense plus haute dans le gel. L'incubation avec l'anticorps anti-LRH1 aboutit à la présence d'une bande similaire à celle obtenue lors de l'incubation avec la sonde marquée seule. Quant aux extraits nucléaires provenant des reins/surrénales, l'incubation avec la sonde marquée entraîne l'apparition de deux bandes spécifiques qui disparaissent lors de l'incubation avec la sonde froide. Que ce soit lors de l'incubation avec l'anticorps anti-SF-1 ou anti-LRH1, aucune modification au niveau du nombre de bandes ou de leur intensité n'a été observée. Les extraits de cellules de la granulosa ayant incubé avec la sonde marquée ne semble pas présenter de bandes spécifiques témoins d'interactions protéines/ADN. Bien que l'incubation avec la sonde froide induise la disparition de l'ensemble des bandes présentes auparavant avec la sonde marquée, l'incubation avec les anticorps anti-SF-1 ou anti-LRH1 ne change pas le patron de migration.

Discussion

La présente étude fournit des bases à une étude plus approfondie de l'expression et la régulation du gène de l'AMH chez la femelle. L'étude *in silico* a mis en évidence la présence de sites de liaison possible au promoteur d'AMH, commun chez plusieurs espèces. Il a été démontré expérimentalement que les sites SF-1, GATA, SOX et WT-1 seraient impliqués dans l'activation du promoteur de l'AMH chez le mâle. D'autres expériences in vitro sont nécessaires pour confirmer l'implication de ces sites et des facteurs de transcription qui s'y lient dans l'expression du gène chez la femelle. L'implication de facteurs de transcription de la classe des stéroïdes serait une autre piste intéressante à étudier. Récemment, il a été démontré chez des cellules cancéreuses prostatiques, l'implication du calcitriol dans l'activation du promoteur du gène de l'AMH (Malloy *et al.* 2009).

Le facteur de transcription GATA-4 est impliqué dans l'activation du promoteur du gène de l'AMH chez le mâle (Tremblay & Viger, 1999). Les données présentées ici suggèrent qu'il serait également impliqué dans l'activation du promoteur du même gène chez la femelle. Le facteur GATA4 est présent au niveau des noyaux des cellules de la granulosa. L'absence de bande lors de l'incubation de l'extrait nucléaire avec l'anticorps anti-GATA-4 suggère la formation d'un complexe immun qui pourrait empêcher l'interaction de la sonde marquée et la protéine et/ou empêcher la migration du complexe dans le gel. Il est nécessaire de confirmer ce

résultat par des expériences *in vitro* via la transfection de cellules primaires et/ou tumorales de cellules de la granulosa. Les résultats obtenus quant à l'implication des facteurs SF-1 et LRH-1 chez les cellules de la granulosa ne sont pas concluant. Des investigations supplémentaires seront nécessaires.

En conclusion, ces résultats suggèrent l'implication de différents sites de liaison présents chez l'ensemble des espèces étudiées. Parmi les facteurs de transcription pouvant s'y fixer, on suggère ici l'implication du facteur GATA-4 chez la femelle. Des expériences complémentaires sont prévues au sein de notre laboratoire afin d'étayer les résultats présentées ici.

Références- Annexes

Biobase. Patch. 2008. http://www.biobase-international.com/index.php?id=292

Carlsson IB, Scott JE, Visser JA, Ritvos O, Themmen AP, Hovatta O, 2006. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. Hum Reprod 21:2223-7

Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP, 2002. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. Reproduction 124:601-9

Malloy PJ, Peng L, Wang J, Feldman D, 2009. Interaction of the vitamin D receptor with a vitamin D response element in the Mullerian-inhibiting substance (MIS) promoter: regulation of MIS expression by calcitriol in prostate cancer cells. Endocrinology 150:1580-7

Tremblay JJ, Robert NM, Viger RS, 2001. Modulation of endogenous GATA-4 activity reveals its dual contribution to Mullerian inhibiting substance gene transcription in Sertoli cells. Mol Endocrinol 15:1636-50

Tremblay JJ, Viger RS, 1999. Transcription factor GATA-4 enhances Mullerian inhibiting substance gene transcription through a direct interaction with the nuclear receptor SF-1. Mol Endocrinol 13:1388-401

Visser JA, de Jong FH, Laven JS, Themmen AP, 2006. Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. Reproduction 131:1-9

Visser JA, Themmen AP, 2005. Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. Mol Cell Endocrinol 234:81-6

Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC, Themmen AP, 2004. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. Mol Hum Reprod 10:77-83