

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

CARACTÉRISATION DES DOMMAGES À L'ADN DANS LES FOLLICULES  
OVARIENS DE RONGEURS APRÈS UNE EXPOSITION À UN AGENT  
CHIMIOTHÉRAPEUTIQUE

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maîtrise en sciences (M.Sc.) expérimentales de la santé

**Par**

STEPHANIE KRISTINA PETRILLO

**Jury d'évaluation**

Directeur de recherche :  
Dr Patrick J. Devine

Évaluateur interne :  
Dre Cathy Vaillancourt

Évaluateur externe :  
Dre Larissa Takser,  
Université de Sherbrooke



## Résumé

Au cours des dernières années, il y a eu une augmentation des problèmes de fertilité et un recul de l'âge auquel les femmes ont leur premier enfant. Cette période d'attente peut avoir des effets néfastes sur les ovaires puisqu'ils peuvent être exposés à de nombreux xénobiotiques et toxiques qui affectent le système reproducteur. Le nombre de gamètes (follicules ovariens primordiaux) contenu dans l'ovaire est défini dès la naissance. Chez les mammifères, les ovocytes des follicules primordiaux constituent un type cellulaire unique, bloqué en méiose jusqu'à l'ovulation. L'épuisement de cette source non renouvelable mène à la ménopause qui est un processus normal chez la femme.

Certaines expositions environnementales peuvent induire une perte accélérée des follicules primordiaux qui résultent en un arrêt prématuré et permanent de la fonction physiologique de l'ovaire, la ménopause précoce. Les expositions aux traitements anti-cancéreux (chimiothérapie et radiation ionisante) et le tabagisme sont connus pour la destruction des follicules ovariens et en particulier les follicules primordiaux. Par contre, les mécanismes responsables de leur destruction ne sont pas bien connus. Il a été suggéré que les dommages à l'ADN des gamètes puissent être un mécanisme explicatif éventuel. Toutefois, l'existence de mécanismes de réparations des dommages à l'ADN au sein des follicules est inconnue. De plus, la structure de l'ovaire et la dispersion hétérogène des follicules font en sorte qu'il est difficile d'évaluer la réserve ovarienne ou encore d'évaluer la qualité des gamètes après des expositions néfastes.

Dans cette étude, un système de culture d'ovaires *in vitro* de rongeurs nouveaux-nés et des expériences *in vivo* utilisant des souris ont été employés afin d'étudier la capacité des ovocytes à détecter les dommages causés à l'ADN. Nous avons utilisé le cyclophosphamide (CPA), un agent chimiothérapeutique alkylant couramment utilisé, comme exemple concret et reconnu d'une exposition ovotoxique. La moutarde phosphoramidée (MP), le métabolite actif du CPA, induit des dommages à l'ADN (incluant les cassures à doubles brins) dans les cellules cancéreuses. La MP a

aussi été identifiée comme étant le métabolite ovotoxique responsable d'effets néfastes (ex. infertilité et ménopause précoce) chez les femelles exposées aux agents anti-cancéreux. La comparaison de différentes concentrations de MP nous a permis d'identifier la plus faible concentration qui induit la perte de follicules primordiaux chez les souris et les rattes. Nos expériences *in vivo* avec le CPA ont permis de déterminer les doses qui causent une perte de follicules primordiaux chez les souris CD-1. Des analyses histologiques incluant le comptage de follicules ont mis en évidence le fait que la MP détruit différents types cellulaires selon le stade folliculaire. Les cellules germinales (ovocytes) des petits follicules sont ciblées par la MP et les cellules somatiques (cellules de la granulosa) sont ciblées dans les grands follicules. Nous avons aussi déterminé que les cassures d'ADN à doubles brins (DSB) semblent, au moins, en partie responsable des effets ovotoxiques de la MP au niveau des petits follicules. De faibles concentrations de MP (0,1-30  $\mu$ M) ont diminué significativement le nombre de follicules primordiaux et petits primaires chez les ovaires des souris CD-1 et rattes Sprague-Dawley *in vitro*. De plus, une dose de CPA (250 mg/kg) a significativement réduit le nombre de follicules primordiaux dans les souris CD-1 *in vivo* 24 h après l'exposition. Les DSBs sont présentes à des concentrations égales à celles qui diminuent significativement le nombre de follicules primordiaux. Les DSBs étaient présentes dans les petits follicules de manière proportionnelle à la concentration de MP. Elles étaient aussi présentes avant que la perte de follicules soit évidente (12-24 h) et persistent aux points de temps où la perte était achevée (8 jours). Ces résultats m'ont permis de montrer qu'il y existe une différence de sensibilité entre les espèces et les souches à la MP, mais que cette différence est liée à une différence physiologique des ovaires et non à une différence de métabolisme hépatique. Ils ont aussi démontré d'une manière concrète que les follicules peuvent détecter les dommages à l'ADN et possèdent peut être des mécanismes de réparations. Les résultats présentés dans l'article et l'annexe suggèrent que les toxiques qui ciblent les petits follicules agissent avec un mécanisme commun, les DSBs.

  
Stephanie Kristina Petrillo

  
Patrick J. Devine

## Avant-propos

Les données présentées dans ce mémoire ont été produites durant ma maîtrise en sciences expérimentales de la santé.

Mon projet de maîtrise est basé sur des résultats préliminaires provenant d'expériences commencées par Patrice Desmeules. J'ai effectué la majorité des expériences et analyses de résultats présentées dans l'article. Les expériences et le traitements des données présentés dans les figures 1 et 2 de l'article ont été effectués par Patrice Desmeules, la troisième expérience *in vivo* faisant parti du tableau 1 et la figure 8 a été complétée par la Dre. To-Quyen Truong. J'ai effectué toutes les expériences et les analyses de résultats présentées en annexe de ce mémoire.

Les résultats de mon projet ont été présentés sous forme d'affiches à plusieurs reprises: deux colloques du Réseau de recherche en santé environnementale (2007, 2008) et le congrès Armand-Frappier (2007). J'ai également présenté mes résultats lors des congrès internationales incluant une affiche lors du congrès *International Congress in Toxicology* (2007), une présentation orale au congrès de la *Society of Toxicology* (2008) et une présentation orale (présenté par la Dre. To-Quyen Truong) au congrès de la *Society of Toxicology* (2009).

## Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, Patrick J. Devine. Sa gentillesse, sa patience, son soutien et ses encouragements ont fait que cette expérience soit non seulement instructive mais aussi enrichissante.

Je voudrais aussi souligner le soutien de mes collègues de laboratoire, en particulier la Dre. Sukhdeep Kaur Sahambi et Thérèse Choisi.

Je voudrais remercier les évaluateurs, Mesdames Vaillancourt et Takser, pour la générosité dont elles ont fait preuve en tant que membre de mon jury et pour leurs recommandations quant au contenu de ce mémoire.

## Table des matières

Résumé.....	iii
Avant-propos.....	v
Remerciements.....	vi
Table des matières.....	vii
Liste des abréviations.....	ix
Liste des figures.....	xii
Liste des tableaux.....	xii
Section I : revue de littérature.....	1
1 Physiologie ovarienne.....	1
1.1 La structure ovarienne.....	2
1.2 La folliculogenèse.....	2
1.3 Les follicules ovariens.....	3
1.3.1 Les stades folliculaires.....	4
1.3.2 L'activation des follicules primordiaux.....	7
1.3.3 Incidence du nombre de follicules sur la fertilité.....	9
1.3.4 L'atrésie.....	10
1.4 L'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique.....	11
1.5 Les conséquences de la ménopause sur la santé.....	12
2 Exposition aux toxiques.....	13
2.1 Mécanismes d'actions de certains agents ovotoxiques.....	13
2.2 Métabolisme et détoxification de produits toxiques par l'ovaire.....	15
3 Chimiothérapie et les effets sur le système reproducteur.....	16
3.1 Les différents agents de chimiothérapie et leurs effets sur le système reproducteur.....	16
3.2 Évaluation de la réserve ovarienne.....	18
3.3 L'importance de la santé des ovocytes.....	19
3.4 Augmentation des suivants des cancers infantiles.....	20
4 Cyclophosphamide.....	21
4.1 Utilisation du cyclophosphamide.....	21
4.2 Métabolisme du cyclophosphamide.....	21

4.3 Mécanismes de toxicité des moutardes nitrogénées .....	22
4.4 La toxicité du cyclophosphamide au niveau du système reproducteur.....	23
4.4.1 Effets du cyclophosphamide chez les gamètes mâles.....	23
4.4.2 Effets du cyclophosphamide chez les gamètes femelles.....	24
5 Dommages à l'ADN et voies de réparation .....	26
5.1 Structure de la chromatine.....	26
5.2 Les réponses aux dommages à l'ADN .....	27
5.2.1 Les cassures à doubles brins : les pires dommages à l'ADN .....	28
5.3 Les voies de réparations .....	29
5.4 Réparations des DSBs et phosphorylation de l'histone H2AX.....	31
5.5 Dommages à l'ADN des gamètes.....	34
Objectifs .....	36
Section II: Article .....	39
Discussion générale et conclusions .....	81
Liste des références .....	94
Annexe : Effets du 4-vinylcyclohexene diépoxyde (VCD) sur des ovaires de rongeurs néonataux cultivés .....	113

## Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique  
ADH : alcool déshydrogénase  
Ahr : *aryl hydrocarbon receptor*  
ALDH : aldéhyde déshydrogénase  
AMH : hormone anti-Müllerienne  
AMPc : adénosine 3',5' cyclique monophosphate  
AP : aldophosphamide  
ATM : *ataxia-telangiectasia mutated*  
ATR : *ATM- Rad3- related*  
B(a)P : Benzo- $\alpha$ -pyrène  
BER : réparation par l'excision de base  
bFGF : *basic fibroblast growth factor*  
BMP-4 : *bone morphogenic proteins*  
Caspase : *Cysteiny aspartate-specific protease*  
cGy : centi Gray  
CHO : *Chinese Hamster Ovary cells* (lignée cellulaire)  
CPA : cyclophosphamide  
CPM : carboxyphosphamide  
CYP : cytochrome P450  
DEHP : *Di-(2-ethylhexyl)phthalate*  
DMBA : diméthylbenz[ $\alpha$ ]anthracène  
DNA-PK : *DNA-dependent protein kinase*  
DNA-PKcs : *DNA-PK catalytic subunit*  
DSB : cassures à doubles brins  
E : jour de gestation  
ED : *effective dose*  
ESD : *effective sterilizing dose*  
FIV : fécondation *in vitro*  
FSH : *follicle stimulating hormone*  
GMPc : guanosine monophosphate cyclique  
GnRH : gonadolibérine  
GSH : glutathion  
GST : glutathion S-transferase  
Gy : Gray  
h : heure  
HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique  
HeLa : lignée cellulaire venant d'une tumeur hépatique  
HR : *Homologous recombination*  
HRT : *hormone replacement therapy*  
H2AX : Histone H2A variant X  
IGF-1 : *insulin-like growth factor 1*  
I.p. : intrapéritonéale  
KGF : *keratinocyte growth factor*  
Kit : CD117 ou *C-kit receptor*

KL: *Kit Ligand*  
 KO : knock-out  
 LED: lupus érythémateux disséminé  
 LH : *lutinizing hormone*  
 LhRH: hormone de libération des gonadotrophines  
 LIF : *leukemia inhibitory factor*  
 MCF-7 : lignée cellulaire de tumeur mammaire humaine, souvent utilisé pour tester les effets estrogéniques  
 MDC1: un gène "*Mediator of DNA damage checkpoint 1*"  
 mEH: *microsome epoxide hydrolase*  
 MEHP: *mono-(2-ethyl)phthalate*  
 MIV : maturation *in vitro*  
 MMS: *methylanesulfonate*  
 MMR: réparation d'un mésappariement  
 MNNG : *N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine*  
 MP : moutarde phosphoramidée  
 MTX: méthoxychlore  
 M059J : lignée cellulaire de gliome humain  
 M059K : lignée cellulaire de gliome humain  
 NER : réparation par l'excision de nucléotide  
 NHEJ : *Non homologous end joining*  
 Pb : paire de base  
 PIKK : *phosphoinositide 3-kinase-related kinase*  
 PI3K : *phosphoinositol 3-kinase*  
 PMSG: *pregnant mare serum gonadotropin*  
 PND : jour post-natal  
 RPA: *replication protein A*  
 PCR: *polymerase chain reaction*  
 PPAR : *peroxisome proliferator-activated receptors*  
 PTEN : *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*  
 RI: radiation ionisante  
 ROS: espèces réactives oxygénées  
 SF-268 : lignée cellulaire de glioblastome humain  
 SSB: cassures à simples brins  
 S1P: *sphingosine-1-phosphate*  
 TUNEL : *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*  
 Ubc13 : *Ubiquitin carrier protein 13* ou *Ubiquitin-protein ligase 13*  
 UV : rayons ultra violets  
 U2OS : lignée cellulaire venant d'une tumeur cancéreuse du tissu osseux  
 VCD : 4-vinylcyclohexène diépoxyde  
 VCH : vinylcyclohexène  
 V(D)J : recombinaison d'ADN chez les lymphocytes pour produire une diversité d'anticorps  
 XLF: *XRCC4-like factor* ou *Cernunnos*  
 XRCC4 : Un gène "*x-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4*"  
 γH2AX: phospho-H2AX

4-OH-CPA : 4-hydroxycyclophosphamide

4-KTCP : 4-ketocyclophosphamide

53BP1: *p53 binding protein 1*

## Liste des figures

Figure 1 : Illustration de follicules ovariens .....	4
Figure 2 : Folliculogénèse et développement des stades folliculaires.....	6
Figure 3 : La perte de follicules ovariens chez la femme et le lien avec la fertilité.....	9
Figure 4 : L'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique.....	12
Figure 5 : Principaux événements impliqués dans le métabolisme du cyclophosphamide .....	22
Figure 6 : Alkylation d'une guanine par une moutarde nitrogénée.....	23
Figure 7 : La structure de la chromatine et les différents niveaux de condensation .....	27
Figure 8 : Les causes et conséquences des cassures à doubles brins d'ADN .....	29
Figure 9 : Facteurs impliqués dans la réparation des cassures à doubles brins via la recombinaison homologue ou <i>non-homologous end joining</i> .....	31
Figure 10 : Les conséquences possibles d'une exposition aux gamètes qui induits des dommages à l'ADN .....	35
Figure 11 : La structure de métabolites ovotoxiques contenant deux groupes réactifs..	113
Figure 12 : Nombre de petits follicules dans des ovaires de souris cultivés 8 jours après une exposition à différentes concentrations de 4-vinylcyclohexène diépoxyde...	116
Figure 13 : Immunomarquages pour $\gamma$ H2AX dans des ovaires de souris CD-1 nouveaux-nés de 4 jours et exposées au 4-vinylcyclohexène diépoxyde en culture....	117
Figure 14 : Immunomarquages pour $\gamma$ H2AX dans des ovaires de rattes Fisher 344 nouveaux-nés de 4 jours et exposées au 4-vinylcyclohexène diépoxyde en culture....	119

## Liste des Tableaux

Tableau 1 : Principaux facteurs impliqués dans la signalisation et la réparation des cassures à double brins d'ADN chez les mammifères.....	33
--	----

## Section I : revue de la littérature

### 1 Physiologie ovarienne

Le follicule correspond à l'unité fondamentale de l'ovaire (Pedersen et Peters, 1968; Hirshfield, 1991; Skinner, 2005). Ils sont essentiels à la fertilité car sans eux, aucune grossesse n'est possible. De plus, ils sont essentiels à la synthèse d'hormones telles que les estrogènes qui sont à l'origine du phénotype femelle et la progestérone qui est essentielle à la grossesse (Hirshfield, 1991; McGee et Hsueh, 2000; Pepling, 2006). Tous les mois, les mammifères femelles perdent plusieurs ovocytes (cellules germinales) lors de leurs cycles menstruels. Ces ovocytes sont expulsés par l'ovaire lors de l'ovulation. La plupart des ovocytes des follicules ovariens ne sont pas ovulés car ceux-ci sont détruits par atresie. L'atresie est un mécanisme au sein de l'ovaire qui sélectionne les meilleurs follicules pour être ovulé (Hirshfield, 1991). L'épuisement des follicules jusqu'à un certain seuil marque le début de la ménopause (Hirshfield, 1991; Faddy *et al.*, 1992; Faddy et Gosden, 1996). La ménopause, l'arrêt du cycle menstruel pendant au moins un an, est un processus normal chez les femmes qui est lié à la perte de follicules ovariens et les hormones qu'ils produisent. Cette condition est associée à plusieurs modifications physiologiques (discuté dans la partie 1.5).

Un des dogmes du domaine scientifique de la reproduction est que le nombre d'ovocytes (cellules germinales) dans les ovaires, est défini dès la naissance chez les humains et quelques jours après la naissance chez les rongeurs (Pedersen et Peters, 1968; Peters, 1969; Hirshfield, 1991; Rajah *et al.*, 1992; McLaren, 2000; Pepling, 2006). Un article publié par l'équipe menée par J.L Tilly dans le journal Nature en 2004 à réanimé une controverse datant des années '40 (Johnson *et al.*, 2004). Les chercheurs suggèrent avoir identifié les cellules souches, de lignées germinales de l'ovaire, qui donne naissance à de nouveaux gamètes post-natal. Cela pourrait être une source renouvelable de cellules germinales après la naissance (Johnson *et al.*, 2004). La même équipe de chercheurs mentionnent dans un autre article (Johnson *et al.*, 2005), que la source des cellules souches de lignée germinale qu'ils ont trouvé dans l'ovaire, proviennent de la moelle osseuse passant par le sang. Plus récemment, ils ont publié

une étude dans laquelle ils ont trouvé qu'une transplantation de la moelle osseuse peut restaurer la fertilité des souris exposées à la chimiothérapie (Lee *et al.*, 2007). Les résultats de Johnson *et al.* (2004, 2005), qui n'ont pu être reproduit dans d'autres laboratoires, ont été critiqués par des chercheurs à plusieurs reprises (Greenfeld et Flaws, 2004; Gosden, 2004; Byskov *et al.*, 2005; Telfer *et al.*, 2005; Gougeon, 2005; Eggan *et al.*, 2006). Il est important de noter que ces résultats sont intéressants même si la communauté scientifique ne les accepte pas encore à l'unanimité. Tant qu'il n'y aura pas des preuves additionnelles, provenant surtout d'équipes de recherches indépendantes, le dogme qui stipule que les follicules primordiaux sont limités reste accepté par la communauté scientifique.

### **1.1 La structure ovarienne**

L'ovaire est constitué de deux zones, la portion intérieure (le stroma ou la médulla) et la partie proche des parois, le cortex (Hirshfield, 1991; Fortune *et al.*, 2000; Fortune, 2003). Le stroma, une zone très vascularisée, est la seule zone où le sang, contenant des nutriments et d'autres facteurs importants pour la survie et croissance des follicules, circule. On retrouve essentiellement les petits follicules au niveau du cortex. L'ovaire d'un nouveau-né est riche en petits follicules comparé à un ovaire d'adulte où les follicules sont dispersés et moins nombreux dans le cortex. Lors de leur maturation, ils vont progresser vers le centre de l'ovaire (Hirshfield, 1991; McLaren, 2000; Fortune, 2003). Au sein des ovaires adultes, tous les stades folliculaires sont représentés. La majorité du volume ovarien chez les adultes est constitué surtout de grands follicules et des corps jaunes (Hirshfield, 1991).

### **1.2 La folliculogenèse**

Chez la souris, les ovogonies se différencient au 8<sup>e</sup> jour de gestation (E8). Elles migrent à travers le mésoderme dorsal de la partie postérieure de l'intestin et colonisent la gonade indifférenciée sur la crête génitale au E11-12 (McLaren, 2000). Les futures cellules somatiques des follicules (cellules de la granulosa et de thèques) proviennent de la gonade indifférenciée. Les ovogonies se multiplient en même temps que les

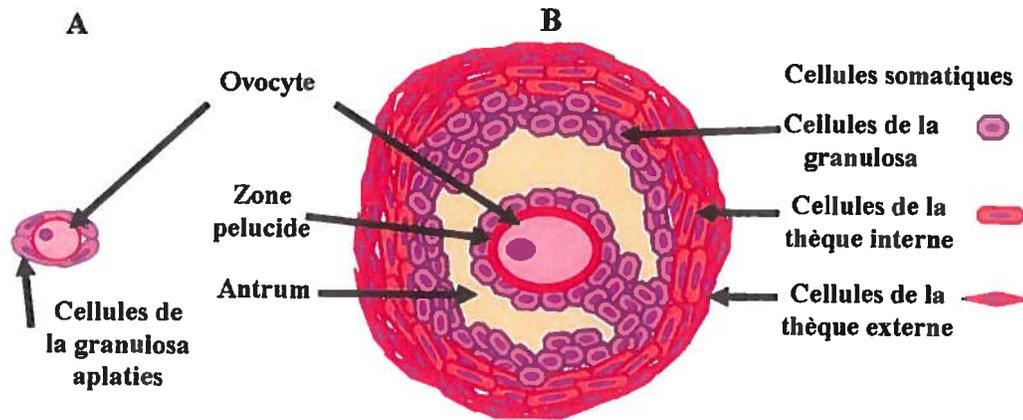
cellules somatiques. Au jour E18.5, les ovaires de souris et de rattes contiennent respectivement ~85 000 et ~75 000 ovogonies (Hirshfield, 1991). Dès la naissance, l'ovaire de rongeur ne contient que des cellules germinales et somatiques. L'établissement de la population des follicules primordiaux est achevé quelques jours (selon la souche) après la naissance (Hirshfield, 1991; Rajah *et al.*, 1992; McLaren, 2000). Chez les humains, la population d'ovogonies ( $\sim 5-7 \times 10^6$ ) est établit entre la 5<sup>e</sup> semaine et le 5<sup>e</sup> mois de gestation; quant aux follicules, ils sont formés avant la naissance (Encha-Razavi et Escudier, 2003)

Les ovogonies (de rongeurs et humains) sont regroupées en kystes et entourées de cellules somatiques (McLaren, 2000; Pepling et Spradling, 2001). Une fois que la réplication mitotique des ovogonies s'arrête, le nombre de cellules germinales n'augmente plus, et ces cellules deviennent la source non renouvelable des ovocytes. Les ovogonies deviennent des ovocytes lorsqu'il passe de la prophase I de la mitose (stade diplotène) à la méiose (E17.5 chez les souris) (Hirshfield, 1991; McLaren, 2000). Le passage en méiose des ovogonies ne se produit pas simultanément dans toutes les ovogonies mais plutôt par vagues (Bullejos et Koopman, 2004). Les premiers follicules primordiaux sont visibles au jour 2 post-natal (PND2) chez la souris et dès 4,5 mois de gestations chez l'humain (Hirshfield, 1991; Rajah *et al.*, 1992; Encha-Razavi et Escudier, 2003). Juste après la naissance, les rongeurs et les humains ont une perte massive d'ovocytes, de 75 000 à 27 000 chez la ratte PND2 et de  $5-7 \times 10^6$  à  $1-2 \times 10^6$  chez l'humain (Rajah *et al.*, 1992; Pepling et Spradling, 2001; Encha-Razavi et Escudier, 2003). Chez les rongeurs, l'ovaire aux PND7 est assez différent comparativement à la naissance car tous les follicules sont individualisés et définis, et les ovocytes sont arrêtés en prophase I de méiose (Rajah *et al.*, 1992).

### 1.3 Les follicules ovariens

Tous les follicules sont composés de cellules somatiques et de cellules germinales (Figure 1). Les ovocytes (cellules germinales) sont regroupés dans le cortex de l'ovaire et les cellules somatiques qui les entourent proviennent du stroma. Les plus

petits follicules ont un seul type de cellule somatique (cellules de la granulosa) tandis que les plus grands follicules ont aussi un deuxième type (cellules de la thèque). Les follicules primordiaux, qui sont en quiescence, ont une couche de cellules pré-granulosa (cellules de la granulosa aplaties, Figure 1A).

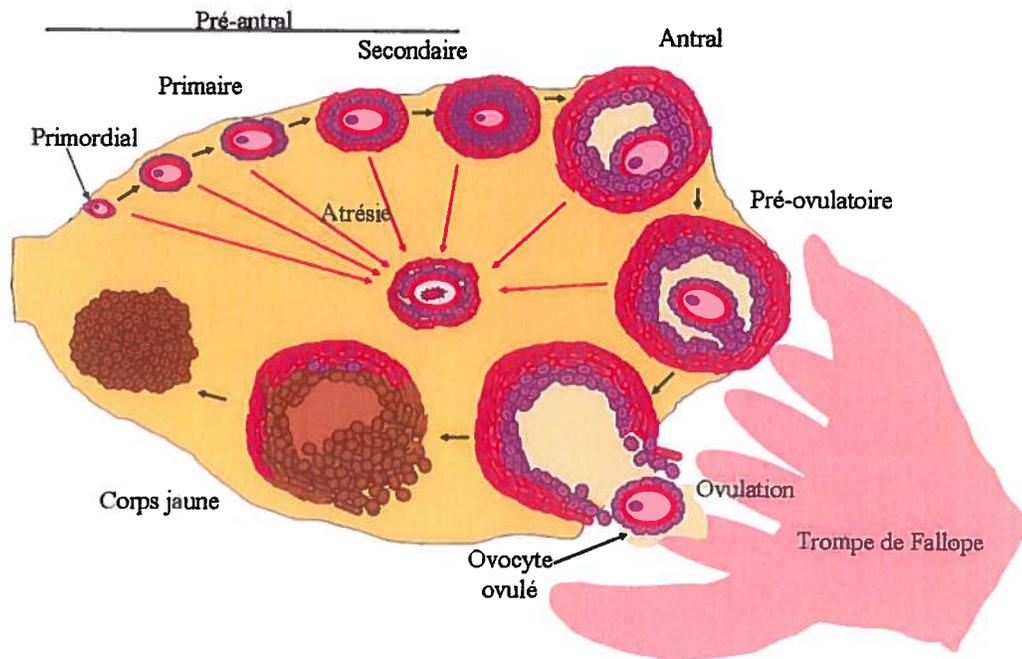


**Figure 1** : Illustration d'un follicule (A) primordial et (B) antral. Les follicules ovariens sont composés d'une cellule germinale (ovocyte) et plusieurs cellules somatiques (cellules de la granulosa et de la thèque). Les follicules primordiaux (premier stade folliculaire) sont en quiescence et incluent une couche de quelques cellules somatiques immatures (cellules de la granulosa aplaties). Les follicules plus matures, tels que les antraux, contiennent un ovocyte avec la zone pellucide bien défini ainsi que 6-12 épaisseurs des différents types de cellules somatiques (cellules de la granulosa et de la thèque). Les follicules antraux contiennent aussi un antrum, un espace entre les cellules somatiques rempli de fluide.

### 1.3.1 Les stades folliculaires

Les différents stades folliculaires présents chez la souris et la ratte ont été respectivement bien décrit par Pedersen et Peters (Pedersen et Peters, 1968; Peters, 1969) et Anne Hirshfield (Hirshfield, 1991) et ces stades sont similaires chez presque tous les mammifères. Tous les stades folliculaires sont présents dans un ovaire adulte (Figure 2). Le premier stade est un follicule primordial qui est un ovocyte entouré de quelques cellules de la granulosa aplaties, 3-5 dans une coupe histologique d'ovaire (Figure 1). Les follicules primordiaux correspondent au type 2 dans la classification décrit par Pedersen et Peters (Pedersen et Peters, 1968; Peters, 1969). Une fois activé

pour commencer le développement, les follicules primordiaux passent aux stades de follicules petits primaires (type 3a). Les facteurs de croissance qui sont impliqués dans l'activation des follicules primordiaux sont décrits en détail dans la section 1.3.2. Les petits primaires ont 3 à 19 cellules de la granulosa dont au moins 3 sont cuboïdes dans une coupe histologique. La transformation des cellules de la granulosa de forme aplatie à cuboïde démontre leur capacité à proliférer. La zone pellucide apparaît entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa. Elle est produite dans les follicules primaires et est composée de protéines sécrétées par l'ovocyte (Figure 1). Les grands primaires ont au moins 20 cellules de la granulosa dans une couche complète de cellules cuboïdes (type 3b). Les petits secondaires (type 4) ont deux couches complètes, les grands secondaires (type 5a or 5b) ont plus de deux couches mais pas d'antrum. Un antrum est un espace rempli de fluide entre les cellules de la granulosa. Il est présent seulement dans les grands follicules et son volume croît durant la maturation du follicule (Figure 1,2). Les follicules antraux ont entre 3 et 12 couches de cellules de la granulosa et un antrum. Les stades folliculaires chez la femme sont très similaires aux rongeurs sauf que les follicules pré ovulatoires (grands antraux) sont appelés « follicules de Graaf » (Hirshfield, 1991; Encha-Razavi et Escudier, 2003). Lors de l'ovulation, le cumulus oophorus (ovocyte et 1-2 couches de cellule de la granulosa à proximité de l'ovocyte) est expulsé de l'ovaire et se dirige vers les trompes de Fallope (Figure 2). La partie restante du follicule se referme et se transforme en corps jaune (Figure 2) ce dernier étant la source la plus importante de progestérone chez les femelles. La progestérone est essentielle à la poursuite d'une grossesse et au contrôle du cycle menstruel/estrous chez l'humain et le rongeur, respectivement (Peters, 1969; Hirshfield, 1991).



**Figure 2 :** Folliculogenèse et développement des stades folliculaires. Tous les stades folliculaires et leur développement sont représentés dans une illustration d'ovaire. Les ovocytes passent des stades pré-antraux, incluant les follicules primordiaux, primaires (petits et grands) et secondaires (petits et grands), au stade antral suivi du stade pré-ovulatoire. Après l'ovulation, le follicule se transforme en corps jaunes. Les stades susceptibles à l'élimination par l'atrésie (flèches rouges) sont illustrés. [Adapté sans permission de (Hoyer et Devine, 2002)].

Les cellules de la granulosa des petits follicules (des primordiaux aux grands primaires) sont insensibles aux effets des gonadotrophines et d'autres stéroïdes (Oktay *et al.*, 1997; Skinner, 2005). Les cellules de la granulosa des follicules secondaires et antraux contiennent des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse tel que l'aromatase, l'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol (cytochrome p450) et produisent l'hormone anti-Müllerienne (AMH) et l'inhibine qui joueraient un rôle dans la régulation de l'activation des follicules primordiaux (Visser et Themmen, 2005; Carlsson *et al.*, 2006). Les cellules de la granulosa (des follicules secondaires et antraux) produisent également de l'estradiol (Hirshfield, 1991). Lorsqu'elles se différencient en corps jaune (lutéinisation) après l'ovulation, elles produisent également la progestérone lors d'une grossesse (Hirshfield, 1991; Encha-Razavi et Escudier, 2003;

Skinner, 2005). Les autres cellules somatiques, présentes uniquement au sein des follicules grands primaires, secondaires et antraux, sont les cellules de la thèque interne et externe (Hirshfield, 1991). Les petits follicules n'ont pas leur propre vascularisation, tandis que les follicules matures ont 1 ou 2 artérioles autour des cellules de la granulosa, parmi les cellules de la thèque. Les cellules de la thèque interne sont aussi des cellules stéroïdogéniques et sont responsables de la production des androgènes, la rénine, des prostaglandines et de plusieurs autres hormones (Hirshfield, 1991; Oktay *et al.*, 1997; Skinner, 2005). Les androgènes synthétisés par les cellules de la thèques (l'androstènedione et la testostérone) sont les précurseurs de l'estradiol qui est produit par les cellules de la granulosa via l'aromatase (Hirshfield, 1991; Encha-Razavi et Escudier, 2003). Les cellules de la thèque externe ressemblent aux fibroblastes et leur(s) rôle(s) n'est pas bien connu (Hirshfield, 1991).

On estime que la maturation complète d'un follicule primordial prend de 19 à 38 jours chez la souris selon la souche et ~85 jours chez l'humain (Hirshfield, 1991; Hunt et Hassold, 2008). Le développement des premiers stades est plus long que celui des follicules plus matures. Plusieurs étapes sont nécessaires pour qu'un follicule soit complètement mature. Le follicule doit synthétiser des estrogènes, posséder les récepteurs de l'hormone folliculostimulante (FSH), l'hormone lutéinisante (LH), et *insulin like growth factor-1* (IGF-1).

### **1.3.2 L'activation des follicules primordiaux**

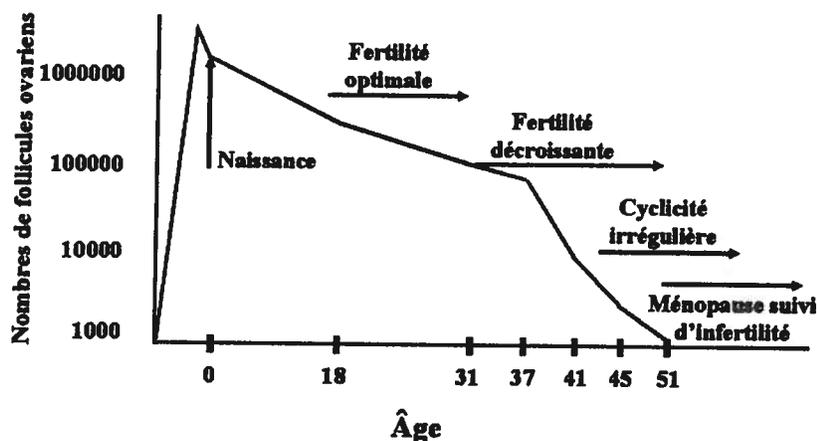
Le stade folliculaire primordial est quiescent et contient un ovocyte arrêté en prophase I de méiose. Étant en quiescence, leur métabolisme est au ralenti et il y a peu d'évidences morphologiques de biosynthèse (Hirshfield, 1991; Fortune, 2003). L'activation d'un follicule primordial se manifeste par une augmentation du volume de l'ovocyte et la transition de cellules de la granulosa aplaties à cuboïdes (Hirshfield, 1991; Skinner, 2005). L'activation des follicules primordiaux est un processus continu et irréversible. Ceux qui sont activés mais pas sélectionnés pour l'ovulation

seront éliminés par atresie (décrit dans la section 1.3.4) (Hirshfield, 1991; Fortune *et al.*, 2000; Fortune, 2003).

Les facteurs, autocrines et paracrines impliqués dans l'activation des follicules primordiaux sont nombreux mais peu connus. Certains facteurs tels que *Kit ligand* (KL), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *leukemia inhibitory factor* (LIF), *keratinocyte growth factor* (KGF), *bone morphogenic proteins* (BMP-4), ont montré (*in vitro et in vivo*) des effets positifs sur la transition des follicules primordiaux aux follicules petits primaires (Kezele *et al.*, 2002; Fortune, 2003; Skinner, 2005). KL, produit dans les cellules de la granulosa, semble initier la croissance et le développement des ovocytes (où se retrouve le récepteur de KL) ainsi que la prolifération des cellules de la granulosa et le recrutement de la thèque (Parrott et Skinner, 1999; Skinner, 2005). bFGF est produit par les ovocytes et semblent agir positivement sur les cellules somatiques adjacentes pour influencer le développement des follicules primordiaux. LIF, KGF et BMP-4 sont d'autres facteurs qui ont été impliqués directement ou qui ont un effet sur la transition des follicules primordiaux en petits primaires (Skinner, 2005). Un des facteurs récemment étudié, la *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10* (PTEN), un inhibiteur de la voie de *phosphoinositol 3-kinase* (PI3K), semble être impliqué dans la régulation de l'activation des follicules primordiaux (Reddy *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Reddy *et al.*, 2008). L'hormone anti-müllérienne (AMH), synthétisée par les cellules de la granulosa des follicules secondaires et petits antraux, semble contrôler le nombre de follicules en croissance via l'inhibition de l'activation des follicules primordiaux (Kevenaar *et al.*, 2006; Carlsson *et al.*, 2006). Le mécanisme qui implique l'AMH dans la folliculogenèse n'est pas complètement connu mais présente un grand intérêt pour l'étude de la reproduction chez les femelles (Visser et Themmen, 2005; Visser *et al.*, 2006; Wang et Hoog, 2006; Nilsson *et al.*, 2007).

### 1.3.3 Incidence du nombre de follicules sur la fertilité

Les ovocytes restent bloqués en méiose durant des années ou décennies (Hirshfield, 1991; Manger *et al.*, 2006). Le premier cycle menstruel d'une femme signifie que certains ovocytes précédemment arrêtés en méiose ont été activés et ovulés, un processus qui continuera pendant plusieurs décennies jusqu'à épuisement de la source des follicules (ménopause). Les ovaires de femmes matures (~37 ans et plus) présentent un taux d'atrésie élevé et un faible taux de follicules en croissance comparé aux ovaires de jeunes femmes (Faddy, 2000). Au début de la ménopause, l'ovaire peut avoir quelques centaines de petit follicules, mais pour des raisons inconnues, ces follicules ne réussissent pas à compléter leur développement et ils sont perdus plus rapide qu'auparavant (Faddy et Gosden, 1996; Faddy, 2000). 50% des femmes âgées d'autour 51 ans débute la ménopause lorsque le nombre de follicules primordiaux atteint le seuil de ~1000 (Figure 3) (Faddy et Gosden, 1996).



**Figure 3 :** La perte de follicules ovariens chez la femme et la fertilité. À la naissance, les ovaires des femmes contiennent le nombre maximum de follicules ovariens dont la majorité sont au stade primordial. Les femmes ont une fertilité optimale entre 16-35 ans même avec la perte graduelle de la réserve de follicules ovariens. Dès l'âge de ~37 ans, il y a une perte de follicules primordiaux plus intense qu'auparavant qui est lié à une fertilité décroissante et un cycle irrégulier. La ménopause est déclenchée lorsque l'ovaire contient ~1000 follicules et est suivi d'un état d'infertilité permanent. [Adapté sans permission de (Faddy *et al.*, 1992 ; Faddy, 2000 ; Desmeules, 2006)].

La croissance d'un follicule ne peut pas se poursuivre jusqu'au stade de grands follicules (antraux) sans l'aide de certaines hormones tels que les gonadotrophines, l'hormone de croissance ou l'hormone thyroïdienne. L'hormone folliculostimulante (FSH) a est un facteur qui induit la maturation des cellules de la granulosa (Hirshfield, 1991). La FSH est impliquée dans l'expression de l'inhibine, de l'aromatase, de l'IGF-1 et des récepteurs de LH et induit la synthèse de protéoglycans qui sont tous importants pour le développement des follicules et la reproduction. Seuls les follicules les plus avancés acquièrent les fonctions pour parvenir à la maturation finale. D'autres facteurs tels que les seconds messagers (AMPc et GMP cyclique) ou la perte de contact avec l'ovocyte peuvent induire la lutéinisation (différenciation du follicule en corps jaunes). La FSH permet aux follicules antraux de poursuivre leur développement jusqu'à l'ovulation. Le nombre de follicules sélectionnés pour l'ovulation est régulé par un mécanisme de rétrocontrôle impliquant plusieurs hormones (ex. FSH et LH) et l'atrésie (Hirshfield, 1991).

#### 1.3.4 L'atrésie

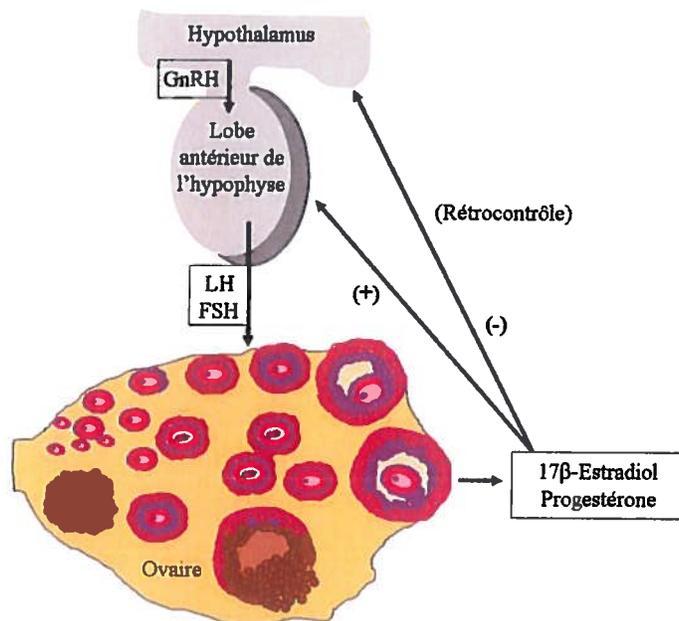
L'atrésie est un mécanisme d'élimination des follicules qui permet la sélection des meilleurs follicules pour la fécondation (Hirshfield, 1991; Fortune *et al.*, 2000; Encha-Razavi et Escudier, 2003). Des 400 000 ovocytes présents à la puberté chez la femme seuls 400 d'entre eux seront ovulés durant sa vie (Encha-Razavi et Escudier, 2003). La sélection pour l'atrésie pendant le développement folliculaire serait en partie imputable au fait qu'ils ne répondent pas suffisamment à la FSH et la LH (Pedersen et Peters, 1968; Peters, 1969; Hirshfield, 1991).

L'apoptose des cellules de la granulosa est acceptée comme étant un des mécanismes qui élimine les follicules lors de l'atrésie (Hsueh *et al.*, 1996; Kaipia et Hsueh, 1997; Hussein, 2005). Les études sur l'atrésie ont été effectuées sur des cellules de la granulosa provenant de follicules antraux. Toutefois, d'autres études ont démontrés que les follicules primordiaux et primaires ne présentent pas d'activation de certains marqueurs de l'apoptose tels que la fragmentation de l'ADN et l'activation de

la caspase 3 (Van Blerkom et Davis, 1998; Glamoclija *et al.*, 2005). Un autre groupe a suggéré que l'apoptose est aussi le mécanisme d'élimination des ovocytes car ils ont trouvé une augmentation de l'activité des caspase-3 (une caractéristique de l'apoptose) dans des ovocytes ovulés (Perez *et al.*, 1999; Perez *et al.*, 2005). Par contre, une étude effectuée pour caractériser les changements morphologiques dans l'ovocyte lors de l'atrésie a suggéré que la voie de mort cellulaire dans les ovocytes est ni la nécrose ni l'apoptose, mais plutôt un autre type de mort cellulaire (Devine *et al.*, 2000). Les informations concernant l'apoptose ou d'autres voies de morts cellulaires dans l'ovaire et surtout les ovocytes des follicules sont incomplets (Hussein, 2005; Escobar *et al.*, 2008).

#### **1.4 L'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique**

Le cycle reproducteur et la synthèse d'hormones ovariennes sont sous le contrôle de plusieurs hormones de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique (Figure 4) (Hirshfield, 1991). L'hormone gonadolibérine (GnRH) ou hormone de libération des gonadotrophines (LHRH) est produite par l'hypothalamus. GnRH stimule la synthèse d'hormones, FSH et LH, dans le lobe antérieur de l'hypophyse (Figure 4) (Hirshfield, 1991; Fortune, 2003). Pendant la phase folliculaire (première moitié du cycle menstruel), la prolifération des cellules de la granulosa des follicules (secondaires et antraux) est induite par la FSH. Cela résulte en une synthèse accrue d'estradiol. Au pic du cycle menstruel, le taux d'estradiol induit l'augmentation de la LH, ce qui induit l'ovulation de follicules matures et une diminution rapide du taux d'estradiol (Hirshfield, 1991; Fortune, 2003). La synthèse de GnRH est contrôlée par la progestérone, l'inhibine et l'estradiol par rétrocontrôle négatif (Figure 4). En absence de fécondation, les corps jaunes régressent et la diminution des taux d'hormones (estrogène, inhibine et progestérone) lève le rétrocontrôle négatif, ce qui permet la libération de GnRH et l'amorçage d'un nouveau cycle. Ce cycle se déroule sur une base mensuelle ou quatre jours chez l'humain et la souris respectivement jusqu'à la survenue d'une grossesse ou de la ménopause, période où il ne reste plus de follicules (Hirshfield, 1991; Faddy et Gosden, 1996).



**Figure 4 :** L'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique. L'hypothalamus produit la GnRH qui agit sur le lobe antérieur de l'hypophyse pour induire la synthèse de deux hormones importantes (LH, FSH). Elles agissent sur les follicules ovariens pour compléter leur maturation et ovulation. Les follicules antraux produisent l'estrogène (en particulier  $17\beta$ -estradiol) et la progestérone. Lorsque les taux de  $17\beta$ -estradiol et progestérone sont élevés, elles inhibent la maturation et l'ovulation de d'autres follicules en agissant sur l'hypothalamus et l'hypophyse par rétrocontrôle. [Adapté sans permission de (Hoyer and Devine, 2002)].

### 1.5 Les conséquences de la ménopause sur la santé

Il existe plusieurs expositions qui induisent la ménopause précoce. Ils incluent la génétique (Pal et Santoro, 2002), l'exposition aux traitements anti-cancéreux (Meirow et Nugent, 2001; Sklar, 2005; Sklar *et al.*, 2006) et le tabagisme (Jick *et al.*, 1977; Kinney *et al.*, 2007; Mikkelsen *et al.*, 2007) mais il y en existe plusieurs autres qui ne sont pas encore connus. La ménopause est souvent à l'origine d'effets secondaires désagréables, telles qu'une prise de poids, des bouffées de chaleur et des sueurs nocturnes (Umland, 2008). Il y a d'autres problèmes de santé plus sévères qui sont aussi associés à la ménopause surtout pour les femmes qui ont une ménopause précoce (Sklar *et al.*, 2006). Par exemple, les femmes ménopausées ont un risque accru de survenu d'ostéoporose (Vega *et al.*, 1994; Pouilles *et al.*, 1994), de problèmes

cardiovasculaires et de mort par maladies cardiovasculaires (de Kleijn *et al.*, 2002; Antonicelli *et al.*, 2008), dysfonctions psychosexuelles (Dennerstein *et al.*, 2001), tous des effets secondaires reliés au manque d'estrogènes. La thérapie de remplacement d'hormones (*hormone-replacement therapy*, ou HRT) est une façon de combattre les effets de la ménopause sur la santé des femmes. Par contre, certaines études ont montré un risque accru pour certains cancers incluant le cancer du sein. Même après plus de 20 ans de recherches, la balance entre les bénéfiques et les effets néfastes de HRT est controversés (Shumaker *et al.*, 2003; Hodis, 2008; Rohan *et al.*, 2008; Utian *et al.*, 2008).

## 2 Exposition aux toxiques

La fonction ovarienne, la cyclicité et la fertilité, peuvent être altérées après des expositions aux facteurs environnementaux. Les toxiques peuvent non seulement détruire les follicules mais aussi altérer la biosynthèse hormonale de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique et l'interaction entre les cellules somatiques et germinales (Hirshfield, 1997; Hoyer, 2005). Certaines expositions affectent des stades folliculaires spécifiques et d'autres ne montrent pas autant de spécificité. La destruction des follicules antraux provoque des effets tels que l'aménorrhée (arrêt du cycle menstruel pendant une durée de temps) et l'infertilité temporaire. Ces effets sont temporaires car les grands follicules sont remplacés par les petits qui se développent (Hoyer, 2005). Si les petits follicules sont détruits, les effets tels que l'infertilité, aménorrhée et ménopause précoce prennent plus de temps à se manifester mais sont généralement permanent (Hoyer, 2005).

### 2.1 Mécanismes d'actions de certains agents ovotoxiques

L'exposition aux phthalates est reconnue comme une cause de la destruction spécifique des follicules antraux (Lovekamp-Swan et Davis, 2003; Hoyer, 2005). Le *Di-(2-ethylhexyl)phthalate* (DEHP) est utilisé dans la production des plastiques incluant les emballages médicaux et alimentaires (Davis *et al.*, 1994a). *In vivo*, le

DEHP cause une réduction de la taille des cellules de la granulosa dans les follicules antraux, une diminution des taux d'estradiol, de progestérone et de LH et une augmentation du taux de FSH (Davis *et al.*, 1994a). Il a été montré *in vitro* que le *mono-(2-ethyl)phthalate* (MEHP), le métabolite actif du DEHP, inhibe l'aromatase dans les cellules de la granulosa via l'activation des *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs) qui sont des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'aromatase et l'estrogène (Davis *et al.*, 1994b; Lovekamp-Swan et Davis, 2003).

L'exposition au méthoxychlore (MTX), un pesticide organochloré, est un exemple d'exposition qui a une variété d'effets sur l'ovaire. Plusieurs études chez les rongeurs ont démontré que le MTX détruit les follicules antraux, et par conséquent réduit le volume ovarien et induit un cycle estrous continu. Des études chez les souris ont montré que le MTX augmente le stress oxydatif via les mitochondries et induit l'atrésie des cellules de la granulosa et la mort éventuel des follicules antraux (Gupta *et al.*, 2006a; Gupta *et al.*, 2006b). D'autres études chez les rats nouveaux-nés suggèrent que le MTX cause une hypersécrétion de l'AMH qui inhibe la folliculogénèse et résulte en moins de follicules en croissance et un volume ovarien réduit (Uzumcu *et al.*, 2006). Une étude chez les babouins suggère que les follicules de primates sont ~100 fois plus sensibles au MTX que ceux des rongeurs (Gupta *et al.*, 2007).

Un autre exemple d'expositions qui détruit les petits follicules et les follicules en croissance est le tabagisme et particulièrement les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Une méta analyse d'études épidémiologiques a suggéré que le tabagisme réduit la fécondité et augmente les risques d'infertilité (Augood *et al.*, 1998). Le 7,12-dimethylbenz[a]anthracène (DMBA), un HAP ovotoxique présent dans les cigarettes affecte tous les stades folliculaires chez les rongeurs (Rajapaksa *et al.*, 2007b; Igawa *et al.*, 2009). Le benzo(a)pyrène (BaP), un HAP, est un autre exemple de produits chimiques présents dans les cigarettes. Chez les rats, le BaP altère la folliculogénèse en réduisant le volume des follicules en croissance et diminue l'effet de la FSH, à des concentrations présentes dans le liquide folliculaire chez des fumeuses (Neal *et al.*, 2007).

Il existe des toxiques qui affectent particulièrement les follicules primordiaux. Les traitements anticancéreux tels que la radiation ionisante (RI) et les agents chimiothérapeutiques comme le CPA sont connus pour éliminer la réserve ovarienne en follicules primordiaux (Plowchalk et Mattison, 1991; Meirow *et al.*, 1999; Meirow et Nugent, 2001; Hoyer, 2005). Les effets du CPA sont décrits en détail dans la section 4. L'exposition au 2-bromopropane, un solvant, a causé la perte de follicules primordiaux chez les rattes et engendré l'infertilité, l'aménorrhée et la ménopause précoce chez un groupe de femmes coréennes exposées à ce dernier sur leur lieu de travail (usine) (Koh *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1999). Le 4-vinylcyclohexène diépoxyde (VCD) est un métabolite d'un sous produit industriel connu pour détruire uniquement les petits follicules, primordiaux et petits primaires, chez les rongeurs et les primates (Mayer *et al.*, 2004; Devine *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2005; Appt *et al.*, 2006). Le mécanisme d'action du VCD n'est pas bien connu, mais deux possibilités sont étudiées. La première serait l'induction de l'apoptose des ovocytes et des cellules de la granulosa (Springer *et al.*, 1996; Kao *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2001). Le deuxième mécanisme suggéré est que le VCD et ses métabolites interagissent avec la voie de signalisation de Kit/KitL qui est un facteur essentiel à la survie des follicules primordiaux et petit primaires (Fernandez *et al.*, 2008). Le VCD est utilisé pour produire un modèle animal de la ménopause.

## **2.2 Métabolisme et détoxification de produits toxiques par l'ovaire**

La majorité du métabolisme d'agents toxiques se produit au niveau du foie mais certains organes cibles peuvent détoxifier ou métaboliser ces agents. Le métabolisme de substances toxiques par l'ovaire dépend du toxique. Il existe deux groupes d'enzymes de biotransformation (phase I et phase II) dans l'organisme qui métabolisent les xénobiotiques et les rends (habituellement) moins toxiques. Les cytochromes p450 font partie des enzymes de la phase I et sont essentiels dans beaucoup de fonctions biologiques. L'ovaire contient plusieurs isoformes de cytochrome p450, tels que CYP1A1, 1B1, 1A, 2B et 2E1 (Cannady *et al.*, 2003; Rajapaksa *et al.*, 2007a). Certains toxiques sont bioactivés par l'ovaire lors de leur métabolisme tel que le 7,12-

dimethylbenz[a]anthracène (DMBA). En plus, l'ovaire contient le *microsome epoxide hydrolase* (mEH) et le glutathion S-transférase (GST), des enzymes de conjugaison et de détoxification (Lopez et Luderer, 2004; Keating *et al.*, 2008b). Alors les ovaires peuvent détoxifier certains agents toxiques. Par contre, dans l'ovaire de souris, les mEH et les CYP1A1 et 1B1 sont responsables de la bioactivation du DMBA à son métabolite ovotoxique ultime, 3,4,-diol-1,2-epoxide (Rajapaksa *et al.*, 2007b; Keating *et al.*, 2008a). Dans l'ovaire et le foie, le 4-vinylcyclohexène (VCH) est bioactivé en VCD par le CYP2E1 (Rajapaksa *et al.*, 2007a; Keating *et al.*, 2008a). Le métabolisme du CPA et du VCD sont discutés en détails dans la section 4 et l'annexe, respectivement.

### 3 Chimiothérapie et les effets sur le système reproducteur

#### 3.1 Les différents agents de chimiothérapie et leurs effets sur le système reproducteur

Les traitements anticancéreux sont associés à plusieurs effets secondaires qui atteignent le système reproducteur telles que l'infertilité, l'aménorrhée et même la survenue d'une ménopause précoce. Certaines femmes traitées contre le cancer, principalement avec des traitements utilisant des agents alkylants, souffrent de ces effets pendant et même après leurs traitements. Des études épidémiologiques ont montrées que 21 à 100% des femmes traitées contre le cancer du sein souffrent d'aménorrhée à cause du traitement (Bines *et al.*, 1996; Minton et Munster, 2002). Pour certaines femmes, l'aménorrhée est temporaire mais les traitements éliminent quand même leurs follicules. Donc elles souffrent tout de même d'une ménopause précoce plus tard dans leur vie, par rapport aux femmes non exposées. La radiation, la chimiothérapie ou la combinaison de ces deux types de traitements chez des enfants et jeunes femmes sont des facteurs très importants dans la survenue d'une ménopause précoce (Chemaitilly *et al.*, 2006). Lors des traitements avec la radiation, la sévérité des effets sur les ovaires sont dépendants de la dose et de l'âge au moment des traitements. Les doses de radiothérapie (Gy), auxquelles l'insuffisance ovarienne précoce

commence, ont été déterminées par un modèle mathématique: 14,3-20,3 Gy selon l'âge (0 à 30 ans) lors de l'exposition (Wallace *et al.*, 2003; Wallace *et al.*, 2005). Une étude a démontré que 1000-3000 cGy utilisé lors des traitements contre le cancer sont des doses qui causent des dommages aux ovaires (Couto-Silva *et al.*, 2001), avec des associations moins significatives à des concentrations de 100-1000 cGy (Chemaitilly *et al.*, 2006).

Les études épidémiologiques, portant sur les effets des traitements de chimiothérapie, peuvent être utilisées pour comparer la toxicité ovarienne des différents traitements afin de prédire les risques qui leurs sont associés. Les agents chimiothérapeutiques sont utilisés seuls ou en combinaison avec d'autres traitements tel que la radiation pour combattre le cancer. Il est donc difficile de déterminer la toxicité d'un agent en particulier. (Chemaitilly *et al.*, 2006). Certains agents chimiothérapeutiques posent un risque plus important que d'autres pour l'accélération de la perte des follicules primordiaux et un risque accru de ménopause précoce. Il s'agit d'agents alkylants et non alkylants tels que le mephalan, le busulfan, la moutarde azotée, le chlorambucil et la procarbazine (Chiarelli *et al.*, 1999; Thomson *et al.*, 2002; Chemaitilly *et al.*, 2006). Les agents alkylants dont le cyclophosphamide (CPA) causent des problèmes au niveau du système reproducteur dans les modèles animaux (Meirow *et al.*, 1999; Meirow *et al.*, 2001; Meirow et Nugent, 2001; Meirow et Schiff, 2005). D'autres agents chimiothérapeutiques ont un risque modéré, comme le cisplatine et l'adriamycine, ou un risque faible, methotrexate, 5-fluorouracil, vincristine, bleomycine et l'actinomycine-D (Bines *et al.*, 1996; Sonmezer et Oktay, 2006). Le cisplatine induit des aneuploïdies dans les ovocytes ovulés suite à une exposition avant l'ovulation (Meirow et Schiff, 2005). L'adriamycine et la bléomycine causent uniquement des dommages aux gamètes femelles et des mutations dominantes létales chez les follicules matures et pré ovulatoires de souris (Russell *et al.*, 1996; Meirow et Schiff, 2005).

La chimiothérapie pourrait augmenter les mutations et altérations génétiques dans les cellules germinales selon l'agent utilisé et le stade de maturation des gamètes (Aguilar-Mahecha *et al.*, 2005; Barton *et al.*, 2005; Meirow et Schiff, 2005). Quelques

facteurs déterminent la toxicité des agents aux gamètes après des traitements comme l'âge de la patiente et les traitements utilisés (Meirow et Nugent, 2001; Meirow et Schiff, 2005; Sonmezer et Oktay, 2006). La plupart des données proviennent des études chez les animaux, montrant les effets d'un seul agent, une réduction de la population folliculaire et parfois des effets épigénétiques. Les données épidémiologiques sont souvent compliquées par les combinaisons des agents utilisés (Meirow et Nugent, 2001; Meirow et Schiff, 2005). Chez l'humain, les études ne démontrent pas de manière unanime les mêmes résultats que chez les animaux (Meirow et Schiff, 2005). Certaines études démontrent qu'il y a un risque accru à la survenue de naissance prématuré et/ou de faibles poids à la naissance chez les femmes traitées avec des agents alkylants et/ou la radiation contre le cancer lorsqu'elles étaient enfants (Sanders *et al.*, 1996). D'autres études montrent peu ou aucun risques associés aux agents alkylants dans les mêmes conditions (Byrne *et al.*, 1998; Green *et al.*, 2003; Signorello *et al.*, 2006). Ce désaccord peut-être lié à la faible puissance des études épidémiologiques comparées aux études chez les animaux puisque le nombre de patientes et de naissances chez les humains est moindre comparés aux rongeurs testés (Byrne *et al.*, 1998). Les effets peuvent aussi être masqués car les grossesses étudiées dans les études épidémiologiques se déroulaient longtemps après les derniers traitements anti-cancéreux. Il est possible que les dommages/mutations aux gamètes causent des avortements précoces, s'il y a fécondation, ou qu'ils soient réparés pendant les années entre le traitement et la fertilisation (Ward et Chen, 2001; Meirow et Nugent, 2001).

### **3.2 Évaluation de la réserve ovarienne**

Le suivi de la fréquence des menstruations des patientes pendant et après les traitements anti-cancéreux est utilisé pour évaluer la réserve ovarienne (Petrek *et al.*, 2006). Plusieurs études suggèrent que la dose cumulée du cyclophosphamide détermine le risque de ménopause précoce (Anderson *et al.*, 1995; Meirow, 1999; Sklar, 2005; Sklar *et al.*, 2006; Petrek *et al.*, 2006). Toutefois, d'autres données suggèrent que des menstruations normales et la fertilité après les traitements ne sont pas des indicateurs précis de la réserve ovarienne (Meirow *et al.*, 2001; Oktay *et al.*, 2006). Même les

femmes qui continuent à avoir un cycle menstruel ont moins de follicules primordiaux comparées aux femmes du même âge qui n'ont pas subi de traitements (Sklar *et al.*, 2006). Il faut noter qu'un certain temps d'attente est nécessaire afin d'observer des effets sur la fécondité en se basant sur le nombre de follicules primordiaux. Les taux hormonaux (FSH, AMH et inhibine), les mesures du volume ovarien et le nombre de follicules antraux sont utilisés pour estimer le nombre de follicules ovariens qui reste dans l'ovaire qui est lié à la fertilité et l'induction de la ménopause (Visser *et al.*, 2006; Kevenaar *et al.*, 2006; Broekmans *et al.*, 2006). Mais ces mesures de fertilité ne peuvent pas déterminer le nombre exact de follicules primordiaux ou prédire le succès des grossesses. La concordance entre ces mesures et la santé/qualité des ovocytes ou du succès des grossesses n'est pas connu (Ebner *et al.*, 2006; Broekmans *et al.*, 2006; Smeenk *et al.*, 2007; Lie Fong *et al.*, 2008).

### **3.3 L'importance de la santé des ovocytes**

La qualité ou la santé des ovocytes chez les follicules primordiaux est importante pour la santé des enfants. Puisque la contribution génomique maternelle d'un embryon est fourni par l'ovocyte, leur intégrité détermine le succès du développement (Hirshfield, 1997; Encha-Razavi et Escudier, 2003). La qualité d'un gamète peut avoir un effet sur le succès du développement à différents moments; la fécondation, l'implantation, ou le développement embryonnaire. Malheureusement, il n'existe pas de mesures (ou tests) pour évaluer la santé/qualité des follicules chez les femmes après qu'elles aient subi des expositions néfastes. De plus, un grand nombre de follicules en croissance sont perdus via l'atrésie ce qui peut masquer des effets toxiques (Hirshfield, 1997). Des analyses pathologiques/histologiques peuvent être effectuées afin d'observer la morphologie des follicules et leur nombre dans un échantillon d'ovaire, mais cela ne donne pas d'informations sur l'intégrité moléculaire de l'ADN ou d'autres effets (Hirshfield, 1997; Lambalk *et al.*, 2004). L'ADN des gamètes est sensible aux expositions toxiques qui touchent l'ADN tels que la radiation ionisante (IR), les agents chimiothérapeutiques (Arnon *et al.*, 2001) et d'autres substances génotoxiques comme la fumée de cigarette (Kinney *et al.*, 2007). Le risque

accrue pour des complications tels que des avortements spontanés (de la Rochebrochard et Thonneau, 2002) et la trisomie 21 (Jones, 2008) chez les enfants de femmes plus âgées est un exemple de l'importance de la qualité des cellules germinales puisqu'il est suggéré que les follicules des femmes plus âgées ont plus de dommages à l'ADN ou autres problèmes génétiques (Vijg, 2007).

### **3.4 Augmentation des survivants des cancers infantiles**

La survie des jeunes patients est imputable aux traitements agressifs des tumeurs et cancers. Ces traitements incluent souvent la radiation, la chimiothérapie ou la combinaison des deux traitements (Blatt, 1999; Thomson *et al.*, 2002). Avec les améliorations des traitements anti-cancéreux chez les enfants, on estime qu'en 2010 chaque 250<sup>e</sup> adulte serait un survivant d'un cancer infantile (Blatt, 1999; Maltaris *et al.*, 2007). D'ailleurs, le succès ces dernières années mènent à une génération de jeunes adultes qui ont survécu mais qui pourraient être affectés au niveau du système reproducteur et surtout les gamètes (Byrne *et al.*, 1998; Green *et al.*, 2003; Nagarajan et Robison, 2005; Signorello *et al.*, 2006). Les cancers infantiles sont beaucoup plus rares que les cancers chez les adultes. Étant donné, il est difficile de tirer des conclusions sur les effets au système reproducteur de ces jeunes patients et les effets possibles chez leur progéniture (Byrne *et al.*, 1998; Blatt, 1999). Chaque année, plus de 20 000 enfants et adolescents américains sont diagnostiqués pour un cancer dont le plus courant est la leucémie aigüe des lymphocytes (Blatt, 1999; Pallapies, 2006). Le pourcentage de survie 5 ans après un cancer est de plus de 70% chez les enfants et adolescents, ~87% chez ceux traités pour la leucémie lymphoblastique aïgue et plus de 90% chez ceux avec le lymphome de Hodgkin (Linet *et al.*, 1999; Pulte *et al.*, 2008). Il est donc important de déterminer si les dommages aux gamètes induits durant les traitements chez les patients peuvent avoir des effets néfastes sur leurs progénitures.

## 4 Cyclophosphamide

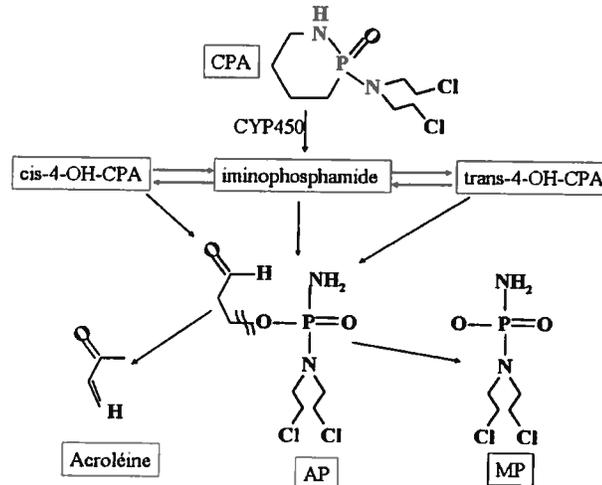
### 4.1 Utilisation du cyclophosphamide (CPA)

Depuis sa synthèse dans les années 1950, le CPA est un des agents chimiothérapeutiques et immunosuppresseurs les plus utilisés au monde (Colvin, 1999). Le CPA est utilisé pour le traitement des cancers: du sein, du poumon, des lymphomes, de la leucémie, du rétinoblastome et du neuroblastome (Anderson *et al.*, 1995; Colvin, 1999; Hurley, 2002). Il est également utilisé comme immunosuppresseur pour des maladies auto-immunitaires tels que l'arthrite, la sclérose en plaque, le lupus érythémateux disséminé (LED) ainsi que pour combattre le rejet d'organes lors d'une transplantation (Colvin, 1999; Allison, 2000; Krishnan *et al.*, 2008). La dose de CPA dépend du type de maladie. Une prise orale quotidienne requière des concentrations plus faibles, 100-200 mg/jour pour quelques maladies incluant l'immunosuppression. Les doses plus fortes, 600-1000 mg/m<sup>2</sup>, sont elles administrées via des injections intraveineuses intercalées de quelques semaines de relâche pour la majorité des cancers (Moore, 1991; Anderson *et al.*, 1995).

### 4.2 Métabolisme du cyclophosphamide

Le CPA est un agent bis-alkylant de la classe des moutardes nitrogénées qui ont toutes un cycle phosphoramidate en commun (Figure 5), et ce sont leurs deux groupements réactifs qui les différencient et apportent leur différentes toxicités (Colvin, 1999; Ludeman, 1999). Le CPA n'a pas de pouvoir thérapeutique lui-même et doit être métabolisé pour produire une molécule active. Le CPA est activé au niveau du foie et d'autres organes par les cytochromes P450 (CYP2A6, 2B6, 2C19, 2C9, 3A4, et 3A5) en 4-hydroxycyclophosphamide (4-HO-CPA, Figure 5) (Chang et Waxman, 1993; Ren *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1997; Colvin, 1999; Plowchalk et Teeguarden, 2002). Une fois formé, le 4-HO-CPA et deux autres métabolites intermédiaires, aldophosphamide (AP) et iminophosphamide, participent dans des réactions d'inter conversion (Ludeman, 1999). La moutarde phosphoramidée (MP) et l'acroléine sont les deux

produits qui proviennent de la dégradation spontanée de l'intermédiaire AP (Figure 5). Alors, le CPA et les autres moutardes nitrogénées doivent être transformés afin d'avoir leur pouvoir thérapeutique (Colvin, 1999).



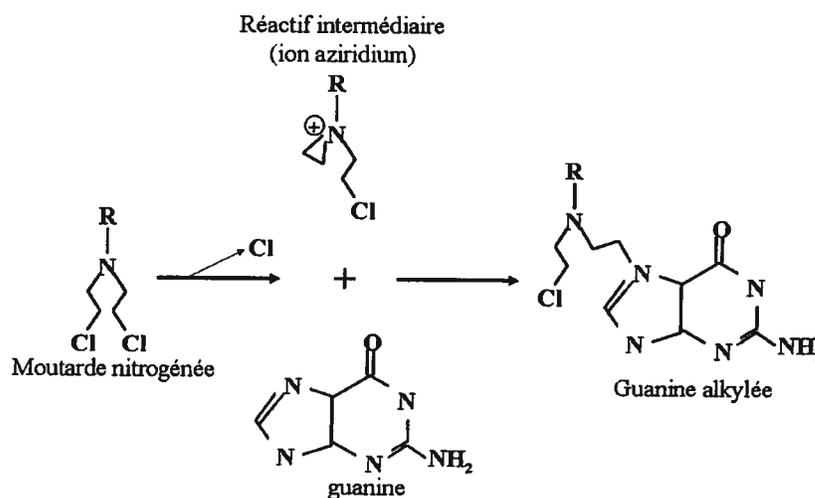
**Figure 5** : Principaux événements impliqués dans le métabolisme du cyclophosphamide (CPA). Les métabolites intermédiaires du CPA produisent l'aldophosphamide (AP). La dégradation de l'AP produit deux métabolites, la moutarde phosphoramidée (MP) et l'acroléine. [Adapté sans permission de Ludeman, (1999) et Desmeules, (2006)].

Les métabolites du CPA peuvent être détoxifiés par deux voies. La voie la plus importante est la détoxification par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) qui transforme l'AP en carboxyphosphamide (CPM), qui ne forme pas la MP. La deuxième voie implique deux réactions avec l'alcool déshydrogénase (ADH); (1) transformation de l'AP en alcophosphamide et (2) transformation de 4-HO-CPA en 4-ketocyclophosphamide (4-KTCP) (Colvin, 1999; Zhang *et al.*, 2005). L'alcophosphamide et le 4-HO-CPA ne peuvent pas former la MP. Les enzymes de détoxification sont abondants, et la demi vie du CPA, quel que soit la dose utilisée, est de 5-8 h dans le plasma (Moore, 1991; Anderson *et al.*, 1995).

### 4.3 Mécanismes de toxicité des moutardes nitrogénées

Les moutardes nitrogénées sont des agents bis-alkylants grâce à leurs deux groupements qui interagissent avec les protéines, les membranes cellulaires ou l'ARN

et forment des ponts inter et intra brins avec l'ADN, surtout à la position N7 des guanines, qui causent l'arrêt de la réplication due à la distorsion de la structure de l'ADN (Figure 6) (Colvin, 1999). Par conséquent, cela permet la destruction des cellules cancéreuses qui se multiplient plus vite que les cellules normales (Colvin, 1999; Ludeman, 1999; Hurley, 2002). Il est aussi suggéré que ces mêmes mécanismes soient responsables des effets sur le système reproducteur et les gamètes femelles (Plowchalk et Mattison, 1991; Desmeules et Devine, 2006).



**Figure 6** : Alkylation d'une guanine par une moutarde nitrogénée. Un des deux groupements réactifs forme un anneau aziridium qui interagit avec un nucléotide (guanine). L'alkylation d'une deuxième guanine formerait des ponts inter- ou intra-brins d'ADN qui induit l'inhibition de réplication et l'activation de l'apoptose. [Adapté sans permission de Moore, (1991) et Desmeules, (2006)].

#### 4.4 La toxicité du cyclophosphamide au niveau du système reproducteur

##### 4.4.1 Effets du CPA chez les gamètes mâles

Des effets du CPA chez les mâles, qui ont été exposés lors des traitements anticancéreux, sont nombreux et démontrent une incidence accrue pour l'oligospermie ( $\leq 1$ -20 million de spermatozoïdes dans 1 ml de sperme) ou l'azoospermie (absence totale de spermatozoïdes dans le sperme) qui résultent en une infertilité (Kenney *et al.*, 2001; Grimes et Lopez, 2007). Plusieurs études chez les animaux ont étudié les effets

du CPA sur le système reproducteur mâles et leur progéniture (Sotomayor et Cumming, 1975; Sotomayor *et al.*, 1978; Auroux *et al.*, 1990). Des dommages à l'ADN de cellules germinales, des altérations de le chromatine et des altérations des protéines du sperme sont quelques effets ou mécanismes suggérés pouvant expliquer l'infertilité et les problèmes d'implantation et développement embryonnaire de la progéniture des rongeurs et humains exposés au CPA (Harrouk *et al.*, 2000; Codrington *et al.*, 2004; Hales *et al.*, 2005; Codrington *et al.*, 2007a; Codrington *et al.*, 2007b). L'exposition aiguë au CPA chez les rats mâles augmente la transcription des gènes de réponses aux stress, incluant ceux pour la réparation de l'ADN et l'apoptose, dans les spermatides arrondies (Aguilar-Mahecha *et al.*, 2001). Par contre, une exposition chronique au CPA réduit l'expression de ces mêmes gènes majoritairement dans les spermatocytes au stade pachytène et spermatides arrondies (Aguilar-Mahecha *et al.*, 2002). Ces effets du CPA semblent être spécifique au stade de maturation des gamètes mâles et résultent en une re-programmation épigénétique aberrante dans les zygotes (Hales *et al.*, 2005; Barton *et al.*, 2005). L'exposition chronique paternelle au CPA par gavage (6mg/kg) 6 jours/semaine pendant 4-5 semaines avant les accouplements chez les rats résulte en des effets épigénétiques dans les zygotes de la génération F1, incluant l'hyperméthylation du pronucléus femelle, l'hypométhylation du pronucléus mâle et des altérations des histones (phosphorylation et acétylation). Même le transfert des dommages à l'ADN des gamètes paternels à leur progéniture a été démontré (Hales *et al.*, 2005; Barton *et al.*, 2005; Barton *et al.*, 2007). L'accès relativement facile aux cellules germinales des mâles rend les études des effets du CPA sur eux plus facile que chez les femelles, mais les mécanismes d'action du CPA, les effets épigénétiques et les effets sur la progéniture sont encore à étudier.

#### **4.4.2 Effets du CPA chez les gamètes femelles**

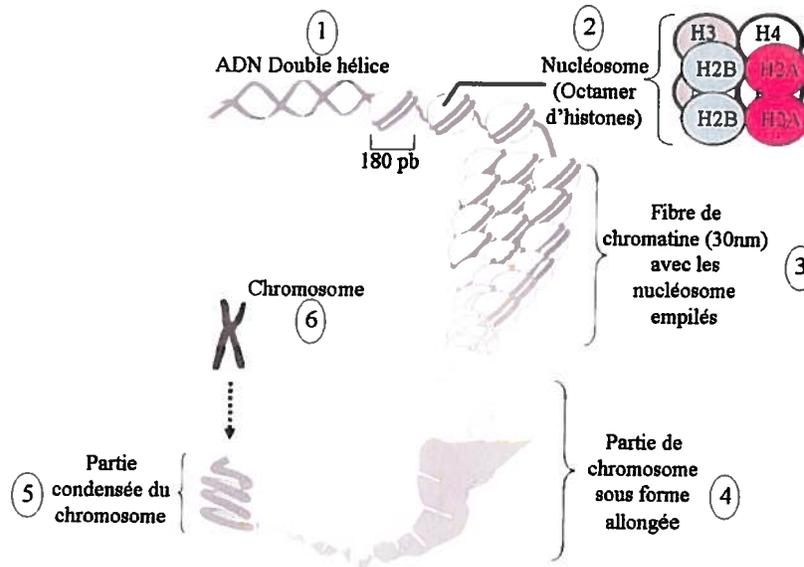
La toxicité ovarienne du CPA se manifeste par la destruction des follicules ovariens, l'atrophie ovarienne, et une baisse du taux d'estrogène liée à la destruction des follicules antraux (Moore, 1991; Plowchalk et Mattison, 1992; Anderson *et al.*, 1995). La MP est le métabolite actif et ovotoxique du CPA. Cela a été démontré *in vivo*

(Plowchalk et Mattison, 1991) et également *in vitro* chez les souris (Desmeules et Devine, 2006). La toxicité du CPA et de la MP pour certains stades folliculaires a été démontrée dans des études chez les animaux et *in vitro*. Des souris C57BL/6N adultes injectées une seule fois avec du CPA présentaient une perte de follicules primordiaux et antraux. Les ovocytes des primordiaux et les cellules de la granulosa des antraux étaient les plus affectées (Plowchalk et Mattison, 1992). 24 h après l'exposition, le nombre de follicules primordiaux sains était réduit à 73%, 42% et 38% respectivement pour 75, 200 et 500 mg/kg comparé au groupe témoin (saline). La dose effective (ED<sub>50</sub>) qui réduit le nombre de follicules primordiaux de 50%, était respectivement de 134, 122 et 101 mg/kg CPA pour 24h, 3 et 7 jours après exposition. La sensibilité des ovocytes des follicules primordiaux était surprenante puisque les cellules de la granulosa (à l'exception de ceux des follicules primordiaux) ont une forte activité mitotique qui devrait les rendre plus sensibles au CPA. Meirow, *et al.*, (1999) ont montré qu'une seule exposition i.p. (75mg/kg CPA) détruisait ~50% des follicules primordiaux chez des souris Balb/c, 7 jours après l'exposition, et affectait la reproduction, le nombre de portée et le cycle estrous à long terme (>4 semaines). Meirow *et al.*, (2001) ont démontré qu'il y avait 10 fois plus de malformations chez les nouveaux-nés comparé au groupe contrôle (saline) chez des souris Balb/c après une dose de 75 mg/kg CPA avant l'accouplement. De plus, cette incidence accrue de malformations chez les nouveaux-nés (33%) persistait avec des ovules provenant de follicules primordiaux (Meirow *et al.*, 2001). Chez les rattes, le CPA semble affecter les cellules de la granulosa des follicules matures qui sont plus prolifératives (Ataya *et al.*, 1985; Ataya *et al.*, 1989; Jarrell *et al.*, 1991). Une dose aiguë de CPA de ≥150 mg/kg ou 5 mg/kg/j pour 21 jours, a réduit significativement le nombre de follicules antraux sains et a diminué le taux d'estradiol et de progestérone chez les rattes Sprague-Dawley adultes (Ataya *et al.*, 1985; Jarrell *et al.*, 1991). De plus, il n'y a pas eu d'effets significatifs sur le nombre de follicules primordiaux ni sur la fécondité des rattes exposées (Jarrell *et al.*, 1991). Alors l'exposition au CPA a des effets différents sur différentes espèces.

## 5 Dommages à l'ADN et voies de réparation

### 5.1 Structure de la chromatine

La chromatine présente différents stades de condensation pour être capable d'être contenu dans le compartiment nucléaire. Elle peut être présente en deux formes: soit l'euchromatine qui est décondensée permettant l'expression des gènes, soit l'hétérochromatine qui est très condensée pour inhiber l'expression des gènes (Vijg, 2007). La forme la moins condensée est (1) la double hélice d'ADN, suivi de (2) la forme de chromatine « collier de perles » qui consiste en une série de nucléosomes (Figure 7). Les nucléosomes sont les unités de bases des chromosomes et sont composés de ~200 paires de bases (pb) enroulées autour d'un octamère d'histones. Cet octamère est constitué de deux copies de chaque histone; H2A, H2B, H3 et H4 (Figure 7) (Ward et Chen, 2001; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004). Chez les mammifères il existe des variants de l'histone H2A, comme H2AX et H2AZ, mais la fonction de chaque variant n'est pas complètement connu. L'H2AX est important pour initier la réparation des dommages à l'ADN (décrit dans la section 5.4) (Redon *et al.*, 2002; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004). L'ADN est lié aux histones grâce aux forces électrostatiques entre les groupements phosphores de l'ADN et les charges positives des acides aminés des protéines d'histones. Le prochain stade de condensation de la chromatine implique (3) l'empilage de plusieurs nucléosomes pour former une fibre d'un diamètre de ~30 nm. Ces fibres sont enroulées pour produire un chromosome qui peut avoir différents niveaux de condensation (4-6) (Vijg, 2007). Certaines modifications d'histones telles que la méthylation, l'acétylation ou la phosphorylation peuvent altérer les liens entre les histones et l'ADN et conduire à des modifications épigénétiques qui favorisent la formation de l'hétérochromatine versus euchromatine (Ward et Chen, 2001).



**Figure 7 :** La structure de la chromatine et les différents niveaux de condensation. La double hélice d'ADN (1) est la forme la moins condensée. Un nucléosome (2) est constitué d'un octamère d'histones sur lequel s'enroule 180pb d'ADN. Ces nucléosomes sont compactés en fibre (30 nm, 3). Un chromosome peut avoir différents niveaux de condensation (4-6) selon le cycle cellulaire. [Adapté sans permission de Ward et Chen, (2001) et Vijg (2007)].

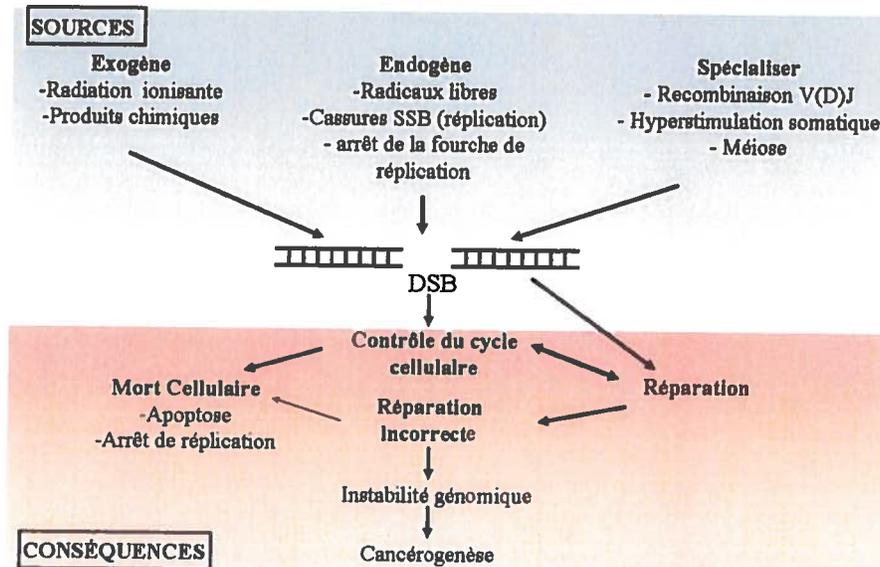
## 5.2 Les réponses aux dommages à l'ADN

Il existe des mécanismes de réparation de l'ADN dans les cellules. Ils sont nécessaires car les fonctions physiologiques normales induisent des réactions d'hydrolyse et d'oxydation qui causent quotidiennement des milliers de dommages à l'ADN (Ward et Chen, 2001). Il y a d'autres causes de dommage à l'ADN tels que les rayons ultra violet (UV) du soleil, la radiation ionisante (RI) et d'autres agents génotoxiques (Ward et Chen, 2001; Hurley, 2002). Les dommages à l'ADN ont quatre effets généraux; (1) interférence avec la transcription de l'ADN, (2) déclenchement de l'initiation de la signalisation cellulaires pour induire soit l'apoptose soit l'arrêt de la mitose, (3) déclenchement de l'initiation de la signalisation pour la réparation des dommages, et (4) changements permanents de l'ADN tel que des mutations (Ward et Chen, 2001). L'entretien du génome nécessite (1) la signalisation des dommages à l'ADN et (2) la réparation des lésions (Ward et Chen, 2001). Les voies de réparations induites (décrites dans la section 5.3) dépendent du type de dommage. Les dommages

incluent les adduits, les ponts intra et inter brins, cassures à simples (SSBs) et à doubles brins (DSBs) (Ward et Chen, 2001; Helleday *et al.*, 2008). Bien que les cassures à simple brin soient néfastes, l'utilisation du brin intact pour la réparation reste possible. Cela n'est pas le cas pour les DSBs qui sont des lésions plus sévères et complexes à réparer.

### **5.2.1 Les cassures à doubles brins : les pires dommages à l'ADN**

Les DSBs sont les dommages à l'ADN les plus toxiques pour les cellules; une seule cassure causerait la perte de plus de 100 millions pb d'une partie d'un chromosome et induirait la mort d'une cellule (Ward et Chen, 2001; Helleday *et al.*, 2007). Les DSBs sont très toxiques pour une cellule car ils peuvent être présents n'importe où dans l'ADN, et peuvent résulter en la perte d'une portion d'un chromosome si deux DSBs sont présents sur un chromosome. Le type de dommage induit par les DSBs affecte les deux brins d'ADN à des sites opposés et suffisamment proches (10-20 bp) pour éviter la réparation par les voies de réparation par excision. Ces voies utilisent un brin d'ADN intacte pour copier les séries de pb nécessaires au remplacement de celles manquantes ou incorrectes. Les DSBs sont induites par plusieurs expositions et mécanismes, tels que la RI, les espèces réactives oxygénées (ROS) et lors d'un arrêt de la fourche de réplication (Figure 8) (van Gent *et al.*, 2001). Même si les DSBs sont très toxiques pour une cellule, il existe certains cas où les DSBs font parties d'un processus physiologique important incluant l'échange de chromatides soeurs durant la méiose (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004; Neale et Keeney, 2006) et la recombinaison V(D)J dans les lymphocytes pour produire une diversité d'anticorps (van Gent *et al.*, 2001; O'Driscoll et Jeggo, 2006; Helleday *et al.*, 2007). Une réparation parfaite est essentielle car s'il y a des erreurs ou une persistance des DSBs, il pourrait avoir des changements chromosomiques tels que des délétions, insertions, translocations ou une accumulation spontanée des dommages (Figure 8) (Ward et Chen, 2001; van Gent *et al.*, 2001; O'Driscoll et Jeggo, 2006; Helleday *et al.*, 2007).



**Figure 8 :** Les causes et conséquences des cassures à doubles brins d'ADN. [Adapté sans permission de van Gent *et al.*, (2001)].

### 5.3 Les voies de réparations

Les voies de réparation sont très complexes et leur caractérisation chez les mammifères n'est pas complète. Les informations ci-dessous ne sont pas exhaustifs mais plutôt un survol des aspects de base les plus importants. Les trois voies majeures de réparation des dommages à l'ADN sont: la réparation par excision, la recombinaison homologue (HR) et *non-homologous end joining* (NHEJ). L'induction d'une voie plutôt qu'une autre dépend du type de dommage (Ward et Chen, 2001; Shrivastav *et al.*, 2008).

La réparation par excision inclut les voies de réparations tels que l'excision de base (BER), l'excision de nucléotide (NER) et la réparation d'un mésappariement (MMR) (Ward et Chen, 2001; Helleday *et al.*, 2008). Toutes ces voies enlèvent les bases et les nucléotides qui sont incorrects ou pas correctement alignés et utilisent le brin intact de la double hélice de l'ADN comme modèle pour la re-synthétisation et la réparation. La voie BER est utilisée lorsqu'il y a une erreur dans une petite série de bases, des cassures à simples brins (SSB), ou des sites abasiques. La voie NER est un mécanisme général de réparation qui enlève les bases d'ADN endommagés et re-

synthétise la bonne série. La voie MMR est généralement utilisée pour l'excision des nucléotides qui ne sont pas correctement alignés ou des tours générés par des insertions ou délétions de certains nucléotides dans un brin (Ward et Chen, 2001; Menezo *et al.*, 2007; Helleday *et al.*, 2008).

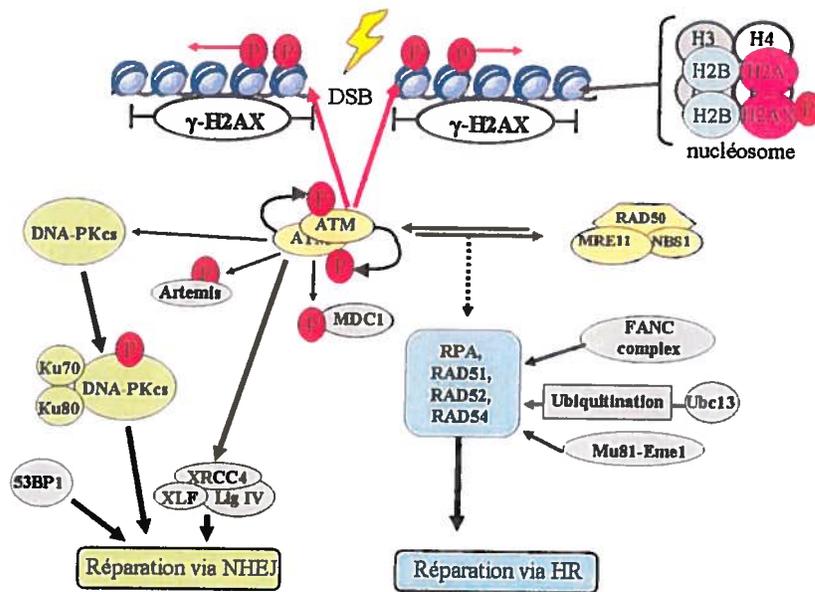
Chaque voie de réparation, HR et NHEJ, a des facteurs qui lui sont propres. La voie NHEJ répare les cassures d'ADN en rejoignant les bouts d'ADN aux sites de cassures avec la DNA-PK et ses protéines accessoires (Figure 9, colorés en vert) (van Gent *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2008; Shrivastav *et al.*, 2008). DNA-PK, composé d'une grande sous unité catalytique (DNA-PKcs) et le dimère Ku70-Ku80 qui contrôle l'activité du complexe, est important dans la voie de NHEJ. Ku70-Ku80 a une grande affinité pour les fragments d'ADN, particulièrement ceux des DSBs (Figure 9). DNA-PK est capable de détecter des dommages lui-même en reconnaissant les distorsions dans la conformation de l'ADN (Ward et Chen, 2001). Artémis est une nucléase importante pour les réparations des DSBs induites par la RI et la recombinaison V(D)J. Le rôle de 53BP1 dans NHEJ est de détecter les changements dans la structure de la chromatine. XRCC4, XLF et Lig IV forment un complexe qui remplit l'espace créé par les dommages et marque la fin de la réparation (Figure 9) (van Attikum et Gasser, 2005; Kobayashi *et al.*, 2008; Shrivastav *et al.*, 2008). Le rôle de ces facteurs (Tableau 1 et Figure 9) et d'autres (non présentés) restent à élucider.

La voie de réparation HR est considérée comme la plus efficace et sans erreurs parce qu'elle emploie une copie d'ADN homologue comme une chromatide sœur pour matrice de réparation. Les fragments d'ADN sont liés par plusieurs facteurs tels que le RPA (*replication protein A*), RADs (RAD51, RAD52, RAD54), Ubc13 et Mus81-Eme1, et ces facteurs nucléoprotéiques se lient à la région du chromosome endommagé (Tableau 1 et Figure 9). Ubc13 modifie la structure de la chromatine pour rendre l'accès au site de dommages plus facile pour des facteurs comme RAD51 et RPA qui sont impliqués dans la réparation (van Attikum et Gasser, 2005; Kobayashi *et al.*, 2008; Shrivastav *et al.*, 2008). Cette voie est bien connue chez les levures mais pas autant

chez les mammifères où plusieurs autres facteurs et même d'autres voies de réparations pourraient être impliquées.

#### 5.4 Réparations des DSBs et phosphorylation de l'histone H2AX

Les DSBs sont principalement réparées par HR chez les levures, et par NHEJ chez les mammifères, même si les deux voies de réparation sont présentes (Valerie et Povirk, 2003; O'Driscoll et Jeggo, 2006; Helleday *et al.*, 2008; Kobayashi *et al.*, 2008; Shrivastav *et al.*, 2008). Il y a encore des débats en ce qui concerne la voie la plus importante chez les humains pour réparer les DSBs. Peu importe la voie induite, la réparation des DSBs est extrêmement complexe et inclut une centaine de facteurs (Figure 9) (Shrivastav *et al.*, 2008; Srivastava *et al.*, 2008; Kobayashi *et al.*, 2008).



**Figure 9** : Facteurs impliqués dans la réparation des DSBs via HR ou NHEJ. Les facteurs ubiquistes impliqués dans les deux voies sont colorés en jaune et la flèche pointillée signifie que l'ATM a des effets spécifiques aux facteurs de chaque voie. Les protéines impliqués dans la réparation via NHEJ ou HR sont colorés en vert et bleu respectivement. Les facteurs colorés en gris sont soit des nouveaux facteurs qui ne sont pas bien caractérisés soit impliqués dans plusieurs voies de réparations. [Adapté sans permission de (van Attikum et Gasser, 2005) et (Kobayashi *et al.*, 2008)].

La voie de réparation HR emploie une copie d'ADN homologue comme une chromatide sœur pour être la matrice de réparation comparé à la voie NHEJ qui rejoint les bouts d'ADN aux sites de cassures, mais ne peut pas distinguer entre les bouts d'ADN brisés lorsqu'il y a plus qu'une cassure pour bien réparer les dommages. Les premières étapes dans les voies de réparations HR et NHEJ sont identiques. Lorsqu'il y a une DSB dans une cellule de mammifères, le complexe Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) la détecte (Tableau 1, Figure 9) (Furuta *et al.*, 2003). Une fois détecté, le MRN recrute des molécules d'*Ataxia telangiectasia-mutated (ATM)*, un homo dimère inactif qui fait partie de la famille des *phosphoinositide 3-kinase-like kinases (PIKK)*, au site de DSB et est responsable de la première monomérisation d'ATM pour produire un monomère actif (Khanna *et al.*, 2001; Bakkenist et Kastan, 2003). La forme active d'ATM peut aussi activer d'autres molécules d'ATM en les phosphorylant (Figure 9) (Bakkenist et Kastan, 2003). Lors des DSBs chez les cellules de mammifères, la forme phosphorylée d'ATM (monomère) phosphoryle d'autres protéines qui déclenchent l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou la réparation des dommages à l'ADN (Vijg, 2007; Kobayashi *et al.*, 2008; Shrivastav *et al.*, 2008). *ATM-and Rad3-related (ATR)* est un membre de la même famille PIKK qui est très similaire à ATM dont les fonctions ne sont pas bien connues chez les mammifères. ATM phosphoryle l'H2AX lors des expositions aux faibles doses de RI tandis que l'ATR phosphoryle l'H2AX lorsqu'il y a des dommages induits pendant la réplication (Ward et Chen, 2001; Burma *et al.*, 2001; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2002; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004). Ces activités commencent des voies de réparation HR et NHEJ et leurs fonctions sont souvent chevauchantes (Figure 9) (Ward et Chen, 2001; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004; Shrivastav *et al.*, 2008; Kobayashi *et al.*, 2008).

**Tableau 1** : Principaux facteurs impliqués dans la signalisation et réparation des cassures à double brins d'ADN chez les mammifères

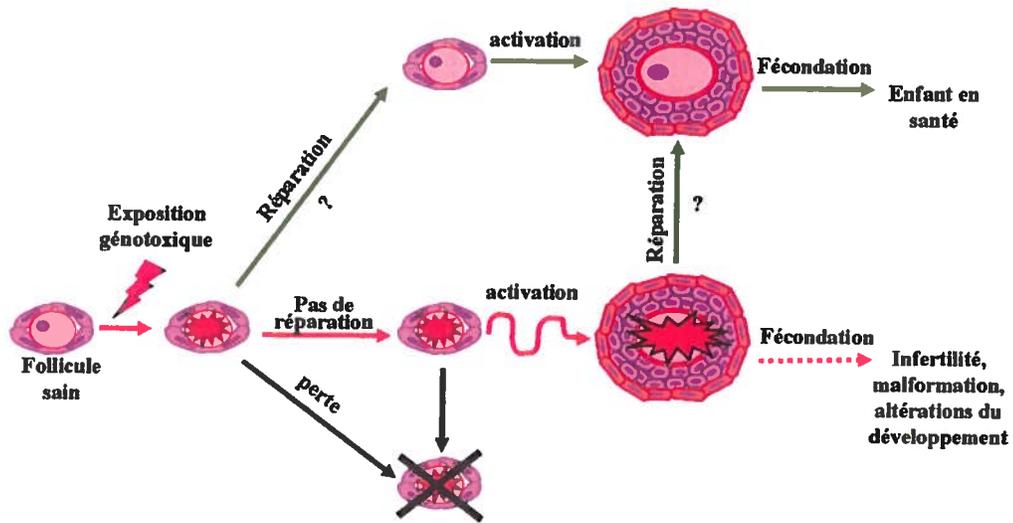
Fonctions	Facteurs
<i>Ubiquistes (HR et NHEJ)</i>	
Signalisation	Mre11/Rad50/Nsb1, ATM
Signalisation et réparation	$\gamma$ -H2AX
<i>Facteurs spécifiques à la voie NHEJ</i>	
Signalisation et réparation	DNA-PK (DNA-PKcs, Ku-70-Ku80), 53BP1
Réparation	XRCC4, Ligase 4 (Lig IV), Artémis
<i>Facteurs spécifiques à la voie HR</i>	
Réparation	Rad51, Rad54, XRCC3, BRCA1, BRCA2, RPA

Une des modifications post-transcriptionnelles des protéines de chromatine lors des réponses aux dommages à l'ADN est la phosphorylation de l'histone H2A, type H2AX chez les eucaryotes sur la serine 139 (Redon *et al.*, 2002). L'H2AX peut être phosphorylé par plusieurs membres de la famille PIKK (ATM, ATR ou DNA-PK) dont les activités se chevauchent (Tableau 1 et Figure 9) (Ward et Chen, 2001; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2008). La phosphorylation de l'H2AX est importante pour la réparation des DSBs et des SSBs qui deviennent des DSBs lors de la réplication et réparation (Kobayashi *et al.*, 2008). La phosphorylation de l'H2AX se fait sur des méga bases ( $10^6$ ) d'ADN autour des DSBs, formant des « foyers » ( $\gamma$ H2AX, Figure 9) (Rogakou *et al.*, 1998; Rogakou *et al.*, 1999). Les rôles précis de ces foyers ne sont pas encore complètement connus mais ces foyers ont été impliqués dans le recrutement de plusieurs facteurs de réparations aux sites des DSBs (Paull *et al.*, 2000; van Attikum et Gasser, 2005; Kobayashi *et al.*, 2008; Shrivastav *et al.*, 2008; Srivastava *et al.*, 2008). Celeste *et al.*, (2003) ont suggéré que  $\gamma$ H2AX n'est pas le facteur principal pour le recrutement mais plutôt pour concentrer et conserver les facteurs aux sites des DSBs. Nous pouvons utiliser les modifications post-transcriptionnelles de la chromatine (ex. foyers de  $\gamma$ H2AX) pour étudier et localiser les DSBs puisqu'il a été suggéré que les foyers disparaîtraient seulement lorsque la réparation serait complète (Burma *et al.*, 2001; Ward et Chen, 2001; Sedelnikova *et al.*, 2002). L'H2AX n'est pas essentiel pour la survie d'un organisme mais son importance pour l'entretien du génome est soulevée

par une augmentation importante de la susceptibilité aux tumeurs, à l'instabilité génomique et à la sensibilité à la radiation chez les souris qui n'ont pas l'H2AX (Celeste *et al.*, 2002; Celeste *et al.*, 2003).

### 5.5 Dommages à l'ADN des gamètes

Certaines expositions qui causent des dommages à l'ADN des gamètes ont déjà été discutées dans les sections 2.1, 3.1 et 4.4. Toutefois, les voies de réparation chez les gamètes sont très peu étudiées et par conséquent peu d'informations est disponible pour savoir quelles voies sont présentes et lesquelles sont actives, particulièrement chez l'ovocyte (Suh *et al.*, 2006; Menezo, 2006; Menezo *et al.*, 2007). Il existe des preuves (résumé dans Ashwood-Smith et Edwards, 1996) indirectes de la présence de voies de réparations actives, en se basant sur des tests *in vitro* effectués sur des extraits d'ovocytes de rongeurs et humains. L'étude de Menezo *et al.*, (2007) a démontré que les ovocytes ovulés GV humains contiennent la majorité des gènes de réparations d'ADN (plusieurs voies) nécessaires pour réparer les dommages induits surtout par les ROS. Toutefois, il reste à déterminer si ces gènes et leurs facteurs sont actifs dans les ovocytes et s'ils peuvent réparer des dommages plus complexes (ex. les DSBs). Une étude *in vitro* effectuée sur des ovaires de souris exposées à la MP, n'a permis de montrer ni marquage de TUNEL ni marquage de caspase 3 active dans les ovocytes de petits follicules ovariens, suggérant que ces ovocytes ne sont pas éliminés par apoptose (Desmeules et Devine, 2006). D'autres études avec des souris knock-out, majoritairement chez les mâles, ont suggéré que certains facteurs de la réparation de l'ADN (divers voies) sont nécessaires lors de la gamétogenèse et la fertilité (Hsia *et al.*, 2003). Ces données sont insuffisantes pour conclure qu'il existe des mécanismes de réparation d'ADN actifs dans les ovocytes.



**Figure 10 :** Les conséquences possibles d'une exposition des gamètes induisant des dommages à l'ADN. Les flèches vertes indiquent les résultats possibles pour un follicule une fois réparé. Les flèches rouges indiquent les conséquences possibles pour des follicules endommagés.

Étant donné qu'il y a un manque d'informations, nous proposons des conséquences possibles lors de l'endommagement de l'ADN chez un ovocyte d'un follicule primordial. Premièrement si les dommages sont trop sévères, le follicule mourra comme Desmeules et Devine (2006) a démontré (Figure 10, flèches noires). Deuxièmement si des mécanismes de réparations sont actifs et efficaces dans les ovocytes, les dommages peuvent être complètement réparés et l'ovocyte sera normale et continuera son développement sans effets secondaires (Figure 10, flèches vertes). Le plus inquiétant, est le sort des follicules primordiaux dont les dommages à l'ADN ne sont pas réparés. Ces derniers peuvent mourir après l'activation ou survivre à l'activation et poursuivre leur développement (Figure 10, flèches rouges). Les faibles expositions peuvent être dangereuses car les dommages qu'elles induisent ne sont pas assez sévères pour induire ni la mort des follicules ni la réparation des dommages.

## Objectifs

La MP induit la mort des cellules cancéreuses en causant des dommages à l'ADN (incluant les DSBs). Elle détruit aussi des petits follicules ovariens et les cellules de la granulosa des grands follicules et cause des changements morphologiques dans les ovocytes des petits follicules. Cela nous laisse croire que le même mécanisme cause la perte des follicules primordiaux et primaires *in vivo* et *in vitro*, spécifiquement par la formation des DSBs chez l'ovocyte. On dispose de peu d'informations sur les réponses aux dommages à l'ADN au sein des gamètes et particulièrement sur les gamètes femelles. Il y en a encore moins d'informations sur l'existence ou le fonctionnement des mécanismes de réparations de l'ADN. Dans des expériences préliminaires avec des ovaires de souris exposés à la MP *in vitro*, nous avons remarqué la phosphorylation de H2AX chez des ovocytes ce qui suggèrent la formation de DSBs. Ces résultats nous amènent à formuler l'hypothèse suivante: **les ovocytes des follicules ovariens peuvent détecter et réparer les dommages à l'ADN**. Afin de déterminer si notre hypothèse est vraie, nous proposons de caractériser la phosphorylation de l'H2AX après des expositions *in vitro*.

Le degré de perte de follicules ovariens est lié à la concentration ou à la dose de MP/CPA utilisée. Nous avons déjà montré que 3 et 10  $\mu\text{M}$  MP sont des concentrations qui causent la perte significative de follicules primordiaux dans les ovaires de souris CD-1 exposées *in vitro* (Desmeules et Devine, 2006). Nous nous sommes alors demandé si la formation des DSBs était évidente avant les changements morphologiques des follicules et des concentrations qui causent la perte significative des follicules primordiaux. Nous avons utilisé la phosphorylation de l'histone H2AX comme marqueur sensibles et fiables pour la détection et réparation des DSBs. Trois à 48 h après une seule exposition à la MP (3 ou 10  $\mu\text{M}$ ), le nombre de foyers  $\gamma\text{H2AX}$  dans les follicules a été plus nombreux avec la plus forte concentration de MP. Le nombre maximal des foyers était présent 18 à 24 h après l'exposition et a diminué graduellement jusqu'à 48 h. La quantité de foyers  $\gamma\text{H2AX}$  était significativement augmentée dans les ovaires traités comparé aux témoins 9 h après l'exposition à la MP.

**Objectif 1 : Déterminer si les ovocytes peuvent détecter les DSBs, si la quantité des dommages dépend de la concentration utilisée, et si les foyers de  $\gamma$ H2AX persistent.**

Pour compléter cet objectif, j'effectuerai deux types d'expériences différentes mais utilisant les mêmes techniques pour les analyses, comptage de follicules et immunohistochimie. Les premières expériences seront des cultures d'ovaires de souris CD-1 nouveau-nés exposés une seule fois à différentes concentrations de MP *in vitro*. Plusieurs concentrations de MP (0,1-3  $\mu$ M) seront utilisées pour déterminer si les DSBs sont présentes dans les ovocytes seulement lors d'une exposition à une concentration qui réduit significativement le nombre de follicules primordiaux. Les ovaires seront fixés 24 h et 8 j après l'exposition à la MP et la localisation et le nombre de foyers seront notés. Nous déterminerons si le nombre de DSBs à 24 h dépend de la concentration de MP et si ce nombre est lié à la sévérité de la perte des follicules primordiaux que nous observons après 8 jours. La comparaison de la distribution et le nombre de DSBs entre 24 h et 8 jours, nous donnera plus d'informations pour déterminer si les follicules contiennent des dommages pour au moins 8 jours.

J'effectuerai aussi des expériences *in vivo* avec des souris CD-1 adultes exposées au CPA et sacrifiées 24 h et 8 j après l'exposition. Ces expériences nous aideront à (1) confirmer que le système *in vitro* de culture est un bon système pour étudier les ovaires et (2) comparer la souche CD-1 à d'autres souches de souris utilisées pour étudier les effets du CPA sur le système reproducteur femelle.

**Objectif 2 : Déterminer s'il y a une différence de sensibilité entre les espèces de rongeurs.**

Il existe une différence de sensibilité entre les espèces après des expositions aux toxiques. Nous voulons comparer la sensibilité ovarienne des souris CD-1 et rattes Sprague-Dawley à la MP et déterminer si les DSBs sont aussi présentes chez les rattes.

Ces expériences détermineront si le mécanisme de toxicité est similaire entre deux espèces de rongeurs.

Pour compléter cet objectif, nous effectuerons le même type d'expériences *in vitro* avec des cultures d'ovaires de ratte Sprague-Dawley nouveau-nés exposés à différentes concentrations de MP (1-30  $\mu\text{M}$ ). Des analyses histologiques (comptage de follicule) ainsi que des analyses immunohistologiques (foyers  $\gamma\text{H2AX}$ ) seront utilisés. Nous allons comparer les effets de la MP chez des ovaires de souris et de ratte pour déterminer si (1) les ratte sont moins sensibles à la MP (2) si les ovaires de ratte détectent les DSBs (3) si les mêmes types cellulaire et stades folliculaires sont affectés (4) et s'il y a une différence de sensibilité entre les espèces de rongeurs.

## Section II: Résumé de l'article en français

Petrillo Stephanie K., Desmeules Patrice, Truong To-Quyen, and Devine Patrick J., en préparation. Detection of DNA damage in dormant oocytes after phosphoramidate mustard exposures of cultured rodent ovaries. Toxicology and Applied Pharmacology.

Les ovocytes sains sont essentiels pour avoir des enfants en bonne santé, mais peu est connu sur la capacité des ovocytes d'identifier et de réparer les dommages à l'ADN. Nous avons utilisé le cyclophosphamide (CPA), une drogue alkylante et ovotoxique, et son métabolite actif, la moutarde phosphoramidée (MP), pour montrer que la MP ( $\geq 3 \mu\text{M}$ ) réduisait significativement le nombre de follicules primordiaux dans des ovaires cultivés des souris CD-1. Maintenant nous étudions la capacité des ovocytes de rongeurs de répondre aux cassures à doubles brins (DSBs) d'ADN induit par la MP en examinant la phosphorylation de l'histone H2AX ( $\gamma\text{H2AX}$ ), un marqueur des DSBs. L'exposition des ovaires à 3 ou 0,1  $\mu\text{M}$  de MP, au jour 4 de culture, a induit respectivement la perte significative des follicules primordiaux et petits primaires. Nous avons observé la  $\gamma\text{H2AX}$  induit par la MP principalement dans les ovocytes. L'augmentation du nombre d'ovocytes avec des DSBs était dépendante de la concentration de MP. Le nombre de foyers maximal dans les ovocytes est atteint 12 à 24 h après l'exposition à 3-10  $\mu\text{M}$  MP. Le nombre d'ovocytes avec  $\geq 5$  foyers  $\gamma\text{H2AX}$ /ovocyte a été significativement augmenté ( $p < 0,05$ ) 24 h après une exposition à 1  $\mu\text{M}$  MP comparé aux témoins et a persisté pendant au moins 8 jours après l'exposition. L'inhibition des kinases qui phosphorylent l'H2AX a augmenté la perte des follicules de manière significative comparée à la MP seulement. Chez les souris CD-1 adultes, le CPA a induit la perte de follicules primordiaux et la formation de foyers  $\gamma\text{H2AX}$  dans les ovocytes après une seule exposition (250 mg/kg CPA). L'exposition à la MP d'ovaires de ratte Sprague-Dawley cultivés *in vitro* a diminué significativement le nombre de follicules primordiaux ( $\geq 30 \mu\text{M}$ ) et a augmenté les ovocytes avec les foyers  $\gamma\text{H2AX}$  ( $\geq 3 \mu\text{M}$ ). Les résultats suggèrent que les ovocytes peuvent détecter les DSBs induits par la MP et que les dommages sont induits aux concentrations inférieures à celles qui causent la perte significative des follicules primordiaux. Les résultats suggèrent aussi que les foyers  $\gamma\text{H2AX}$  peuvent persister dans les ovocytes pour au moins 8 jours après une

exposition *in vitro* à la MP. Ils suggèrent aussi qu'il y a des différences spécifiques entre les espèces dans la sensibilité à la MP mais que le mécanisme de toxicité est similaire. Les ovocytes qui survivent avec des dommages à l'ADN peuvent représenter un risque accru de problèmes de fertilité ou de problèmes de développement chez la progéniture.

Toxicology and Applied Pharmacology  
Manuscript Draft

Title: Detection of DNA damage in dormant oocytes after phosphoramidate mustard exposures of cultured rodent ovaries

Article Type: Regular Article

Key words: ovary, oocyte, DNA damage, follicle, H2AX, ovarian toxicity, cyclophosphamide

Stephanie K. Petrillo<sup>1</sup>, Patrice Desmeules<sup>1</sup>, To-Quyen Truong<sup>1</sup> and Patrick J. Devine<sup>1</sup>.  
<sup>1</sup>Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique – Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada

Reprint and corresponding author: Patrick J. Devine, PhD  
Université du Québec  
Institut national de la recherche scientifique  
Institut Armand-Frappier.  
531 boulevard des Prairies, Laval, QC, H7V 1B7  
(Canada)  
Fax: (450) 686-5309,  
E-mail: [patrick.devine@iaf.inrs.ca](mailto:patrick.devine@iaf.inrs.ca).

## Abstract

Healthy oocytes are critical for producing healthy children, but little is known about whether or not oocytes have the capacity to identify and recover from injury. Using a model ovotoxic alkylating drug, cyclophosphamide (CPA), and its active metabolite, phosphoramidate mustard (PM), we previously showed that PM ( $\geq 3 \mu\text{M}$ ) caused significant follicle loss in neonatal mouse ovaries *in vitro*. We now investigate the ability of oocytes to respond to PM-induced DNA damage, examining histone H2AX phosphorylation ( $\gamma\text{H2AX}$ ), a marker of DNA double strand breaks (DSBs). Exposure of cultured neonatal mouse ovaries to 3 and 0.1  $\mu\text{M}$  PM induced significant losses of primordial and small primary follicles, respectively. PM-induced  $\gamma\text{H2AX}$  was observed predominantly in oocytes, in which DSBs increased in a concentration-dependent manner and peaked 18-24 h after exposure to 3-10  $\mu\text{M}$  PM. Numbers of oocytes with  $\geq 5$   $\gamma\text{H2AX}$  foci were significantly increased with exposure to  $\geq 1 \mu\text{M}$  PM both 1 and 8 days after exposure compared to controls. Inhibiting the kinases that phosphorylate H2AX significantly increased follicle loss relative to PM alone. In adult mice, CPA also induced follicle loss and  $\gamma\text{H2AX}$  in oocytes *in vivo*. PM also significantly decreased primordial follicle numbers ( $\geq 30 \mu\text{M}$ ) and increased  $\gamma\text{H2AX}$  foci ( $\geq 3 \mu\text{M}$ ) in cultured pnd4 Sprague-Dawley rat ovaries. Results suggest oocytes can detect PM-induced damage at or below concentrations which cause significant primordial follicle loss, and there are quantitative species-specific differences in sensitivity. Surviving oocytes with DNA damage may represent an increased risk for fertility problems or unhealthy offspring.

## Introduction

Mammalian females are born with a finite number of gametes (Pedersen and Peters, 1968), which must remain healthy and viable over a period of decades to maintain fertility (Hirshfield, 1991; Hirshfield, 1997). Primordial germ cells undergo extensive mitoses during fetal organogenesis to establish a limited pool of gametes which arrest in meiosis, before becoming incorporated into dormant ovarian primordial follicles (~ 1 million in humans at birth) (Hirshfield, 1991; Faddy, 2000). The gametes, now considered oocytes, remain in meiotic arrest at the diplotene stage for up to several decades until follicles are either activated to develop and ovulate or undergo atresia (Hirshfield, 1991; Fortune *et al.*, 2000; Fortune, 2003). From birth, small numbers of follicles are continuously activated to develop, and adult ovaries have follicles of all stages present (Hirshfield, 1991; Gougeon, 1998). A woman will progressively lose follicles throughout her reproductive years until they are depleted, at which time she enters reproductive failure (Faddy and Gosden, 1996; Faddy, 2000).

The mechanisms which underlie many of the cases of infertility or birth defects have been hard to pinpoint, in many cases (Nelson and Holmes, 1989; Rasmussen *et al.*, 2003). Several factors, including genetics, smoking, and ovotoxic exposures have been identified as possible contributors to accelerated loss of ovarian follicles or to deleterious effects on the health of offspring. One of the most severe examples of such exposures is cancer therapy. Although existing clinical and epidemiological studies do not show a higher incidence of birth defects or abnormalities in children of women given chemotherapy and/or radiation (Pal and Santoro, 2002; Sklar *et al.*, 2006; Sklar, 2005; Meirow and Nugent, 2001; Mikkelsen *et al.*, 2007), such changes in gametes have been observed in rodent studies. Alkylating agents have been shown to cause accelerated loss primordial follicles in rodents studies (Ataya *et al.*, 1989; Desmeules and Devine, 2006; Meirow *et al.*, 1999; Plowchalk and Mattison, 1992). A higher incidence of malformations has been observed in fetuses of female mice exposed to the widely used alkylating chemotherapeutic agent cyclophosphamide (CPA) (Meirow *et al.*, 2001; Arnon *et al.*, 2001). Also, certain chemotherapeutic drugs and radiation are

known to increase genetic defects in gametes and accelerate gamete loss after toxic exposures to male rats (Aguilar-Mahecha *et al.*, 2005). Paternal exposures to CPA have been shown to cause epigenetic reprogramming of gametes or embryos in rats (Barton *et al.*, 2005; Barton *et al.*, 2007).

Advances in treatment of cancers have resulted in increased long-term patient survival (Sklar *et al.*, 2006), especially for young patients who have a survival rate of 70-90% (Linet *et al.*, 1999; Pulte *et al.*, 2008). Thus, avoiding side effects of these treatments, including infertility, have become increasingly important. Risk factors for chemotherapy-induced ovarian failure include patient age, type and dose schedule of treatment, and genetic determinants (Byrne, 1999; Meirrow and Schiff, 2005). Epidemiological studies have demonstrated that exposure to chemotherapy drugs, especially alkylating or DNA-damaging agents, and radiation can result in decreased fertility, temporary or permanent amenorrhea (loss of menstrual cyclicality), and/or reduction in ovarian follicles (Byrne, 1999). Young women who have undergone chemo- or radiotherapy have a greater risk of undergoing premature reproductive failure than untreated women, even if they regain normal ovarian function after treatments end (Chemaitilly *et al.*, 2006; Meirrow and Nugent, 2001; Meirrow and Schiff, 2005; Sklar *et al.*, 2006; Sklar, 2005; Byrne, 1999). These studies suggest that a woman can have treatment-induced effects on both growing (acute effects) and primordial (long-term effects) ovarian follicles. If some primordial follicles are eliminated by agents that cause DNA damage, this could suggest that some of the gametes that survive such exposures have permanent changes. This is a major source of concern for potential mothers who have undergone cancer treatments (Byrne *et al.*, 1998; Signorello *et al.*, 2006).

CPA is one of the most commonly used chemotherapeutic drugs, particularly for treatment of cancers in children (e.g. leukaemia, Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas) and women of reproductive age (e.g. breast cancer, bone and soft tissue sarcomas) (Colvin, 1999; Sklar *et al.*, 2006; Chemaitilly *et al.*, 2006; Meirrow *et al.*, 1999; Hurley, 2002). It is also used as an immunosuppressant, for autoimmune

diseases, multiple sclerosis and preventing organ transplant rejection (Krishnan *et al.*, 2008; Allison, 2000; Manger *et al.*, 2006). CPA must be activated by cytochrome P-450 enzymes before the active cytotoxic metabolite, phosphoramidate mustard (PM), can be formed (Colvin, 1999; Anderson *et al.*, 1995). PM destroys rapidly dividing cells, such as cancer cells, by binding covalently to DNA, inducing DNA-DNA and DNA-protein crosslinks, and double-strand breaks (DSBs) (Colvin, 1999; Hurley, 2002; Helleday *et al.*, 2008). PM has also been shown to be the active ovotoxic metabolite *in vivo* (Plowchalk and Mattison, 1991) and *in vitro* (Desmeules and Devine, 2006). Its genotoxicity may also be the mechanism by which PM induces ovarian follicle loss. In cancer patients given CPA, rapid amenorrhea can occur, likely from antral follicle destruction (Sonmezer and Oktay, 2006; Uldall *et al.*, 1972). CPA-induced premature ovarian failure can also result from primordial follicle depletion (Sonmezer and Oktay, 2006; Manger *et al.*, 2006; Chemaitilly *et al.*, 2006; Brunner *et al.*, 2006). In rodents, CPA has species-specific differences in ovarian toxicity, with loss of dormant primordial follicles in mice (Plowchalk and Mattison, 1991; Plowchalk and Mattison, 1992; Meirou *et al.*, 1999) and loss of antral follicles in rats (Ataya *et al.*, 1989; Davis and Heindel, 1998; Jarrell *et al.*, 1991; Jarrell *et al.*, 1987).

Drugs such as CPA may cause DNA DSBs, one of the most toxic forms of DNA damage, in oocytes. An early event in DNA DSB response is the phosphorylation of the histone H2A variant, H2AX (Rogakou *et al.*, 1998). It is widely distributed throughout the chromatin, helping form the nucleosome around which DNA is wound. The phosphorylation of H2AX ( $\gamma$ H2AX) at Ser139 occurs rapidly at sites of DNA DSBs by members of the phosphatidylinositol-3 kinase related kinase family (PIKK), including ataxia-telangiectasia mutated (ATM), ATM-related (ATR) and DNA-dependent protein kinases (DNA-PK), which become activated in response to DNA damage (Durocher and Jackson, 2001; Burma *et al.*, 2001; Bakkenist and Kastan, 2003; Khanna *et al.*, 2001).  $\gamma$ H2AX plays an important role in recruiting and maintaining DNA repair molecules at the site of damage until repair is complete, and has become the gold standard for localizing DNA DSBs (Sedelnikova *et al.*, 2002; Rogakou *et al.*, 1998; Rogakou *et al.*, 1999; van Attikum and Gasser, 2005; Paull *et al.*, 2000; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2003). It has been observed in cell lines after toxic

exposures, and during apoptosis and sister-chromatid exchange (Paull *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2008).  $\gamma$ H2AX has also been observed in human oocytes following exposure to ionizing radiation or high dose chemotherapy exposure (Suh *et al.*, 2006; Takai *et al.*, 2007; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004).

We have previously shown that single exposures of  $\geq 3 \mu\text{M}$  PM induced pre-antral follicle depletion (>90%) of cultured mouse ovaries, with morphologic changes in primordial and small primary follicles visible as early as 24 h following exposures (Desmeules and Devine, 2006). The integrity of the gamete genome is required for the health of offspring. Both granulosa cells and oocytes could be affected by PM, but oocytes, arrested in meiosis, may be more sensitive than somatic cells to DNA damage. The response of oocytes to such injury has been poorly studied. Therefore, in this study, we examine the possibility that the mechanism by which PM induces ovarian follicle loss involves DNA DSBs in oocytes. We demonstrate here that DNA DSBs are present predominantly in oocytes of small ovarian follicles and that some DSBs persist for up to 8 days. Results suggest that DNA damage detection and repair mechanisms may be active in oocytes.

## Materials and Methods

**Animals.** Breeding colonies of CD-1 mice and Sprague-Dawley rats (Charles River, Montréal, QC) were maintained to produce pups for use in *in vitro* ovarian culture experiments. Rodents were housed in plastic cages under a 12 h light/dark photoperiod and received food and water *ad libidum*. Ovaries were collected from post-natal day 4 (PND4) female pups (day of birth designated as day 0). For *in vivo* experiments, 35-day-old adult female CD-1 mice (Charles River) were housed as described above. All animals were allowed to acclimate for 5 days before experiments began. All experimental procedures were approved by the INRS Animal Care and Use Committee and conformed to Canadian Council on Animal Protection guidelines.

**In vitro Ovarian Culture and Ovotoxic Exposures.** Whole PND4 ovaries were cultured *in vitro* as previously described (Desmeules and Devine, 2006; Devine *et al.*, 2004).

Culture medium was replaced every 2 days. Exposures were initiated on day 4 of culture, and chemicals were removed during the subsequent replacement of culture medium. PM (cyclohexylammonium salt; National Cancer Institute, Bethesda, MD), was dissolved in culture medium immediately before exposures. Wortmannin (Wtn; Sigma Chemical Co., Oakville, ON) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, 0.5%), diluted in culture medium, and applied 8 h after the start of PM exposure. DMSO (0.5%) was also added to wells of control ovaries in experiments with Wtn. For exposures to radiation, ovaries were placed in petri dishes for exposure to a  $^{137}\text{Cs}$  source at a dose rate of  $6.3 \times 10^{-2}$  Gy/s (Gamma Cell; Atomic Energy Canada), then put back into culture plates and fixed 2 days later.

Ovaries were fixed at specific time points after exposures in either Bouin's fixative (2-4 h) for follicle counts or in 3.7% buffered formaldehyde for immunohistochemistry (IHC, 4-24 h).

***In vivo Exposures.*** A single intraperitoneal injection of 0.9% saline (vehicle) or cyclophosphamide (75, 150 or 250 mg/kg in 0.9% saline; Sigma) was given to mice. Groups of mice were then sacrificed 1 and 8 days after exposure (3-5 per treatment group per time point). At necropsy, body and organ weights were recorded. One ovary from each mouse was preserved in Bouin's fixative for follicle counts and the other in buffered 3.7% formaldehyde for IHC.

***Ovarian follicle Counts.*** Bouin's-fixed ovaries were embedded in paraffin following standard histological procedures. Tissue sections (5 $\mu\text{m}$ ) were cut and stained with haematoxylin and eosin, and ovarian follicle populations were determined as described previously for cultured (Desmeules and Devine, 2006) or adult ovaries (Mayer *et al.*, 2004) in every 12 or 20<sup>th</sup> section, respectively. Healthy follicles were counted separately from those that had pyknotic (eosinophilic) oocytes or  $\geq 3$  pyknotic granulosa cells. Counting was done manually by two observers without knowledge of sample identity.

**Immunohistochemistry.** For cultured ovaries, formaldehyde fixed tissues were sectioned at 5  $\mu\text{m}$  and two adjacent sections of every 12 were kept for fluorescent immunohistochemical staining for  $\gamma\text{H2AX}$  using a polyclonal rabbit antibody (1:50 dilution, Upstate) overnight at 4°C with all other steps done as previously described (Desmeules and Devine, 2006). Images were taken using a Leica DMRE fluorescent microscope (Deerfield, IL) and digitized using ImagePro Plus software (version 5.0, Media Cybernetics, Silver Spring, MD) on a Sencam camera (Optikon, Kitchner, ON).

**Semi-Quantitative Analysis of  $\gamma\text{H2AX}$  Foci.** To quantify the amount of DNA DSBs following immunohistochemical staining for  $\gamma\text{H2AX}$ , the numbers of  $\gamma\text{H2AX}$  foci (intensely staining points in the nucleus) were counted in each oocyte of every follicle in two sections, at least 12 sections apart, of each ovary. Primordial, small or large primary follicle stages were analyzed separately. Follicles were divided into 2 categories based upon the number of foci found: 0-4 or  $\geq 5$  foci/nucleus, similar to methods described in (Aguilar-Mahecha *et al.*, 2005). Counting was done manually by two observers without knowledge of sample identity.

**Western blots.** For analyses of proteins by Western blot, 5 fresh cultured neonatal ovaries per treatment were pooled and homogenized manually in 40  $\mu\text{L}$  of cell culture lysis reagent/phenylmethyl sulfonyl fluoride (1X CCLR/PMSF) lysis buffer (Cell culture Lysis 5X Reagent, Promega) including phosphatase inhibitors (Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail, Pierce). Histones were isolated from adult CD-1 mouse testes as described in (Allis *et al.*, 1979) and used as a positive control for H2AX phosphorylation. Proteins were separated by gel electrophoresis on a 15% sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel (85 min, 120 v), then transferred to a nitrocellulose membrane (75 min, 100 v, Mini Protean 3, Biorad, Mississauga, ON). Membranes were blocked in 5% bovine serum albumin (BSA, fraction V)/Tris buffered saline with 0.15% Tween 20 (pH 7.6, TBST) for 1 h at room temperature, then exposed to rabbit anti- $\gamma\text{H2AX}$  primary Ab overnight at 4°C (1:2,000, diluted in 5% BSA/TBST; Upstate). Membranes were then washed 4 x 5 min with TBST, and incubated with secondary Ab for 2 h at room temperature (horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody,

1:10,000, diluted in TBST; Vector Laboratories). After washing again 4 x 5 min with TBST, bands were visualized with the Immun-Star HRP chemiluminescent kit (Biorad). Membranes were stripped with stripping buffer (0.5M Trizma-HCl pH 6.7, 10% SDS, 2%  $\beta$ -mercaptoethanol) at 67°C for 8 min, washed 3 x 10 min in TBST and incubated overnight 4°C with H2AX 1°Ab (Upstate; 1:5,000), followed by the same steps as listed above.

***Statistical Analysis.*** For comparisons of follicle numbers and body and organ weights among treatment groups, One-way ANOVA was used, followed by a Tukey post-hoc test, when appropriate. When data were not normally distributed, a Kruskal-wallis non parametric test was performed, followed by a Dunn's post-hoc test. Follicle numbers in ovaries cultured in the presence or absence of Wtn were compared by Student's T test for each PM concentration separately, because experiments were performed separately for each PM concentration.

For the time course of  $\gamma$ H2AX foci, the statistical analysis was done using the Fisher exact test, because many data points were near 0 or 1, making the Chi-squared test inappropriate. For comparisons of time points for specific concentrations, time points 6 to 9 h and 12 to 48 h were grouped and compared with Fischer's exact test. When statistical differences were determined, a likelihood ratio test was done to assess the heterogeneity of proportions for those time points. Following this test, time points were compared to each other with Fisher's exact test and by a G test for evaluation of homogeneity of distributions. Then a multiple analysis of distribution was performed using Chi-square tests to regroup time points with homogeneity of proportions for number of foci when divided into the two classes (0-4 and  $\geq 5$  foci/oocyte) (Scherrer, 1984). Analyses were done with JMP (Version 5.1, SAS Institute Inc, Cary, NC).

For IHC analysis of  $\gamma$ H2AX foci for testing concentration-dependent effects of PM at 1 and 8 days, numbers of foci were compared among concentrations for each time point and follicle type separately. The number of follicles with  $\geq 5$  foci/oocyte at different concentrations were found not to be normally distributed, and so were compared

separately for the 24 h and 8 day time points using a Kruskal-wallis nonparametric test, followed by a Dunn's post-hoc test. Analyses were done with Graphpad Prism (Version 5.01, GraphPad Software, La Jolla, CA).

## Results

### Cellular and sub-cellular localization of DNA double-strand breaks in oocytes

Fluorescent IHC was used to determine whether or not PM could induce DNA DSB in cultured ovaries and, if so, to identify the specific cell and follicle types in which this may occur. To do this, localization of  $\gamma$ H2AX was examined in cultured mouse ovaries following exposure to 3 and 10  $\mu$ M PM, concentrations known to cause rapid and significant follicle loss in this system (Desmeules and Devine, 2006).  $\gamma$ H2AX staining appeared as bright points within nuclei (foci), predominantly in oocytes (Fig. 1a-b). Small numbers of individual granulosa cells also were stained, but the staining pattern was more intense and distributed throughout the nucleus (not shown), rather than the individual foci observed in oocytes (Fig. 1). No staining was observed in any other ovarian cell types of cultured ovaries, and no staining was observed when the primary antibody was not used (Fig. 1c). In untreated ovaries, there were very few granulosa cells or oocytes with  $\gamma$ H2AX staining (0-3 % of follicles contained  $\geq 5$  foci/oocyte), suggesting that DSB formation is normally relatively rare. In contrast,  $\gamma$ H2AX foci were abundant in ovaries exposed to 3 or 10  $\mu$ M PM (Figs. 1a-c and 2), with up to 80% of small follicles containing  $\geq 5$  foci/oocyte. Only rarely were oocytes stained in a similar pattern as granulosa cells, with their whole nucleus stained brightly (data not shown).

To compare PM-induced injury to a known inducer of DNA DSBs, cultured ovaries were exposed to ionizing radiation (IR) (Rogakou *et al.*, 1999; Kato *et al.*, 2008; Celeste *et al.*, 2002). Preliminary tests in our laboratory determined that exposures to  $\geq 0.5$  Gray (Gy) caused complete loss of healthy ovarian follicles in cultured ovarian follicles when examined 2 days later (data not shown).  $\gamma$ H2AX staining was observed in IR-exposed ovaries in similar punctate patterns of foci as those seen with PM. Oocytes of all follicle

types had nuclear  $\gamma$ H2AX foci, and a few granulosa cells were also stained. Foci could be observed as early as 1.5 hours following exposures to IR (2 Gy, Fig. 1d).

The specificity of the  $\gamma$ H2AX antibody was confirmed by Western blot analysis, using isolated histones from testes and total ovarian and testicular homogenates. No bands were observed in normal ovaries whereas a single band was observed at 15 kDa in isolated histones and whole testis homogenates (data not shown). Western blot analysis also confirmed increased  $\gamma$ H2AX in cultured PND4 mouse ovaries exposed to 10  $\mu$ M PM for 24 h (Fig.3, lane 1 and 2). Isolated histones and whole testis homogenates were used for controls (Fig.3, lane 3 and 4).

#### **Timing of DNA double-strand break formation in oocytes**

The timing of PM-induced  $\gamma$ H2AX foci formation was determined by fixing cultured mouse ovaries at specific times after single exposures to PM. Most primordial (70-80%) and small primary (80-99%) follicles had  $\geq 5$  foci/oocyte between 12 and 24 h after exposure to 10  $\mu$ M PM. Significant elevations above controls in primordial follicles with  $\geq 5$   $\gamma$ H2AX foci/oocyte were observed between 9 and 24 hours for those exposed to 10  $\mu$ M and from 9 through 48 h for those exposed to 3  $\mu$ M ( $p < 0.05$ , Fig. 2). There were significant concentration-dependent differences in numbers of stained follicles ( $p < 0.05$ ). Although there were no statistically significant increases in numbers of foci in large primary or small secondary follicles exposed to 3 or 10  $\mu$ M PM, tissues did have some follicles of these stages with oocytes containing  $\gamma$ H2AX staining, notably after 18 and 24 h of exposure (Fig. 1a-b; 3  $\mu$ M data not shown).

#### **Inhibition of H2AX Phosphorylation Sensitizes Primordial Follicles to PM**

If oocytes can repair PM-induced DNA DSBs, inhibiting the enzymes that phosphorylate H2AX should increase small ovarian follicle loss by inhibiting the recruitment of the DNA repair machinery. The fungal metabolite Wortmannin (Wtn), a known inhibitor of the PIKK family (Sarkaria *et al.*, 1998), was added to cultures 8h

after PM exposures began, just prior to the first appearance of  $\gamma$ H2AX foci (Fig. 4), due to its short half-life in culture (Ludeman, 1999). Although neither Wtn nor 1  $\mu$ M PM alone significantly decreased primordial follicle numbers relative to untreated ovaries in these experiments, primordial follicle numbers were significantly decreased in ovaries co-exposed to 1  $\mu$ M PM and Wtn compared to either untreated ovaries or those exposed to 1  $\mu$ M PM alone ( $p < 0.05$ , Fig. 4). No effect was observed at the lower PM concentration tested (0.3  $\mu$ M,  $p > 0.05$ , Fig. 4) or for primary follicles at either concentration ( $p > 0.05$ ; data not shown).

#### **Concentration-dependent induction of DSBs parallel PM-induced follicle loss**

The PM concentrations tested thus far cause almost complete follicle elimination in cultured mouse ovaries (Desmeules and Devine, 2006) and are above circulating levels attained in chemotherapy (0.3  $\mu$ M with a dose of 1 g/kg CPA either orally or iv) in patients (Struck *et al.*, 1987). Significant losses of primordial follicles (92 % loss relative to controls) occurred 8 d after exposure to  $\geq 3$   $\mu$ M PM ( $p < 0.05$ , Fig. 5A), in concordance with previous experiments where ovaries were exposed on d 1 of culture (Desmeules and Devine, 2006). In contrast, numbers of small primary follicles were significantly decreased even at the lowest concentration tested ( $\geq 0.1$   $\mu$ M PM,  $p < 0.05$ , Fig. 5B), decreasing from 38 % with 0.1  $\mu$ M to 87 % with 3  $\mu$ M. No significant differences were detected for larger follicles.

The numbers of follicles with  $\gamma$ H2AX foci were determined 24 h and 8 d after exposures to 0.1-1  $\mu$ M PM. Significant increases in follicles with  $\geq 5$  foci/oocyte were observed 24 h after exposures to concentrations of 1 and 0.3  $\mu$ M PM for primordial and small primary follicles, respectively, relative to untreated control ovaries ( $p < 0.05$ , Fig. 6). There were fewer follicles with  $\geq 5$   $\gamma$ H2AX foci/oocyte 8 days after exposure than after 24 h. Whereas 12% and 37% of primordial follicles had  $\geq 5$  foci/oocyte from 0.3 and 1  $\mu$ M PM, respectively, at 24 h, ovaries had 2 and 7% of their primordial follicles marked at 8 d with these same concentrations. There were still significantly more

primordial and small primary follicles with  $\geq 5$  foci/oocyte at 8 d with 1  $\mu\text{M}$  PM than in controls (Fig. 6).

#### **Cross-species comparison of chemically-induced ovarian toxicity and DNA damage**

Using the same neonatal ovarian culture system as for mice, the sensitivity of cultured rat ovaries to PM was characterized. Follicle counts of rat ovaries 8 d after a single exposure to PM on d4 of culture revealed that primordial and small primary follicle numbers were significantly reduced at concentrations of  $\geq 30 \mu\text{M}$  PM, compared to controls ( $p < 0.05$ ; Fig. 7). No significant differences in numbers of larger follicles were observed. Numbers of  $\gamma\text{H2AX}$  foci were just as low in control rat ovaries as in mouse ovaries ( $\sim 2\%$ , Fig. 8). The numbers of oocytes with  $\geq 5 \gamma\text{H2AX}$  foci/oocyte significantly increased in both primordial and small primary follicles of rat ovaries exposed to  $\geq 10 \mu\text{M}$  PM for 24 h ( $p < 0.05$ ), but not at lower concentrations, relative to untreated ovaries (Fig. 8). Granulosa and interstitial cells appeared to be more frequently stained than in mouse ovaries (not shown), but most staining was still found in oocyte nuclei (Fig. 8A-C).

#### ***In vivo* sensitivity of small ovarian follicles to PM-induced DNA damage**

In order to verify that effects observed in culture correspond to events which occur *in vivo*, ovarian follicle loss and the formation of DSBs in follicles were examined following *in vivo* exposures of mice to cyclophosphamide. CD-1 mice given single ip injections of CPA (75, 150, or 250 mg/kg) did not have any changes in kidney or body weights either 1 or 8 d after exposures compared to saline-injected controls ( $p > 0.05$ , Table 1). Spleen weights were significantly decreased 1 d after exposures and significantly increased 8 d later in mice dosed with 150 or 250 mg/kg CPA, relative to mice given saline ( $p < 0.05$ , Table 1). Liver weights were significantly increased 8 d after exposures in mice dosed with 250 mg/kg CPA ( $p < 0.05$ ). Primordial ovarian follicles were significantly decreased at both time point but only significantly at the 24 h time point in mice given 250 mg/kg CPA ( $p < 0.05$ , Fig. 9A,D), whereas antral follicles

were not significantly different because of high variability between ovaries (Fig. 9C, F). There were no significant differences in any other follicle type (Fig. 9B, E and data not shown).

$\gamma$ H2AX foci were observed by IHC in ovarian sections of all three CPA-treated groups. Some cells in corpora lutea and granulosa cells of larger follicles were brightly stained, whereas oocytes of smaller follicles had similar foci to what was seen *in vitro* (data not shown). Since the majority of adult ovaries contain mostly corpora lutea and large antral follicles, the small numbers of small ovarian follicles per section and high background staining made identification of foci difficult and quantification of foci in adult ovaries impossible.

## **Discussion**

Our results demonstrate loss of follicles and H2AX phosphorylation in oocytes at pharmacologically relevant concentrations within the range that have been observed in patients (Struck et al., 1987). In fact, some women are exposed to higher (up to 600 mg/kg) or repeated doses of CPA, or to combinations of drugs (Moore, 1991), so that conditions used in our studies may not represent the most severe situation to which a woman could be exposed. Levels as low as 0.1  $\mu$ M PM caused significant decreases in small primary follicles in cultured mouse ovaries. Significant increases in follicles with  $\gamma$ H2AX foci occurred at 1  $\mu$ M.  $\gamma$ H2AX was observed in oocytes within hours of a single exposure to PM or IR *in vitro*, with some foci remaining for up to 8 days. Results provide evidence that the underlying mechanism by which chemotherapy or radiation induces follicle loss is through DNA damage in gametes. Furthermore, effects of PM were similar in rats and mice, and the *in vitro* culture system closely mimicked what was seen *in vivo*.

At least three outcomes are possible for oocytes with DNA damage: (1) elimination if damage is too severe, (2) survival in spite of injury, or (3) survival following repair of damage. The first outcome does occur, as shown by decreased follicle numbers

following exposures to alkylating agents *in vitro* and in rodents, and follicle loss and fertility problems in some female chemotherapy patients (Meirow et al., 1999; Byrne, 1999; Meirow and Nugent, 2001; Meirow and Schiff, 2005; Sklar et al., 2006). Also, we found small numbers of follicles do persist with  $\gamma$ H2AX foci, at least up to 8 d after exposures *in vitro*. Our results, however, do not prove conclusively that oocytes are able to repair their DNA, although increased sensitivity of cultured ovaries to PM with co-exposure to WTN suggests active repair processes. There is some evidence in the literature for active DNA repair in oocytes, but almost all has been obtained from indirect methods, with ovulated oocytes or extracts of non-mammalian oocytes (reviewed in (Ashwood-Smith and Edwards, 1996). Alternative strategies are needed to more directly assess the capacity of mammalian oocytes to repair DNA damage under the conditions used here.

Thus far, epidemiological studies have not characterized detrimental effects of chemotherapeutic exposures on offspring of female patients (Byrne et al., 1998; Chemaitilly et al., 2006), although there was an increased risk for pre-term birth (Signorello et al., 2006). In contrast, female mice exposed once to CPA at specific times before mating had increased malformation rates in progeny, and the timing between exposure and such defects suggests changes at all follicle stages (Auroux et al., 1990; Meirow et al., 2001; Meirow and Nugent, 2001). Similar increases in malformations of offspring of male CPA-exposed rats were also observed (Trasler et al., 1986; Hales et al., 2005), as well as DNA damage in gametes (Aguilar-Mahecha et al., 2005). Of course, mechanisms other than DNA damage may also underlie defects in gametes and embryonic development, including changes in microtubules, chromatin structure, or epigenetic changes (Albertini, 1992; Barton et al., 2005; Trasler, 2006).

The phosphorylation of H2AX is an early step in the cellular response to DSBs that helps recruit essential DNA repair factors to the site of DNA damage (Rogakou et al., 1998; Paull et al., 2000; Modesti and Kanaar, 2001). In cell lines, foci appear within minutes and are repaired in minutes to hours (Rogakou et al., 1998; Sedelnikova et al., 2002; Staszewski et al., 2008).  $\gamma$ H2AX foci in oocytes were significantly more

prevalent than in controls starting 9 h after PM exposure, later than what occurs in cell lines but still earlier than morphological changes (Desmeules and Devine, 2006). The mechanism of PM cytotoxicity has been determined in other cell types to be DSB formation (Ludeman, 1999). Furthermore, the presence of  $\gamma$ H2AX in oocytes implies an induction of DSBs, although temporary generation of DSBs may also occur in the process of repairing multiple other types of DNA damage, including DNA adducts, strand cross-links, or single strand breaks (Niedernhofer et al., 2004). Other measures of DNA damage, such as TUNEL staining or alkaline elution of DNA, have not proven as sensitive or useful in detecting individual DSBs in oocytes. Co-localization of  $\gamma$ H2AX foci with other signaling and repair molecules following DNA-damage, shown under multiple conditions (Paull et al., 2000), could help confirm DSB formation and identify the DNA repair pathway(s) active in oocytes.

The response to PM exposure and DNA damage appear to vary in a cell- and follicle stage-dependent manner in ovaries. The timing of primordial follicle loss correlated well with *in vitro* results (Desmeules and Devine, 2006) and the short half-life (18 min) of PM (Ludeman, 1999), but the greater sensitivity of small primary follicles to PM found *in vitro* was not observed *in vivo*. This may have been due to differences in follicle dynamics between the two systems. Both granulosa cells and oocytes contained  $\gamma$ H2AX staining following PM exposures, with more foci in oocytes than in somatic cells of small follicles. This parallels the morphologic changes we previously reported in cultured mouse ovaries (Desmeules and Devine, 2006). It is possible that small numbers of injured granulosa cells underwent rapid repair, apoptosis, or even necrosis with loss of the signal, but such changes were not observed at early time points examined in our experiments.  $\gamma$ H2AX was observed in oocytes of all follicle stages, but numbers of follicles and morphology of oocytes of large primary through antral follicles were unaffected either *in vitro* or *in vivo*. These follicles may have either a better ability to respond to DNA damage than smaller follicles or such injury can be ignored at those stages. If injured follicles continue developing, this may partly explain the increase in malformations observed during the weeks following a single CPA exposure to female mice before mating (Meirow et al., 2001). The long dormancy of oocytes of primordial

follicles and their supposedly low metabolic activity may make them particularly sensitive to insults from exogenous or endogenous toxic substances (Hirshfield, 1997).

We found that both the types of follicles and cells affected, as well as the localization of  $\gamma$ H2AX foci in cultured ovaries, were consistent in ovaries of both mice and rats *in vitro*. This is evidence for a common mechanism for ovarian follicle loss involving DNA damage in oocytes. In contrast to these similarities, rat ovaries required exposures to approximately 10-fold higher PM concentrations than mouse ovaries before significant changes in either foci formation or follicle loss occurred. These quantitative, intrinsic differences in sensitivity of ovaries to PM could be due to variations in ovary- or oocyte-specific detoxification, DNA repair capabilities, or even penetration of ovaries that are different sizes. This disparity in sensitivity could complicate predictions of ovotoxicity in humans, and better understanding of these differences would improve the translatability of animal or *in vitro* models.

The chromosomal integrity of gametes is essential for the health of offspring, and there may be possible long-term effects of DSBs and/or DNA damage in oocytes on fertility and progeny. We observed that not all injured oocytes are eliminated, since foci are still present 8 d after exposures and  $\gamma$ H2AX is thought to remain at DSBs until repair is fully accomplished (Redon et al., 2002). Exposure-induced follicle loss has been reported for other genotoxic drugs, radiation, cigarette smoke, and pollutants (Hoyer and Sipes, 1996; Brunner et al., 2006; Chemaitilly et al., 2006; Manger et al., 2006; Sonmezer and Oktay, 2006) and some of these have been shown to induce DNA damage in other models. Thus, DSB formation in oocytes may be a common mechanism of ovotoxicants. Furthermore, results raise concern for the use of GnRH antagonists and other agents in preserving fertility in chemotherapy patients (Somers et al., 2005; Blumenfeld, 2007), which may preserve damaged follicles. Also, both primordial follicle loss and DNA damage can be cumulative if damage is not repaired, so even low-level, daily environmental exposures could lead to earlier ovarian failure or compromised gametes. The latter has the potential to be a mechanism through which some embryo/fetal losses or malformations occur. Future work will examine other

chemicals that may induce DNA damage in gametes, as well as the ultimate fate of injured gametes *in vivo*.

#### **Conflict of Interest Statement**

The authors have no conflicts of interest.

#### **Acknowledgements**

This work was supported by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). The phosphoramidate mustard used in these experiments was graciously provided by the Drug Synthesis and Chemistry Branch, Division of the Cancer Treatment, National Cancer Institute. The authors wish to thank Dr. S.K. Sahambi and Theresa Choisi for their assistance with tissue collection. We also wish to thank Dr. E. Drobetsky for assistance with irradiation experiments.

## Reference List

1. Aguilar-Mahecha, A., Hales, B. F., and Robaire, B. (2005). Effects of acute and chronic cyclophosphamide treatment on meiotic progression and the induction of DNA double-strand breaks in rat spermatocytes. *Biology of Reproduction* 6, 1297-304.
2. Albertini, D. F. (1992). Cytoplasmic microtubular dynamics and chromatin organization during mammalian oogenesis and oocyte maturation. *Mutation Research* 1-2, 57-68.
3. Allis, C. D., Glover, C. V., and Gorovsky, M. A. (1979). Micronuclei of *Tetrahymena* contain two types of histone H3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 10, 4857-61.
4. Allison, A. C. (2000). Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology* 2-3, 63-83.
5. Anderson, D., Bishop, J. B., Garner, R. C., Ostrosky-Wegman, P., and Selby, P. B. (1995). Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. *Mutation Research* 1-2, 115-81.
6. Arnon, J., Meirou, D., Lewis-Roness, H., and Ornoy, A. (2001). Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. *Human Reproduction Update* 4, 394-403.
7. Ashwood-Smith, M. J., and Edwards, R. G. (1996). DNA repair by oocytes. *Molecular Human Reproduction* 1, 46-51.
8. Ataya, K., Pydyn, E., Young, J., and Struck, R. (1990). The uptake and metabolism of cyclophosphamide by the ovary. *Selective Cancer Therapeutics* 2, 83-92.
9. Ataya, K. M., Valeriote, F. A., and Ramahi-Ataya, A. J. (1989). Effect of cyclophosphamide on the immature rat ovary. *Cancer Research* 7, 1660-4.
10. Augood, C., Duckitt, K., and Templeton, A. A. (1998). Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction* 6, 1532-9.
11. Auroux, M., Dulioust, E., Selva, J., and Rince, P. (1990). Cyclophosphamide in the F0 male rat: physical and behavioral changes in three successive adult generations. *Mutation Research* 2, 189-200.
12. Bakkenist, C. J., and Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 6922, 499-506.

13. Barber, R., Plumb, M. A., Boulton, E., Roux, I., and Dubrova, Y. E. (2002). Elevated mutation rates in the germ line of first- and second-generation offspring of irradiated male mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 10, 6877-82.
14. Barton, T. S., Robaire, B., and Hales, B. F. (2005). Epigenetic programming in the preimplantation rat embryo is disrupted by chronic paternal cyclophosphamide exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 22, 7865-70.
15. Barton, T. S., Robaire, B., and Hales, B. F. (2007). DNA damage recognition in the rat zygote following chronic paternal cyclophosphamide exposure. *Toxicological Sciences* 2, 495-503.
16. Blatt, J. (1999). Pregnancy outcome in long-term survivors of childhood cancer. *Medical and Pediatric Oncology* 1, 29-33.
17. Blumenfeld, Z. (2007). How to preserve fertility in young women exposed to chemotherapy? The role of GnRH agonist cotreatment in addition to cryopreservation of embryos, oocytes, or ovaries. *The Oncologist* 9, 1044-54.
18. Boulton, S., Kyle, S., Yalcintepe, L., and Durkacz, B. W. (1996). Wortmannin is a potent inhibitor of DNA double strand break but not single strand break repair in Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis* 11, 2285-90.
19. Brunner, H. I., Bishnoi, A., Barron, A. C., Houk, L. J., Ware, A., Farhey, Y., Mongey, A. B., Strife, C. F., Graham, T. B., and Passo, M. H. (2006). Disease outcomes and ovarian function of childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Lupus* 4, 198-206.
20. Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D. J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry* 45, 42462-7.
21. Byrne, J. (1999). Infertility and premature menopause in childhood cancer survivors. *Medical and Pediatric Oncology* 1, 24-8.
22. Byrne, J., Rasmussen, S. A., Steinhorn, S. C., Connelly, R. R., Myers, M. H., Lynch, C. F., Flannery, J., Austin, D. F., Holmes, F. F., Holmes, G. E., Strong, L. C., and Mulvihill, J. J. (1998). Genetic disease in offspring of long-term survivors of childhood and adolescent cancer. *American Journal of Human Genetics* 1, 45-52.
23. Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P. J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H. T., Sedelnikova, O. A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M. J., Redon, C., Pilch, D. R., Oлару, A., Eckhaus, M., Camerini-Otero, R. D., Tessarollo, L., Livak, F., Manova, K., Bonner, W. M., Nussenzweig, M. C., and Nussenzweig, A. (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 5569, 922-7.

24. Chemaitilly, W., Mertens, A. C., Mitby, P., Whitton, J., Stovall, M., Yasui, Y., Robison, L. L., and Sklar, C. A. (2006). Acute ovarian failure in the childhood cancer survivor study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 5, 1723-8.
25. Colvin, O. M. (1999). An overview of cyclophosphamide development and clinical applications. *Current Pharmaceutical Design* 8, 555-60.
26. Davis, B. J. , and Heindel, J. J. (1998). Ovarian toxicants: Multiple mechanisms of action. In *Reproductive and developmental toxicology* pp. 373-395. New York.
27. Desmeules, P., and Devine, P. J. (2006). Characterizing the ovotoxicity of cyclophosphamide metabolites on cultured mouse ovaries. *Toxicological Sciences* 2, 500-9.
28. Devine, P. J., Sipes, I. G., and Hoyer, P. B. (2004). Initiation of delayed ovotoxicity by in vitro and in vivo exposures of rat ovaries to 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Reproductive Toxicology* 1, 71-7.
29. Durocher, D., and Jackson, S. P. (2001). DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Current Opinion in Cell Biology* 2, 225-31.
30. Faddy, M. J. (2000). Follicle dynamics during ovarian ageing. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1-2, 43-8.
31. Faddy, M. J., and Gosden, R. G. (1996). A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women. *Human Reproduction* 7, 1484-6.
32. Fernandez-Capetillo, O., Celeste, A., and Nussenzweig, A. (2003). Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors. *Cell Cycle* 5, 426-7.
33. Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M., and Nussenzweig, A. (2004). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)* 8-9, 959-67 .
34. Fortune, J. E. (2003). The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science* 3-4, 135-63.
35. Fortune, J. E., Cushman, R. A., Wahl, C. M., and Kito, S. (2000). The primordial to primary follicle transition . *Molecular and Cellular Endocrinology* 1-2, 53-60.
36. Gougeon, A. (1998). Ovarian follicular growth in humans: ovarian ageing and population of growing follicles. *Maturitas* 2, 137-42.

37. Green, D. M., Whitton, J. A., Stovall, M., Mertens, A. C., Donaldson, S. S., Ruymann, F. B., Pendergrass, T. W., and Robison, L. L. (2003). Pregnancy outcome of partners of male survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Journal of Clinical Oncology* 4, 716-21.
38. Hales, B. F., Aguilar-Mahecha, A., and Robaire, B. (2005a). The stress response in gametes and embryos after paternal chemical exposures. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2 Suppl, 514-20.
39. Hales, B. F., Barton, T. S., and Robaire, B. (2005b). Impact of paternal exposure to chemotherapy on offspring in the rat. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs.* 34, 28-31.
40. Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B., and Sharma, R. A. (2008). DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 193-204.
41. Hirshfield, A. N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology* 43-101 .
42. Hirshfield, A. N. (1997). Overview of ovarian follicular development: considerations for the toxicologist. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1, 10-5 .
43. Hoyer, P. B. , and Devine, P. J. (2002). *Endocrinology and Toxicology: The Female Reproductive System.* In *Handbook of Toxicology* (M. J. Derelanko, and M. A. Hollinger, Eds.), pp. 573-596. CRC Press, Boca Raton FL.
44. Hurley, L. H. (2002). DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 188-200.
45. Jarrell, J., Lai, E. V., Barr, R., McMahon, A., Belbeck, L., and O'Connell, G. (1987). Ovarian toxicity of cyclophosphamide alone and in combination with ovarian irradiation in the rat. *Cancer Research* 9, 2340-3.
46. Jarrell, J. F., Bodo, L., YoungLai, E. V., Barr, R. D., and O'Connell, G. J. (1991). The short-term reproductive toxicity of cyclophosphamide in the female rat. *Reproductive Toxicology* 6, 481-5.
47. Jick, H., Porter, J., and Morrison, A. S. (1977). Relation between smoking and age of natural menopause. *Lancet* 1354-1355.
48. Kato, T. A., Okayasu, R., and Bedford, J. S. (2008). Comparison of the induction and disappearance of DNA double strand breaks and gamma-H2AX foci after irradiation of chromosomes in G1-phase or in condensed metaphase cells. *Mutation Research* 1-2, 108-12.

49. Khanna, K. K., Lavin, M. F., Jackson, S. P., and Mulhern, T. D. (2001). ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death and Differentiation* 11, 1052-65.
50. Kinney, A., Kline, J., Kelly, A., Reuss, M. L., and Levin, B. (2007). Smoking, alcohol and caffeine in relation to ovarian age during the reproductive years. *Human Reproduction* 4, 1175-85.
51. Krishnan, C., Kaplin, A. I., Brodsky, R. A., Drachman, D. B., Jones, R. J., Pham, D. L., Richert, N. D., Pardo, C. A., Yousem, D. M., Hammond, E., Quigg, M., Trecker, C., McArthur, J. C., Nath, A., Greenberg, B. M., Calabresi, P. A., and Kerr, D. A. (2008). Reduction of disease activity and disability with high-dose cyclophosphamide in patients with aggressive multiple sclerosis. *Archives of Neurology* 8, 1044-51.
52. Linet, M. S., Ries, L. A., Smith, M. A., Tarone, R. E., and Devesa, S. S. (1999). Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. *Journal of the National Cancer Institute* 12, 1051-8.
53. Lopez, S. G., and Luderer, U. (2004). Effects of cyclophosphamide and buthionine sulfoximine on ovarian glutathione and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine* 11, 1366-77.
54. Ludeman, S. M. (1999). The chemistry of the metabolites of cyclophosphamide. *Current Pharmaceutical Design* 8, 627-43.
55. Manger, K., Wildt, L., Kalden, J. R., and Manger, B. (2006). Prevention of gonadal toxicity and preservation of gonadal function and fertility in young women with systemic lupus erythematosus treated by cyclophosphamide: the PREGO-Study. *Autoimmun Rev* 4, 269-72.
56. Mayer, L. P., Devine, P. J., Dyer, C. A., and Hoyer, P. B. (2004). The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. *Biology of Reproduction* 1, 130-8.
57. Meiorow, D., Epstein, M., Lewis, H., Nugent, D., and Gosden, R. G. (2001). Administration of cyclophosphamide at different stages of follicular maturation in mice: effects on reproductive performance and fetal malformations. *Human Reproduction* 4, 632-7.
58. Meiorow, D., Lewis, H., Nugent, D., and Epstein, M. (1999). Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool. *Human Reproduction* 7, 1903-7.
59. Meiorow, D., and Nugent, D. (2001). The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Human Reproduction Update* 6, 535-43.

60. Meirow, D., and Schiff, E. (2005). Appraisal of chemotherapy effects on reproductive outcome according to animal studies and clinical data. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs.* 34, 21-5.
61. Mikkelsen, T. F., Graff-Iversen, S., Sundby, J., and Bjertness, E. (2007). Early menopause, association with tobacco smoking, coffee consumption and other lifestyle factors: a cross-sectional study. *BMC Public Health* 147, 149.
62. Modesti, M., and Kanaar, R. (2001). DNA repair: spot(light)s on chromatin. *Current Biology* 6, R229-32.
63. Moore, M. J. (1991). Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clinical Pharmacokinetics* 3, 194-208.
64. Nelson, K., and Holmes, L. B. (1989). Malformations due to presumed spontaneous mutations in newborn infants. *New England Journal of Medicine* 1, 19-23.
65. Niedernhofer, L. J., Odijk, H., Budzowska, M., van Drunen, E., Maas, A., Theil, A. F., de Wit, J., Jaspers, N. G., Beverloo, H. B., Hoeijmakers, J. H., and Kanaar, R. (2004). The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Molecular and Cellular Biology* 13, 5776-87.
66. Okayasu, R., Suetomi, K., and Ullrich, R. L. (1998). Wortmannin inhibits repair of DNA double-strand breaks in irradiated normal human cells. *Radiation Research* 5, 440-5.
67. Pal, L., and Santoro, N. (2002). Premature ovarian failure (POF): discordance between somatic and reproductive aging. *Ageing Res Rev* 3, 413-23.
68. Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M., and Bonner, W. M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology* 15, 886-95.
69. Pedersen, T., and Peters, H. (1968). Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* 3, 555-7.
70. Plowchalk, D. R., and Mattison, D. R. (1991). Phosphoramidate mustard is responsible for the ovarian toxicity of cyclophosphamide. *Toxicology and Applied Pharmacology* 3, 472-81.
71. Plowchalk, D. R., and Mattison, D. R. (1992). Reproductive toxicity of cyclophosphamide in the C57BL/6N mouse: 1. Effects on ovarian structure and function. *Reproductive Toxicology* 5, 411-21.

72. Price, B. D., and Youmell, M. B. (1996). The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin sensitizes murine fibroblasts and human tumor cells to radiation and blocks induction of p53 following DNA damage. *Cancer Research* 2, 246-50.
73. Pulte, D., Gondos, A., and Brenner, H. (2008). Trends in 5- and 10-year survival after diagnosis with childhood hematologic malignancies in the United States, 1990-2004. *Journal of the National Cancer Institute* 18, 1301-9.
74. Rasmussen, S. A., Olney, R. S., Holmes, L. B., Lin, A. E., Keppler-Noreuil, K. M., and Moore, C. A. (2003). Guidelines for case classification for the National Birth Defects Prevention Study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 3, 193-201.
75. Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., and Bonner, W. (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Current Opinion in Genetics and Development* 2, 162-9.
76. Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W. M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *Journal of Cell Biology* 5, 905-16.
77. Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., and Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry* 10, 5858-68.
78. Sarkaria, J. N., Tibbetts, R. S., Busby, E. C., Kennedy, A. P., Hill, D. E., and Abraham, R. T. (1998). Inhibition of phosphoinositide 3-kinase related kinases by the radiosensitizing agent wortmannin. *Cancer Research* 19, 4375-82 .
79. Scherrer, B. (1984). *Biostatistique*. Montréal.
80. Sedelnikova, O. A., Rogakou, E. P., Panyutin, I. G., and Bonner, W. M. (2002). Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiation Research* 4, 486-92.
81. Shrivastav, M., De Haro, L. P., and Nickoloff, J. A. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Research* 1, 134-47.
82. Siegal, A., Kopel, S., and Leibovici, J. (1986). Histological changes in spleen and lymph nodes of mice administered cyclophosphamide and levan. *Cell and Tissue Research* 1, 183-8.
83. Signorello, L. B., Cohen, S. S., Bosetti, C., Stovall, M., Kasper, C. E., Weathers, R. E., Whitton, J. A., Green, D. M., Donaldson, S. S., Mertens, A. C., Robison, L. L., and Boice, J. D. Jr (2006). Female survivors of childhood cancer: preterm birth and low birth weight among their children. *Journal of the National Cancer Institute* 20, 1453-61.

84. Sklar, C. (2005). Maintenance of ovarian function and risk of premature menopause related to cancer treatment. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs.* 34, 25-7.
85. Sklar, C. A., Mertens, A. C., Mitby, P., Whitton, J., Stovall, M., Kasper, C., Mulder, J., Green, D., Nicholson, H. S., Yasui, Y., and Robison, L. L. (2006). Premature menopause in survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *Journal of the National Cancer Institute* 13, 890-6.
86. Snippe, H., Merchant, B., Johannessen, L., and Inman, J. K. (1978). Effects of cyclophosphamide on the in vivo response of outbred athymic (nude) mice to a thymus-independent antigen (DNP-AGG-Ficoll). *Immunology* 6, 1009-15.
87. Somers, E. C., Marder, W., Christman, G. M., Ognenovski, V., and McCune, W. J. (2005). Use of a gonadotropin-releasing hormone analog for protection against premature ovarian failure during cyclophosphamide therapy in women with severe lupus. *Arthritis and Rheumatism* 9, 2761-7.
88. Sonmezer, M., and Oktay, K. (2006). Fertility preservation in young women undergoing breast cancer therapy. *The Oncologist* 5, 422-34.
89. Staszewski, O., Nikolova, T., and Kaina, B. (2008). Kinetics of gamma-H2AX focus formation upon treatment of cells with UV light and alkylating agents. *Environmental and Molecular Mutagenesis*.
90. Struck, R. F., Alberts, D. S., Horne, K., Phillips, J. G., Peng, Y. M., and Roe, D. J. (1987). Plasma pharmacokinetics of cyclophosphamide and its cytotoxic metabolites after intravenous versus oral administration in a randomized, crossover trial. *Cancer Research* 10, 2723-6.
91. Suh, E. K., Yang, A., Kettenbach, A., Bamberger, C., Michaelis, A. H., Zhu, Z., Elvin, J. A., Bronson, R. T., Crum, C. P., and McKeon, F. (2006). p63 protects the female germ line during meiotic arrest. *Nature* 7119, 624-8.
92. Takai, Y., Matikainen, T., Jurisicova, A., Kim, M. R., Trbovich, A. M., Fujita, E., Nakagawa, T., Lemmers, B., Flavell, R. A., Hakem, R., Momoi, T., Yuan, J., Tilly, J. L., and Perez, G. I. (2007). Caspase-12 compensates for lack of caspase-2 and caspase-3 in female germ cells. *Apoptosis* 4, 791-800.
93. Thomson, A. B., Critchley, H. O., and Wallace, W. H. (2002). Fertility and progeny. *European Journal of Cancer* 12, 1634-44; discussion 1645-6.
94. Trasler, J. M. (2006). Gamete imprinting: setting epigenetic patterns for the next generation. *Reproduction, Fertility, and Development* 1-2, 63-9.
95. Trasler, J. M., Hales, B. F., and Robaire, B. (1986). Chronic low dose cyclophosphamide treatment of adult male rats: effect on fertility, pregnancy outcome and progeny. *Biology of Reproduction* 2, 275-83.

96. Tsai-Turton, M., Luong, B. T., Tan, Y., and Luderer, U. (2007). Cyclophosphamide-induced apoptosis in COV434 human granulosa cells involves oxidative stress and glutathione depletion. *Toxicological Sciences* 1, 216-30.
97. Uldall, P. R., Kerr, D. N., and Tacchi, D. (1972). Sterility and cyclophosphamide. *Lancet* 7752, 693-4.
98. van Attikum, H., and Gasser, S. M. (2005). The histone code at DNA breaks: a guide to repair? *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 757-65.
99. Wang, H., Wang, M., Wang, H., Bocker, W., and Iliakis, G. (2005). Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors. *Journal of Cellular Physiology* 2, 492-502.
100. Willers, J. M., and Sluis, E. (1975). The influence of cyclophosphamide on antibody formation in the mouse. *Annales d Immunologie* 3, 267-79.
101. Wyllie, A. H., Kerr, J. F., and Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology* 251-306.

## FIGURE LEGENDS

**Fig.1.** Detection of H2AX phosphorylation in oocytes of small ovarian follicles after *in vitro* exposures of cultured ovaries. PND4 CD-1 mouse ovaries were cultured and exposed to PM and fixed at certain time points after exposure. Fluorescent immunohistochemical detection of  $\gamma$ H2AX (red) was performed on cultured PND4 CD-1 mouse ovaries exposed on d4 of culture to different concentrations of PM (a-c, f, g, i, j), 2 Gy ionizing radiation (IR, d) or nothing (e,h) and fixed after 24h (a-g) or 8d (h-j). Nuclear staining was done with Hoechst (blue). Negative control (c) was stained without primary antibody, Scale bar = 10  $\mu$ m. (b) is an enlargement of (a).

**Fig.2.** Time course of  $\gamma$ H2AX foci formation in oocytes of (A) primordial and (B) small primary follicles in response to *in vitro* PM exposure. PND4 CD-1 mouse ovaries were exposed to 3 or 10  $\mu$ M PM on d4 of culture and fixed 6-48 h later. Following histology and fluorescent immunohistochemistry, numbers of  $\gamma$ H2AX foci were counted in all follicles of 2 sections from each ovary. Values represent the percent of follicles with 5 or more foci/oocyte. \* = significant difference from controls, § = significant difference between PM concentrations,  $p < 0.05$ ; 2-4 ovaries in each of 2-3 separate experiments.

**Fig.3.** Western blot detection of phospho-H2AX and H2AX (15 kDa) in cultured PND4 mouse ovaries and adult mouse testes. Proteins were extracted from PND4 mouse ovaries cultured for 24 h; in the absence (lane 1) or presence (lane 2) of 10  $\mu$ M PM, and from adult mouse testis homogenate (lane 3) or isolated histones from testes (lane 4) were separated on a 15% SDS-polyacrylamide gel, transferred to nitrocellulose, and probed sequentially for phospho- H2AX and total H2AX.

**Fig.4.** Primordial ovarian follicle numbers in cultured PND4 CD-1 mouse ovaries are depleted after co-exposure to PM and Wortmannin (Wtn). Isolated PND4 mouse ovaries were exposed to 0.3 or 1  $\mu$ M PM on d4 of culture, followed by the addition of Wtn 8 h later. Ovaries were fixed for follicle counts 48 h after the start of PM exposures. Follicle numbers per ovary were compared between conditions for each PM concentration by Student's T-test. Values are means  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0.05$ , significant difference from controls, NS= not significant; n = 3-4 ovaries per condition per experiment in 3 separate experiments.

**Fig.5.** Small ovarian follicle numbers in cultured PND4 CD-1 mouse ovaries are reduced by PM exposures *in vitro*. Isolated PND4 mouse ovaries were exposed to PM *in vitro* on d4 of culture and fixed 8 days later. Classification and counting of follicles was performed in every 12<sup>th</sup> section of each ovary as described in Methods. Values are means  $\pm$  SEM, \* = significant difference from controls, ANOVA, \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , n = 8-11 ovaries per condition in 4 different experiments.

**Fig.6.** Percent of oocytes of small ovarian follicles with 5 or more  $\gamma$ H2AX foci per oocyte after *in vitro* PM exposures of cultured mouse ovaries. Immunofluorescent detection of  $\gamma$ H2AX foci was performed on sections of ovaries exposed in culture to 0.1-3  $\mu$ M PM and cultured for another 24 h or 8 d, as described in Methods. Quantification of  $\gamma$ H2AX foci was performed by visually counting numbers of foci per oocyte. Values represent percent  $\pm$  SEM of (A) primordial and (B) small primary follicles which had  $\geq 5$   $\gamma$ H2AX foci/oocyte, and significance was determined by ANOVA, \* =  $p < 0.05$ , significant difference from controls, 6-10 ovaries per condition in 3-4 different experiments.

**Fig.7.** Small ovarian follicle numbers in cultured PND4 Sprague-Dawley rat ovaries are reduced following exposures to PM. Ovaries were exposed to PM *in vitro* on d4 of culture and cultured for an additional 8 days before fixation and histological processing. Follicle counting was performed on every 12<sup>th</sup> section of each ovary. Values represent means  $\pm$  SEM, significance was determined by ANOVA. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.05$  significant difference from controls,  $n = 7-9$  ovaries per condition in 4 separate experiments.

**Fig.8.** Detection and quantification of  $\gamma$ H2AX foci in oocytes of small ovarian follicle of cultured PND4 Sprague-Dawley rat ovaries exposed to PM *in vitro*. Immunohistochemistry was performed for  $\gamma$ H2AX on ovarian sections of cultured rat ovaries (A-C) 24 h after exposure to PM as described in Methods. Quantification of  $\gamma$ H2AX foci was performed by counting numbers of foci in all oocytes 24 h after *in vitro* exposure to PM. Values represent the percent  $\pm$  SEM of (D) primordial and (E) small primary follicles with  $\geq 5$   $\gamma$ H2AX foci/oocyte, \* =  $p < 0.05$ , significant difference from controls,  $n = 6-8$  ovaries per condition in 3-4 separate experiments. Scale bar = 10  $\mu$ m.

**Fig. 9.** Ovarian follicle populations in adult CD-1 mice following a single exposure to cyclophosphamide. Healthy (A,D) primordial, (B,E) small primary and (C-F) antral follicle numbers (A-C) 24 h and (D-F) 8 days after a single ip injection of 75-250 mg CPA/kg bdw. Classification and counting of follicles was performed in every 20<sup>th</sup> section of each ovary as described in Methods. Values represent means  $\pm$  SEM, significance was determined by ANOVA, \* =  $p < 0.05$ , significant difference from controls,  $n = 9-10$  ovaries per treatment group in 3 separate experiments for each time point.

**Table 1. Body and tissue weights of female CD-1 mice sacrificed following a single ip injection of cyclophosphamide.**

<b>Time point</b>	<b>Exposure (mg CPA/kg body weight)</b>	<b>Body (g)</b>	<b>Liver (g)</b>	<b>Spleen (g)</b>	<b>Kidney (g)</b>
24 hours	Saline	23 ± 0.8	1.29 ± 0.04	0.095 ± 0.006	0.38 ± 0.01
	75	24 ± 0.7	1.30 ± 0.05	0.071 ± 0.006	0.36 ± 0.01
	150	23 ± 0.8	1.24 ± 0.05	0.067 ± 0.005*	0.36 ± 0.01
	250	23 ± 0.7	1.27 ± 0.04	0.055 ± 0.002*	0.39 ± 0.02
8 days	Saline	25 ± 0.6	1.29 ± 0.02	0.093 ± 0.004	0.37 ± 0.01
	75	25 ± 0.5	1.28 ± 0.05	0.104 ± 0.006	0.38 ± 0.02
	150	24 ± 0.9	1.41 ± 0.05	0.141 ± 0.01*	0.39 ± 0.01
	250	24 ± 0.8	1.45 ± 0.03*	0.170 ± 0.01*	0.40 ± 0.01

Values are means ± SEM.

\* represent statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between treated groups and saline control for each tissue and time point.

Figure 1

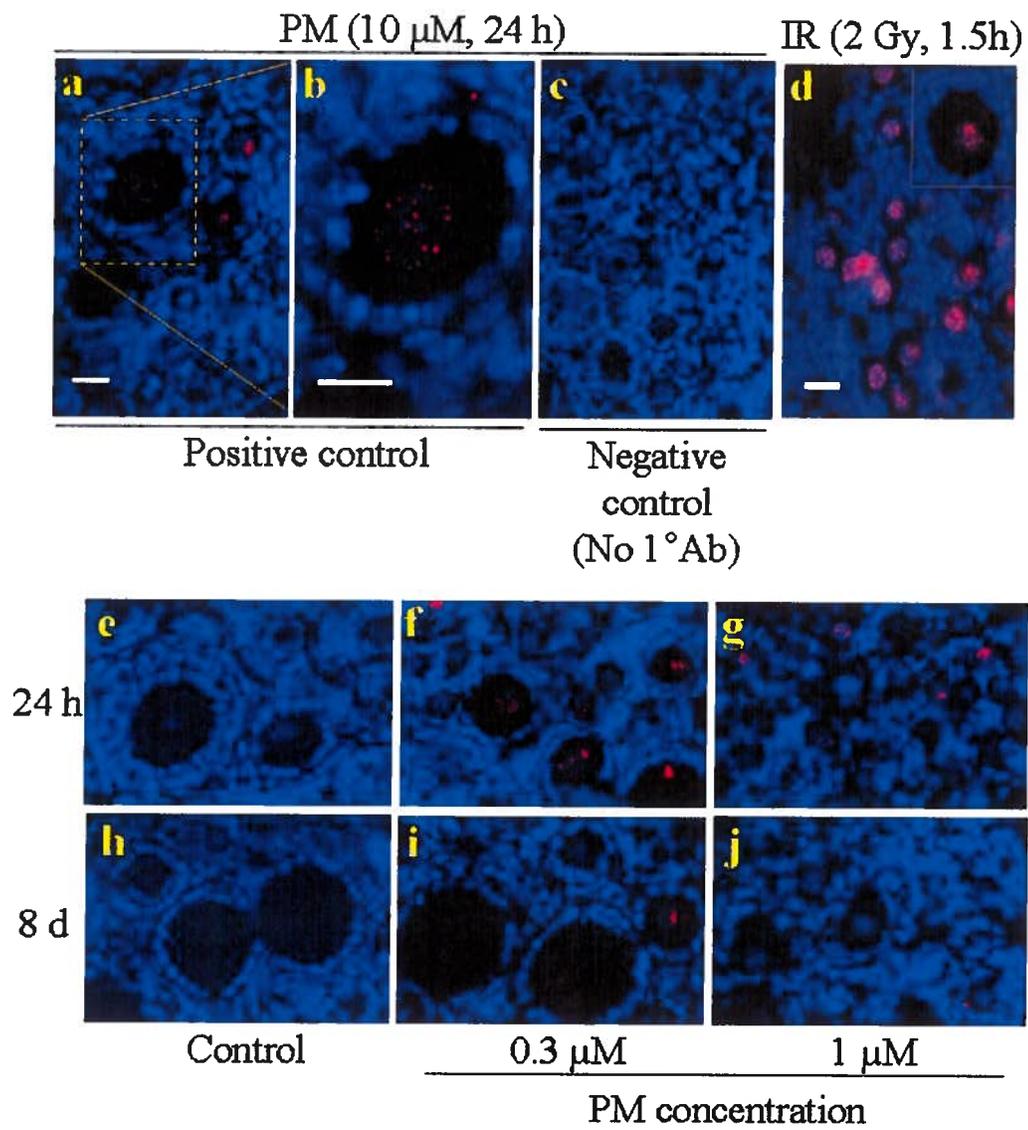


Figure 2

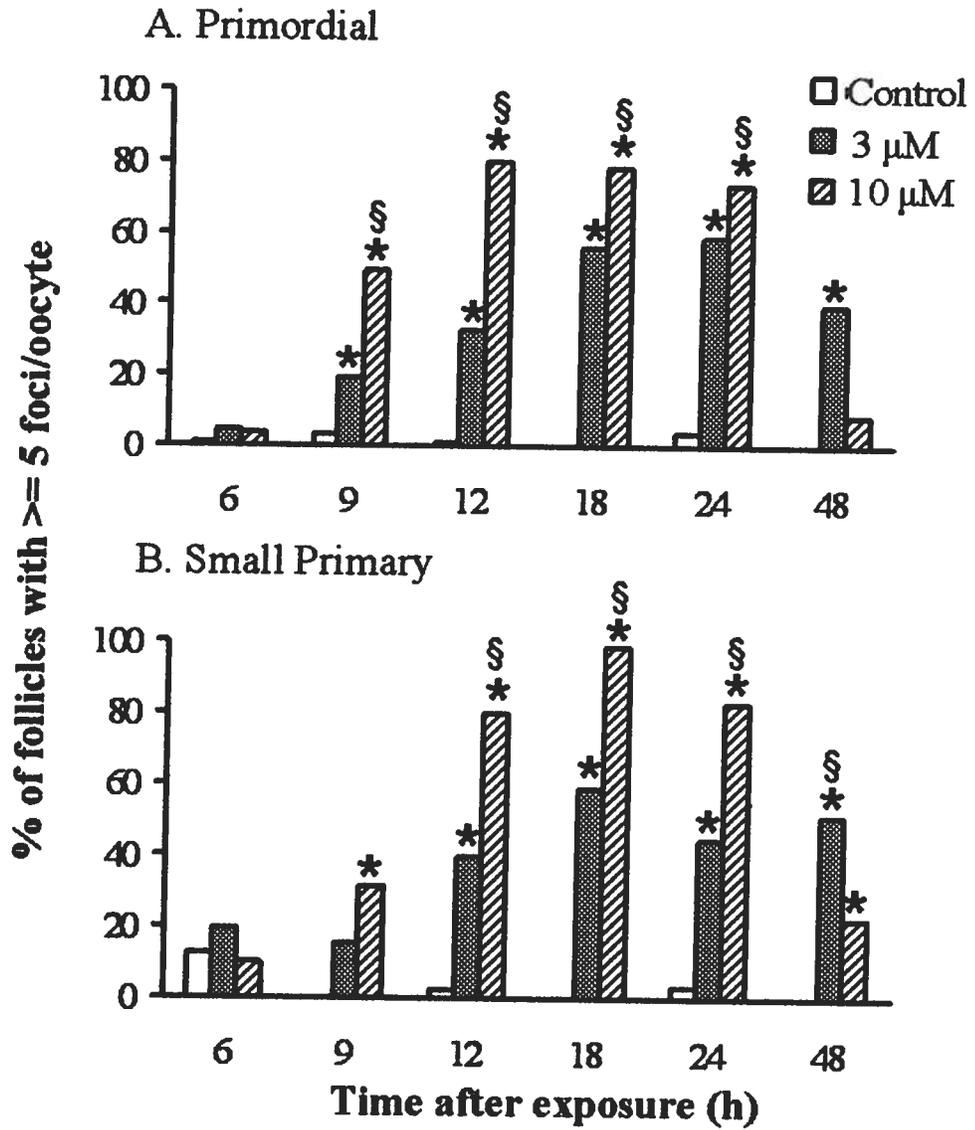


Figure 3

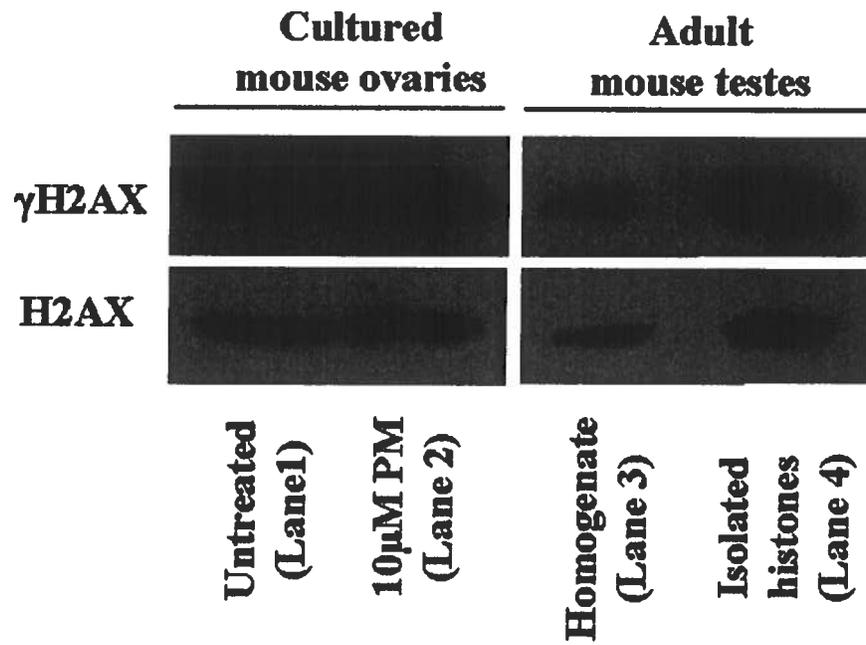


Figure 4

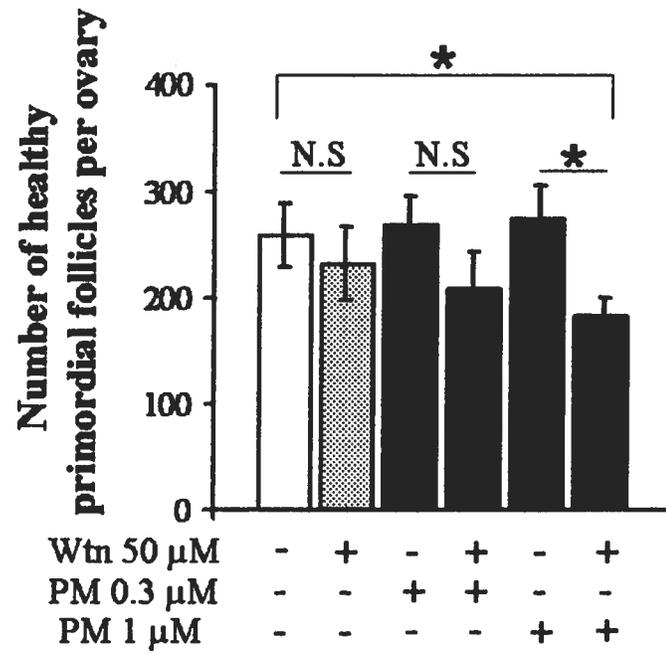


Figure 5

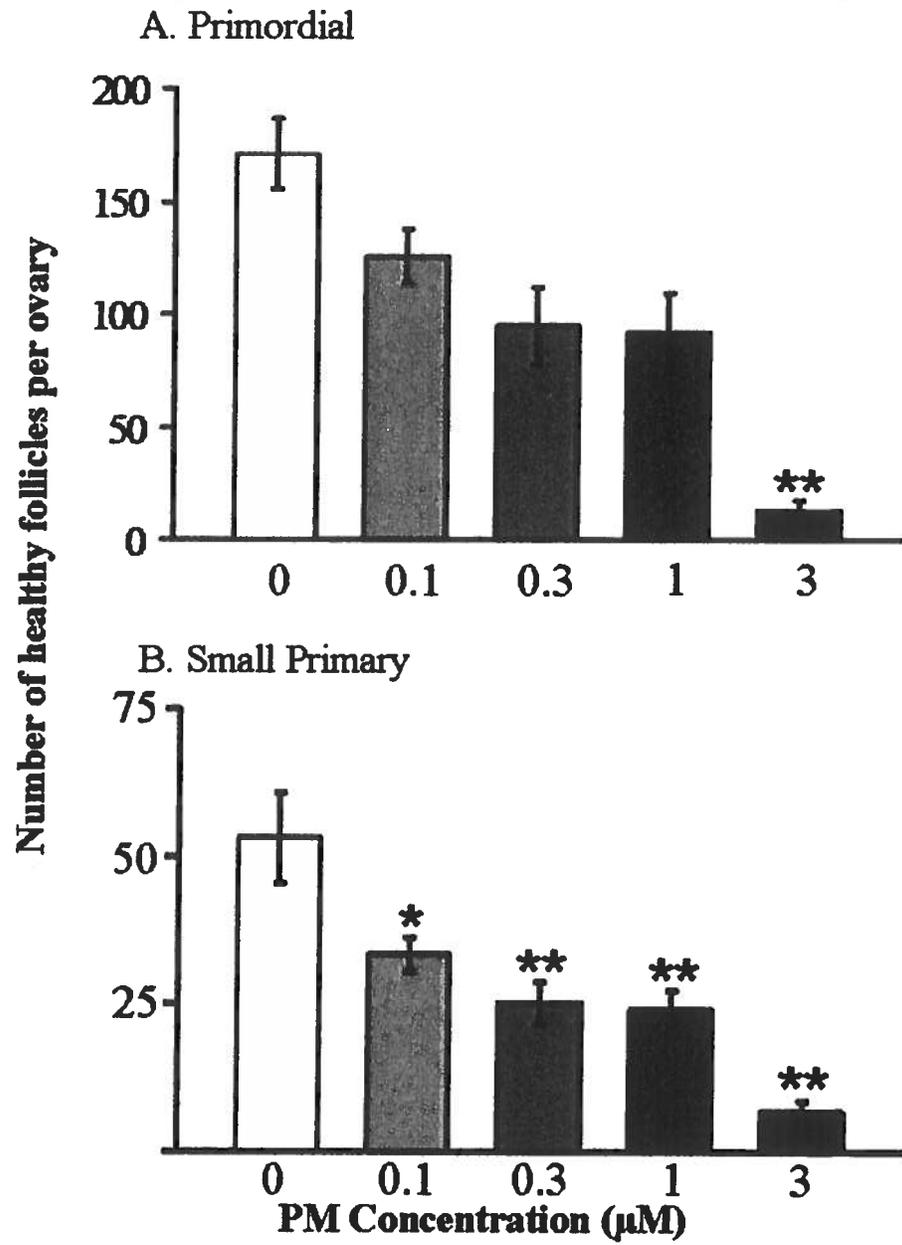


Figure 6

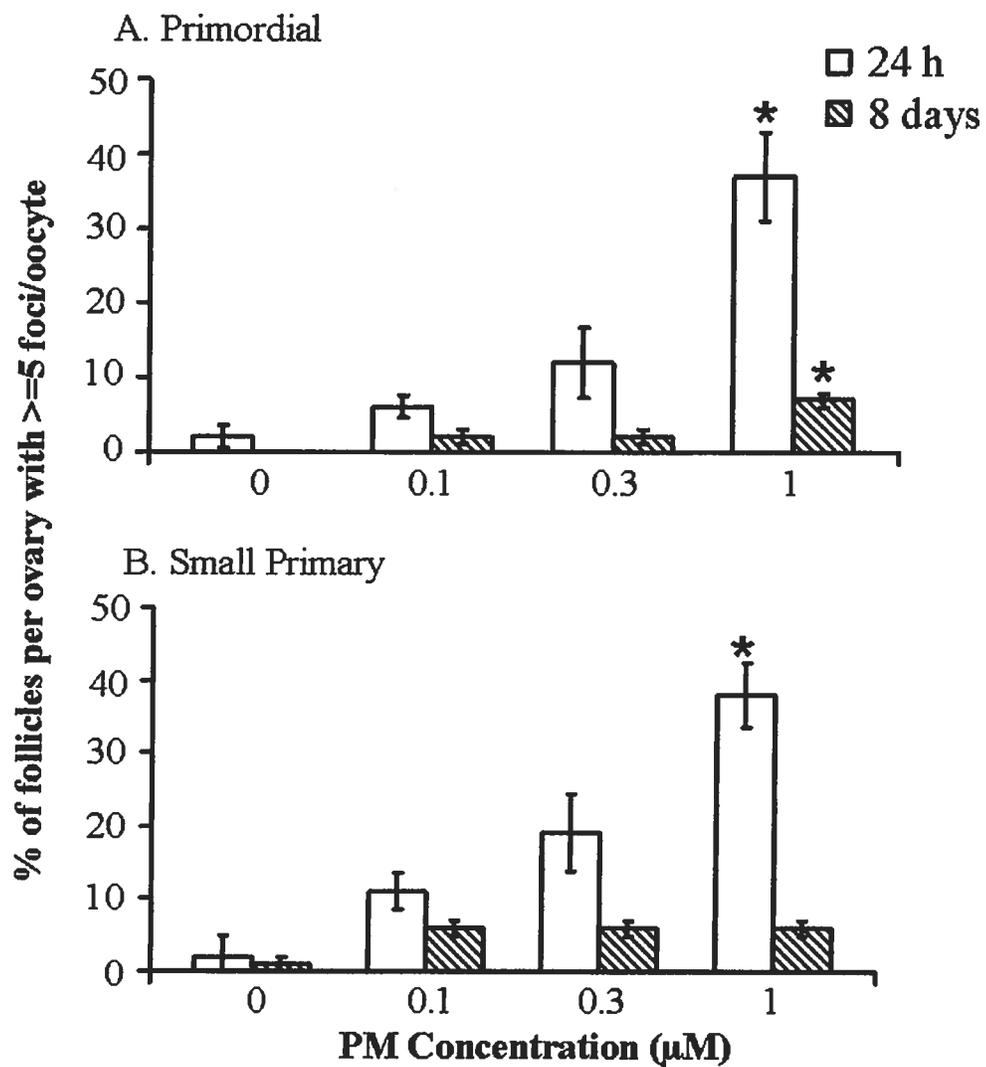


Figure 7

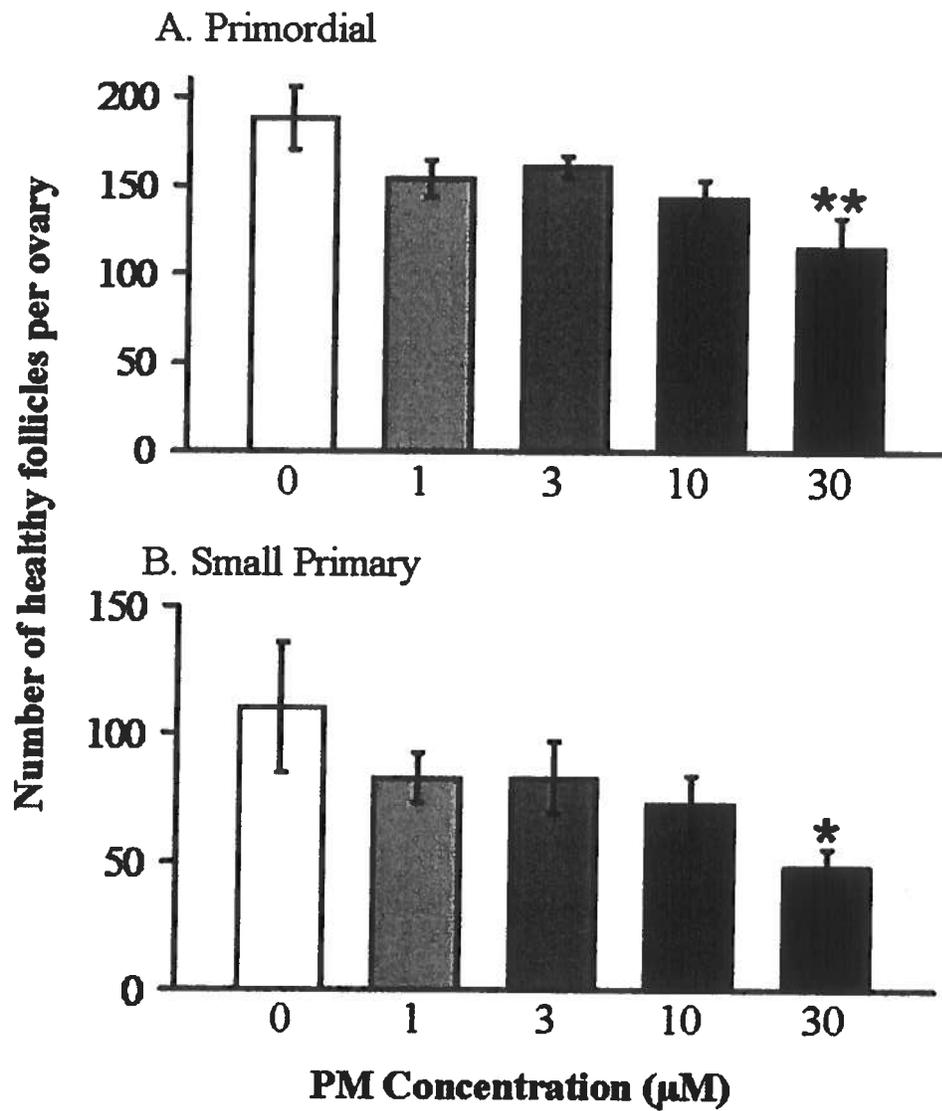


Figure 8

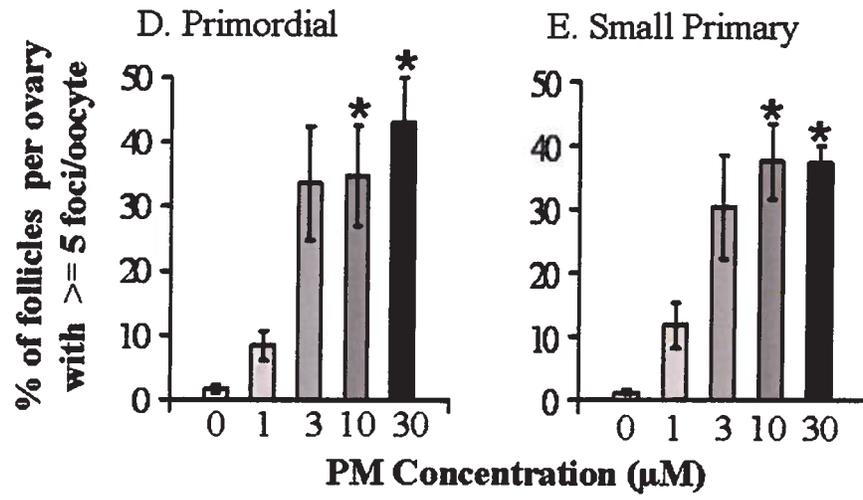
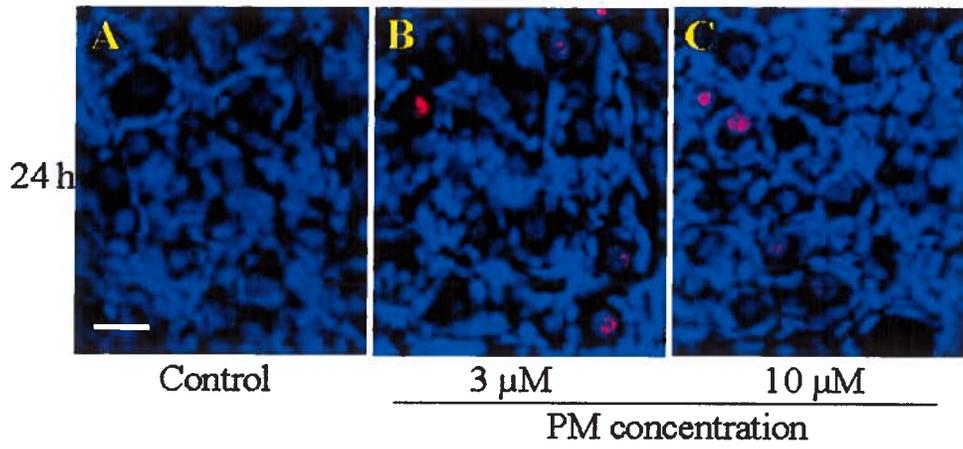
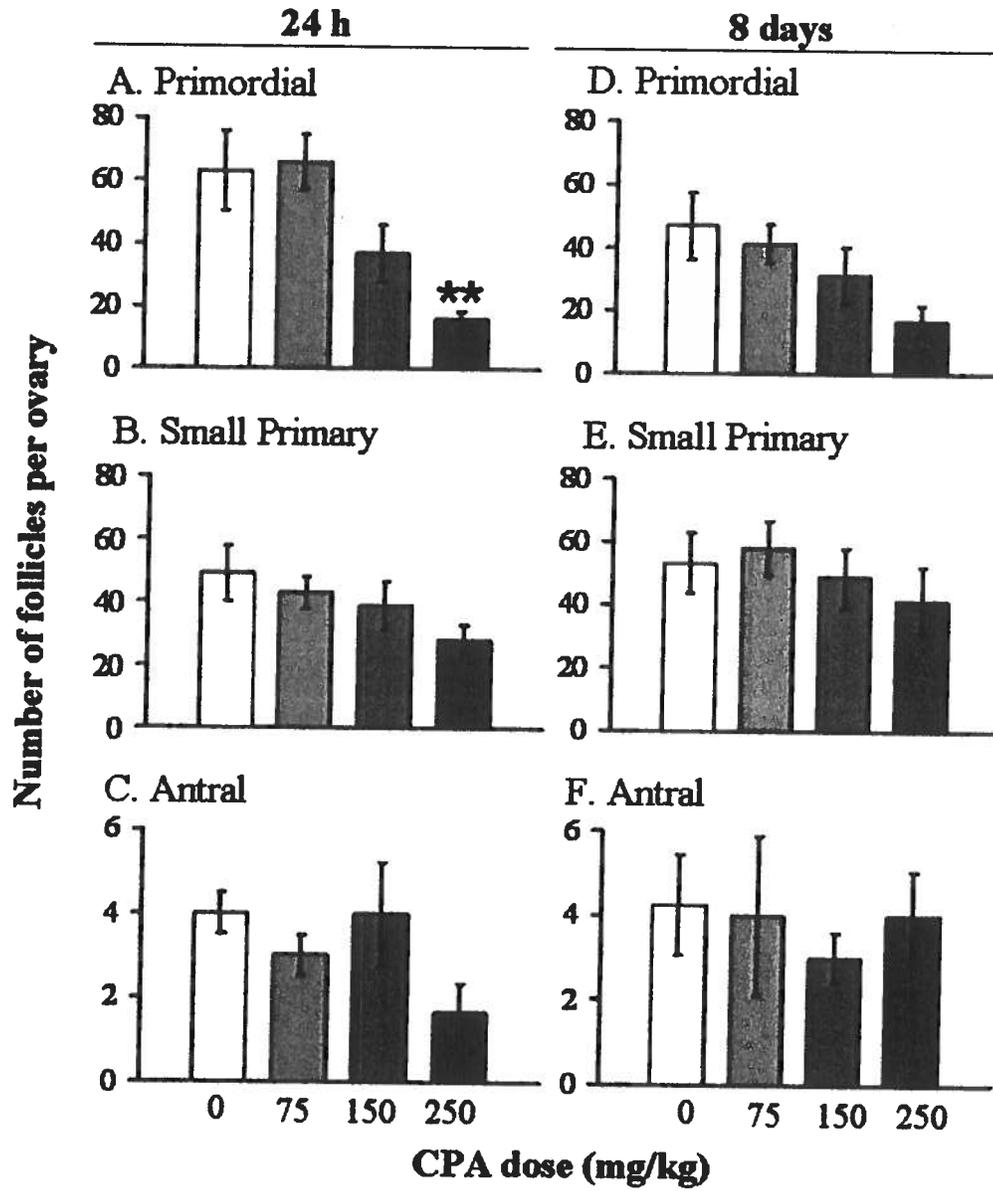


Figure 9



## Discussion générale

Le système *in vitro* a plusieurs avantages, pour certains types d'expériences, par rapport aux expériences *in vivo* mais aussi des limitations. Premièrement, les ovaires de rongeurs nouveau-nés contiennent un grand nombre de follicules primordiaux comparé aux ovaires adultes (Hirshfield, 1991; Rajah *et al.*, 1992). Leur nombre (1 millions lors de la naissance et des milliers chez l'adulte) est un facteur important pour quantifier les effets ou changements mineurs qui ne seraient pas observé chez les adultes où les follicules sont dispersés à travers l'ovaire (Faddy *et al.*, 1992; Faddy, 2000; Encha-Razavi et Escudier, 2003). Le système de culture nous permet d'effectuer des expériences avec des inhibiteurs et/ou différents types d'expositions (un seul agent ou plusieurs mélangés) pour déterminer leurs effets sur les ovaires et follicules sans les interactions et réactions *in vivo* (Devine *et al.*, 2002; Desmeules, 2006; Desmeules et Devine, 2006). Nous pouvons étudier différentes espèces sans avoir des différences d'absorption ou de métabolisme hépatique et d'autres organes, qui peuvent affecter les résultats *in vivo*. Même si le système de culture à plusieurs avantages, il y a aussi des limites associées à ce système. Le manque de FSH *in vitro* limite les stades folliculaires dans les ovaires cultivés car les quelques petits secondaires qui sont présents ne peuvent pas continuer leurs développements puisqu'ils n'ont pas les stimulations hormonales nécessaires (Hirshfield, 1991; Desmeules, 2006). Aussi, le petit nombre de ces stades plus matures limite les études possibles puisque nous n'avons pas assez pour faire des statistiques fiables. Une autre limitation du système est la manière non physiologique dont les xénobiotiques pénètrent l'ovaire. Lors de la culture l'absorption est via l'épithélium comparé à *in vivo* où l'ovaire est exposé via les vaisseaux sanguins. Malgré ces limitations dont nous sommes conscient, les cultures peuvent nous aider à répondre à des questions que le système *in vivo* ne permettrait pas.

La réduction du nombre de follicules primordiaux *in vitro* après une exposition aigue à la MP (Petrillo *et al.*, en préparation) est en accord avec nos résultats déjà publiés (Desmeules et Devine, 2006). Les expositions de chaque étude ont été effectués à deux points de temps différents soit au jour 0 soit au jour 4 de culture. Cela nous

permettaient d'exposer majoritairement des follicules primordiaux ou plusieurs stades folliculaires, respectivement. Le nombre total de follicules primordiaux diminue pendant la culture car il y a une vague de mort naturelle des follicules pendant les premiers 2-3 jours du développement ovarien (Hirshfield, 1991; Rajah *et al.*, 1992; Pepling, 2006). Alors, commencer la culture au jour 4 de culture nous permet d'avoir un nombre de follicules plus stables lors de l'exposition (Desmeules, 2006). Le temps d'exposition est un important facteur à considérer lorsqu'on veut exposer certains stades folliculaires, mais les effets de la MP étaient pareils pour les deux types d'expériences.

Lors des expériences *in vitro*, les follicules petits primaires semblent plus sensibles aux faibles concentrations de MP que les primordiaux. Même la plus faible concentration de MP testée (0,1  $\mu\text{M}$ ) a significativement réduit le nombre de follicules petits primaires (Petrillo *et al.*, en préparation). Cela pourrait être lié à un plus grand nombre de follicules en croissance présents lors de l'exposition au jour 4 de culture au lieu du jour 0, donnant plus de puissance pour les statistiques. L'autre possibilité est que certains des follicules primordiaux affectés par l'exposition n'ont pas survécu à la transition aux stades petits primaires causant une réduction de cette population. L'activation des follicules primordiaux requiert beaucoup de facteurs qui sont encore inconnus (Nilsson et Skinner, 2001; Fortune, 2003; Skinner, 2005). Il est possible que la transition d'un stade folliculaire quiescent (follicule primordiaux) à un stade métaboliquement plus actif ne puissent pas être complété à cause des dommages à l'ADN qui interfèrent avec la transcription des gènes. Lors de nos expériences *in vivo*, nous avons noté que le nombre de follicules primordiaux mais pas de petits primaires a été réduit après une exposition au CPA *in vivo*. Peut-être les follicules primordiaux sont recrutés plus efficacement *in vivo*, afin de mieux maintenir les populations de petits primaires, donc les effets sur les petits primaires ne sont pas détectables *in vivo*.

Le CPA détruit les cellules très prolifératives tel que les cellules cancéreuses. Ce n'est pas surprenant que les cellules de la granulosa des grands follicules soient affectées puisqu'elles se multiplient rapidement (Peters, 1969; Hirshfield, 1991). Nous avons trouvé que les cellules de la granulosa des follicules plus matures (grands

primaires et petits secondaires) de souris CD-1 et rattes Sprague-Dawley en culture étaient pycnotiques. D'autres études chez les rattes ont montré que les follicules antraux et leurs cellules de la granulosa étaient les plus affectés et étaient détruits via l'apoptose chez ces rongeurs (Jarrell *et al.*, 1987; Ataya *et al.*, 1989; Lopez et Luderer, 2004). Tsai-Turton *et al.*, (2007) ont montrés que les expositions de cellules COV434 (lignée cellulaire de la granulosa humaine) au 4-HC ont induit l'apoptose via le stress oxydatif. Nous avons trouvé que le type cellulaire affecté dépendait du stade folliculaire. Chez les souris CD-1, les cellules de la granulosa des follicules primordiaux et petits primaires semblent saines mais leurs ovocytes sont pycnotiques après une exposition à la MP *in vitro* et le CPA *in vivo* (Petrillo *et al.*, en préparation; Desmeules et Devine, 2006). Il est surprenant que les ovocytes des follicules primordiaux soient aussi affectés, étant donné qu'ils sont dans un état quiescent arrêté en méiose. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénomène. Les cellules de la granulosa des follicules primordiaux ne peuvent pas protéger l'ovocyte aussi bien que celles des stades plus matures puisqu'elles sont relativement inactives, manquent plusieurs caractéristiques des cellules de la granulosa et sont peu nombreuses (seulement une couche). La quiescence métabolique de l'ovocyte pourrait le rendre plus sensible. La conformation des chromosomes pendant l'arrêt en méiose pourrait rendre l'ADN des ovocytes plus vulnérables aux effets génotoxiques que d'autres cellules. Nous ne savons pas non plus si tous les facteurs nécessaires pour la réparation de l'ADN sont présents ou actifs dans les ovocytes des petits follicules. Les mécanismes responsables pour la sensibilité particulière des ovocytes des petits follicules sont à étudier. Il serait important d'effectuer des expériences exposant des ovocytes de follicules (follicules primordiaux et plus matures, et ovocytes seuls) à plusieurs agents génotoxiques afin de déterminer si les cellules de la granulosa peuvent protéger les ovocytes contre les effets néfastes. En exposant les ovaires et les follicules à différents agents, dont les dommages qu'ils induisent sont connus, pourrait aider à découvrir si certains facteurs de voies de réparations sont présents. En ajoutant des inhibiteurs des facteurs impliqués dans des voies de réparation, on pourrait aussi élucider s'ils sont actifs.

Nos résultats ont montrés des effets similaires entre la ratte et la souris; les

mêmes types cellulaires affectés et les effets rapides et dépendants de la dose. Par contre, les ovaires de rattes nécessitaient une concentration de MP 10 fois plus forte pour induire la perte significative des follicules primordiaux et petits primaires. Les différences de sensibilité entre les rongeurs ont été observées pour le CPA et le VCD *in vivo* mais nous sommes les premiers à montrer des effets d'une exposition à la MP sur les ovocytes des petits follicules chez la ratte (Plowchalk et Mattison, 1992; Thompson *et al.*, 2005). Nos résultats suggèrent que les différences de sensibilité au CPA ou d'autres ovotoxiques dépendent des différences physiologiques (ex. antioxydants) de l'ovaire et les enzymes et molécules de détoxification de chaque espèce (rongeurs et humains). Le GSH est une molécule importante pour la détoxification du CPA (Gamcsik *et al.*, 1999; Lopez et Luderer, 2004). Le CPA diminue le taux ovarien de GSH chez les rattes mais cet effet n'est pas responsable de la destruction des follicules antraux chez les rattes (Lopez et Luderer, 2004). Toutefois, la diminution de GSH et le stress oxydatif ont été impliqués dans l'apoptose de la lignée cellulaire (COV434) des cellules de la *granulosa* (Tsai-Turton *et al.*, 2007). D'autres études analysant le taux de GSH, des enzymes de détoxification (ex. *mEH*), et le stress oxydatif devraient être effectués chez d'autres rongeurs et l'humain pour tester leurs rôles dans la toxicité ovarienne du CPA chez ces espèces. Les mesures utilisées incluent (1) analyses histologiques (comptage de follicules), (2) quantification d'hormones (ex. œstrogène) avant et après l'exposition pour déterminer si les follicules antraux sont affectés, (3) quantification des changements d'expression de facteurs impliqués dans la maturation et santé des follicules par RT-PCR ou immunobuvardage de type western.

La dose de CPA a un effet sur la sévérité de la perte des follicules ovariens. Chez les humains, de faibles doses (100-200 mg/kg CPA) sont données par la voie orale pendant des semaines selon les besoins immunosuppresseur et quelques traitements anticancéreux. Des doses plus fortes (500-600 mg/kg CPA) sont injectées (intraveineux), espacées de quelques semaines, pour traiter la majorité des cancers et avant une transplantation de moelle osseuse (Moore, 1991; Anderson *et al.*, 1995). L'exposition au CPA pendant les traitements anticancéreux peut réduire la population des follicules ovariens. Cette réduction se manifeste par une cyclicité irrégulière, l'aménorrhée et

même une ménopause précoce (Anderson *et al.*, 1995; Meirrow, 1999). Plus la dose de CPA est élevée plus le risque de séquelles augmente (Meirow et Nugent, 2001). Les expositions au CPA chez les souris dans nos expériences étaient i.p. et aiguë. Comparés aux humains, les rongeurs sont exposés à des doses plus faibles et moins fréquentes. Idéalement, d'autres études comparant la toxicité de la MP/CPA et d'autres toxiques dans plusieurs souches de rongeurs et chez les humains seraient nécessaires pour découvrir quelle espèce est le meilleur modèle pour étudier la toxicité ovarienne pour les humains. Un effet dose-réponse du CPA chez chaque espèce a été montré (Jarrell *et al.*, 1987; Plowchalk et Mattison, 1992; Anderson *et al.*, 1995). Les expériences pour déduire ces informations chez les humains seraient *in vitro* puisque des études *in vivo* chez les humains est impossible. Il est très difficile d'avoir accès aux tissus sains d'ovaires humains. Il est possible de cultiver les morceaux d'ovaires humains mais ces expériences nécessitent l'ajout d'hormones et autres facteurs pour préserver le tissu et induire le développement des follicules ce qui affecte les résultats (Hovatta, 2004; Scott *et al.*, 2004). Il serait aussi important d'obtenir des échantillons provenant de jeunes femmes car les follicules ne sont pas distribués d'une façon homogène dans les ovaires et leur nombre diminue en fonction de l'âge.

Pour l'instant nous sommes limités dans nos conclusions et extrapolations pour les humains puisque nos données sont majoritairement *in vitro* et nous avons utilisé un seul agent. Toutefois, les effets de d'autres types d'expositions ovotoxiques pourraient être similaires. Étudier d'autres agents qui causent la perte de follicule primordial (ex. VCD, DMBA, BaP) ou qui sont connus pour induire des dommages à l'ADN (ex. DMBA), pourrait élucider des mécanismes d'action similaires (ex. des DSBs) pour ces agents. D'ailleurs, nous avons observé des DSBs dans des ovaires de rongeurs (souris et ratte) exposés au VCD *in vitro* (décrit en détail dans l'Annexe). Ces données mises ensemble pourraient permettre d'identifier des expositions ovotoxiques et aider à diagnostiquer les femmes qui ont un risque accru envers de problèmes de fertilité et de ménopause précoce.

La sensibilité au CPA entre les souches de souris est variable. Nous avons

trouvé chez les souris CD-1 adulte que la dose de 250 mg/kg était nécessaire pour réduire le nombre de follicules primordiaux significativement. Meirow *et al.*, (1999) ont trouvé une telle réduction chez les souris Balb/c 7 jours après une exposition à 75 mg/kg CPA. Plowchalk et Mattison, (1992) utilisant des souris C57BL/6 ont trouvé que la ED50 (dose effective) du CPA était de 101 mg/kg pour éliminer les follicules primordiaux. Des expériences sur plusieurs souches devront être effectuées pour comparer les effets dans les mêmes conditions expérimentales. Le comptage de follicules devra être aussi effectué d'une manière similaire puisque chaque étude a utilisé ses propres critères et méthodes. L'âge des animaux est un autre facteur très important qui peut affecter le nombre de follicules ovariens présents et les changements induits. Des expériences utilisant des souris et/ou rattes de différents groupes d'âges (~21 et 60 jours) seraient idéales puisque les populations de follicules présents sont différents à ces âges. Idéalement deux souches de chaque espèce serait utilisées pour être capable de comparer les résultats non seulement entre les espèces, mais aussi entre les souches et les âges.

Les études *in vivo* nous permettrons également de confirmer le lien entre le temps de l'exposition au CPA et les effets chez la progéniture qui a été suggéré par Meirow *et al.*, (2001). Varier l'intervalle entre l'exposition et l'accouplement nous aidera à déterminer les effets sur les stades folliculaires spécifiques. Un premier point de temps (accouplement 6 semaines après l'exposition) serait nécessaire pour déterminer si les follicules primordiaux contenant des dommages génomiques se sont développés et transmis à la progéniture, causant des malformations ou d'autres conditions. D'autres points de temps (ex. accouplements 3 et 6 mois après l'exposition) et les analyses de comptage de follicules et taux d'hormones, serait pour déterminer si la population de follicules a été diminuée assez pour affecter la fertilité ou induire une ménopause précoce et si les follicules qui persistent sont de bonnes qualités.

Il est important de développer des techniques qui préservent la fertilité avant les traitements avec des agents anticancéreux, surtout chez les jeunes patientes. On dispose peu d'informations sur la santé/qualité des gamètes qui sont présents après ces

traitements. Une technique courante pour préserver la fertilité est la cryopréservation d'embryons après la fécondation *in vitro* (FIV). Puisque la cryopréservation d'ovocytes est une technique expérimentale, une femme qui désire préserver sa fertilité avant de subir des traitements anticancéreux doit faire féconder ses ovocytes pour préserver des embryons. Cette étape requiert un donneur de sperme, ce qui n'est pas nécessairement possible pour les jeunes femmes/filles ou les femmes célibataires. Les autres techniques tels que la cryopréservation d'ovaire suivit d'une auto transplantation ou maturation *in vitro* d'ovocyte (MIV), sont encore aux stades expérimentales et inefficaces chez les humains (Sonmezer et Oktay, 2006; Oktay *et al.*, 2007; Blumenfeld, 2007). L'utilisation des agonistes de GnRH pendant la chimiothérapie a été suggérée pour protéger la réserve ovarienne en ralentissant le recrutement et la croissance des follicules primordiaux qui pourraient être affectés/détruits (Blumenfeld *et al.*, 1996; Blumenfeld, 2007). Une étude épidémiologique chez des jeunes femmes souffrant du lymphome non hodgkinien a trouvé que l'administration d'un agoniste de la GnRH (Triptorelin) en combinaison avec un traitement anti-cancéreux réduisait significativement le risque d'insuffisance ovarienne précoce (Huser *et al.*, 2008). Mais d'autres études n'ont pas obtenu les mêmes résultats et critiquent ces études (Oktay *et al.*, 2007; Huser *et al.*, 2008; Oktay et Sonmezer, 2008; Oktay *et al.*, 2009). Les différences entre ces études pourraient être attribuées aux différents agents anti-cancéreux utilisés, les différents agonistes/antagonistes de GnRH utilisés, la durée et les types de traitements utilisés et les types d'études épidémiologiques. Meiorow *et al.*, (2004) ont suggéré que l'antagoniste cetrorelix réduirait significativement la perte de follicules primordiaux chez les souris Balb/c exposées au CPA (0, 50 ou 75 mg/kg). Par contre une autre étude de Danforth *et al.*, (2005) utilisant le CPA et cetrorelix a trouvé que l'antagoniste lui-même peut causer la perte de follicule primordiaux suggérant que les antagonistes GnRH pose plus de risque que les agonistes (Gupta et Flaws, 2005). Alors, l'utilisation des agonistes/antagonistes de GnRHs nécessite encore plus d'études pour conclure définitivement chez les humains si ces techniques de protection sont valables. Le *sphingosine-1-phosphate* (S1P), un métabolite et inhibiteur des céramides, a aussi été suggéré pour protéger les follicules primordiaux pendant les traitements anti-cancéreux. Les céramides sont une famille de lipides essentiels pour la voie de signalisation

de l'apoptose (Kim *et al.*, 1999; Perez *et al.*, 2005). Deux études chez les animaux ont suggéré que le SIP et la céramide peuvent moduler les effets ovotoxique d'un agent anti-cancéreux, doxorubicine, et la radiation ionisante (Tilly et Kolesnick, 2002), mais plus de recherche est nécessaire avant son utilisation chez les femmes (Jurisicova *et al.*, 2006). Peu importe la voie de protection empruntée, la population des follicules primordiaux préservés n'est pas nécessairement protégée contre des dommages génotoxiques induits par les traitements. Avant que ces techniques soient présentées aux femmes, des investigations supplémentaires chez les animaux sont nécessaires pour déterminer si les follicules restants sont de bonnes qualités.

La quantification des foyers  $\gamma$ H2AX est reconnue comme la mesure la plus fiable et sensible pour détecter et quantifier les DSBs (Sedelnikova *et al.*, 2002; Pilch *et al.*, 2003; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004; Srivastava *et al.*, 2008). Ichijima *et al.*, (2005) ont observé que la phosphorylation de l'H2AX dans les cellules HeLa est présente dans la phase M lorsqu'il n'y a pas de dommages à l'ADN. Des foyers  $\gamma$ H2AX sont formés pendant des événements physiologiques impliquent la formation de DSBs; échange de chromatide soeur durant la méiose (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004) et la recombinaison V(D)J (Srivastava *et al.*, 2008). Nous croyons que les foyers  $\gamma$ H2AX dans les ovocytes (surtout des petits follicules) sont dus aux dommages à l'ADN. Les ovocytes quiescents des follicules sont arrêtés en prophase I de la méiose et reprennent la méiose une fois ovulé. Donc les foyers  $\gamma$ H2AX que nous observons ne peuvent pas être attribués à la méiose. La recombinaison V(D)J est un événement strictement présent chez les lymphocytes donc les foyers dans les oocytes ne peuvent pas être causés par ce phénomène.

Nous avons observé que l'augmentation du nombre des foyers  $\gamma$ H2AX est lié à la concentration d'un agent qui endommage l'ADN après différents types d'expositions (Pettillo *et al.*, en préparation). Suh *et al.*, (2006) et Hanoux *et al.*, (2007) ont aussi observé une augmentation des foyers  $\gamma$ H2AX dans des ovocytes de souris exposés à la RI, une exposition connu pour indure les DSBs. Ils ont aussi noté que beaucoup d'ovocytes de follicules étaient foncés (morts) ou marqués par *terminal*

*deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL, marqueur de l'apoptose). De plus, Hanoux *et al.*, (2007) ont remarqué que les ovocytes des follicules primordiaux avaient beaucoup moins de marquage de TUNEL et caspase-3 comparé aux ovocytes dont les cellules de la granulosa ont été enlevé. Ils ont observé que le marquage des foyers  $\gamma$ H2AX dans les ovocytes n'était pas co-localisé avec le marquage de casapase-2L (partie de la famille des enzymes qui induit l'apoptose). Une autre étude exposant des ovocytes à une forte concentration de methotrexate (10  $\mu$ g/ml), a noté que les caspases -2, -3, -12, sont important dans la destruction des ovocytes et la population des follicules primordiaux via l'apoptose (Takai *et al.*, 2007). Ces études (Suh *et al.*, 2006; Takai *et al.*, 2007; Hanoux *et al.*, 2007) ont seulement observé l'activation des capases et le rôle de l'apoptose dans la perte des follicules peu de temps après une exposition à de fortes doses de IR ou methotrexate. Nous utilisons des concentrations plus faibles et réalistes comparés aux autres études qui montrent que l'apoptose est le mécanisme qui détruit les ovocytes et les follicules primordiaux. Nous croyons que les foyers  $\gamma$ H2AX que nous observons dans les ovocytes ne sont pas imputables à l'apoptose car le marquage de TUNEL dans les ovaires cultivés exposés à la MP est seulement dans les cellules de la granulosa des grands follicules et quelques petits follicules (Desmeules et Devine, 2006). De plus, les foyers  $\gamma$ H2AX dans les ovocytes étaient nombreux et ils étaient des points isolés. Le marquage de  $\gamma$ H2AX d'une cellule apoptotique est plus fort et partout dans le noyau. La différence de distribution du marquage de TUNEL dans les ovocytes exposés à la MP ou la RI (Petrillo *et al.*, en préparation ; Suh *et al.*, 2006) pourrait être dû au nombre de DSBs induits. Les foyers  $\gamma$ H2AX que nous observons dans les cellules de la granulosa des grands follicules seraient un résultat de l'apoptose et/ou des DSBs formés lors de l'exposition à la MP.

Afin de vérifier que le  $\gamma$ H2AX représente les DSBs dans les ovocytes, nous avons tentés d'utiliser des anticorps de d'autres facteurs (53BP1, Rad50, BRCA1) qui se retrouvent aux foyers avec le  $\gamma$ H2AX lors des DSBs (Shrivastav *et al.*, 2008). Malheureusement nous n'avons pas eue de succès, les anticorps étaient non fonctionnels et/ou leurs marquages étaient non-spécifiques (données non publiés). Nous

utilisons des tissus intacts et les autres études publiées utilisaient des cellules isolées ce qui pourraient être la raison pour laquelle nos expériences n'ont pas produit de résultats. De plus, les techniques utilisées avec des cellules isolées ne sont pas tous possibles avec des tissus. Néanmoins, la présence des foyers  $\gamma$ H2AX après une exposition à la MP ou la RI suggère que les follicules ovariens peuvent détecter des dommages à l'ADN comme les DSBs (Petrillo *et al.*, en préparation; Suh *et al.*, 2006). Nous pourrions détecter d'autres facteurs impliqués dans la réparation et/ou  $\gamma$ H2AX en utilisant des immunobuvardages de type western sur des ovaires cultivés frais. Il serait aussi intéressant d'étudier d'autres types de dommages et déterminer si d'autres voie(s) de réparation seraient activées.

La vitesse de formation et le nombre de DSBs dans des cellules dépendent de l'agent ovotoxique. La radiation ionisante induit des dommages directement à l'ADN de plusieurs lignées cellulaires (ex. CHO, SF-268) où les DSBs sont détectés 1 minute après une seule exposition (50-200 Gy) (Rogakou *et al.*, 1998). Staszewski *et al.*, (2008) ont exposés une lignée cellulaire (CHO) à différents agents alkylants (*methyl methanesulfonate* (MMS) et *N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine* (MNNG)) et aux UV. Ils ont trouvé que le nombre maximale de foyers  $\gamma$ H2AX était respectivement 8 et 12 h après une exposition au MMS, MNNG ou les UV. Nos résultats suggèrent que la formation des DSBs atteint un nombre maximal 18 à 24 h après l'exposition selon la concentration de MP utilisée. La différence entre l'exposition et le temps de détection dans nos expériences et celles de Staszewski *et al.*, (2008) serait dû au temps nécessaire pour les produits de pénétrer jusqu'au centre de l'ovaire.

Nous avons observé des foyers  $\gamma$ H2AX dans les ovocytes d'ovaires de rongeurs 8 jours après une exposition *in vitro* à la MP. Un facteur important pour la durée de la présence des foyers  $\gamma$ H2AX est la réparation des DSBs. Les foyers  $\gamma$ H2AX persistent tant que les DSBs ne sont pas complètement réparés (Paull *et al.*, 2000; Pilch *et al.*, 2003; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004). Mais cela n'est pas accepté avec unanimité car Forand *et al.*, (2004) ont observé la persistance des foyers  $\gamma$ H2AX dans les cellules germinales de souris nouveau-nés mâles exposés à la RI même après que la réparation

soit terminé. Il serait peut être possible d'observer ces foyers même après 8 jours s'il n'y a pas de réparation complète des DSBs dans les ovocytes. Il est aussi possible que ces dommages soient trop sévères et induisent la mort du follicule donc la disparition des foyers serait du à la destruction du follicule et non pas à la réparation des DSBs. Il reste à déterminer si la présence de foyers dans les ovocytes est un effet direct de la MP ou s'ils sont un résultat de la réparation des dommages à l'ADN, et si les foyers persistent après la réparation des DSBs dans le système reproducteur féminin.

Il reste à déterminer si la disparition des foyers correspond réellement à la réparation des DSBs effectuée dans les ovocytes à 8 jours. Nos résultats à 24 h suggèrent qu'il existe un mécanisme de détection des DSBs puisque la formation des foyers indique uniquement l'activation possible d'une voie de réparation (HR ou NHEJ). Par contre, ces résultats ne permettent pas de savoir si la voie de réparation est active ou si les DSBs peuvent être réparés (Petrillo *et al.*, en préparation). Le nombre de follicules avec  $\geq 5$  foyers/ovocytes diminue de 37% (24 h) à 7% (8 j) pour 1  $\mu\text{M}$  MP, suggérant la possibilité de la réparation des DSBs. En comparaison, la différence de nombre de follicules primordiaux entre ovaires non traités et ovaires traités avec 1  $\mu\text{M}$  PM est 50% ( $171 \pm 16$  versus  $92 \pm 18$ ). Le nombre de follicules primordiaux, incluant les follicules qui contiennent des foyers  $\gamma\text{H2AX}$ , diminue pour plusieurs raisons au cours de la culture. Le nombre de follicules primordiaux avec des foyers de  $\gamma\text{H2AX}$  pourrait diminuer à cause de leur activation au stade petit primaire et/ou de la réparation des DSBs. Nos données démontrant que les ovocytes mammifères des follicules primordiaux et petits primaires possèdent des mécanismes pour détecter les dommages à l'ADN sont en accord avec ceux publiés par Suh *et al.*, (2006). Nous sommes les premiers à quantifier et comparer les DSBs dans les ovaires de rongeurs après une exposition à la MP. Il reste à effectuer d'autres expériences pour déterminer d'une manière convaincante si les ovocytes ont tous les facteurs nécessaires pour réparer les dommages à l'ADN. Une de ces premières expériences serait de déterminer quelle voie est présente dans les ovocytes en utilisant des marqueurs (ex. anticorps) spécifiques à HR et/ou NHEJ en aval et en amont de  $\gamma\text{H2AX}$ . Des souris *knock-out* (KO) des facteurs impliqués seraient pratiques pour déterminer si les voies de réparation sont vraiment

actives dans les ovocytes. Malheureusement, la létalité de ces knock-outs requiert que ces changements soient spécifiques aux gamètes. Des cultures *in vitro* comparant les effets de MP pour chaque souche de souris, KO et « normale », déterminera le rôle d'une protéine. Si la voie est active, nous nous attendons à voir plus de foyers  $\gamma$ H2AX et/ou moins de follicules dans les ovaires de souris KO exposés à la MP comparé aux ovaires de souris normales.

Nos résultats sont très intéressants mais des études plus approfondies seraient nécessaires pour mieux comprendre l'endommagement de l'ADN, la détection des dommages ainsi que la réparation au sein de l'ovaire. Nous pourrions aussi étudier des voies de réparations spécifiques en exposant des ovaires *in vitro* à des inhibiteurs et substances chimiques qui induisent des dommages et/ou l'activation de certaines voies spécifiquement. La culture et l'exposition *in vitro* de morceaux d'ovaire humain aux agents toxiques serait important pour déterminer quel modèle animal reflète le mieux l'humain et si certains agents présentent des risques à la santé reproductive de femmes. Des expositions *in vivo*, modèle animal, aux agents étudiés *in vitro* suivi d'accouplements pourraient élucider des effets sur le système reproducteur et peut-être même démontrer des changements épigénétiques. Il serait aussi intéressant de combiner notre système de culture et les expériences *in vivo*. Par exemple, nous pourrions déterminer si les ovocytes qui ont des foyers  $\gamma$ H2AX qui persistent dans les ovaires après l'exposition à la MP sont capables d'être fécondé et devenir un embryon viable. Pour que cela soit possible, il faudrait implanter des ovaires cultivés et exposés *in vitro* dans une femelle. Si les ovocytes endommagés survivent (l'activation, la maturation et la fécondation), cela suggérera que la survie d'un follicule endommagé pourrait être possible chez les femmes qui subissent des expositions qui sont néfastes pour les follicules.

En conclusion, nous avons démontrés que les ovocytes des petits follicules ovariens sont très sensibles aux effets de la MP. Nous avons montré pour la première fois que les ovocytes peuvent détecter les DSBs et peut-être même les réparer. Il est nécessaire de continuer les expériences pour découvrir si les ovocytes peuvent vraiment

réparer les dommages à l'ADN. Car si les dommages peuvent être réparés, il y aurait moins de soucis pour la qualité des cellules germinales après des expositions aux ovotoxiques. Nos données suggèrent qu'il est important d'effectuer les mêmes types d'expériences avec d'autres agents ovotoxiques connus (ex. VCD, DMBA) pour voir s'ils induisent des dommages à l'ADN et si ces derniers sont réparés. Il serait aussi très important d'évaluer le potentiel ovotoxique de d'autres agents auxquels les femmes sont exposées mais dont les risques pour la réserve ovarienne ne sont pas connus.

## Liste des références

1. Aguilar-Mahecha, A., Hales, B. F., and Robaire, B. (2001). Acute cyclophosphamide exposure has germ cell specific effects on the expression of stress response genes during rat spermatogenesis. Molecular Reproduction and Development 3, 302-11.
2. Aguilar-Mahecha, A., Hales, B. F., and Robaire, B. (2002). Chronic cyclophosphamide treatment alters the expression of stress response genes in rat male germ cells. Biology of Reproduction 4, 1024-32.
3. Aguilar-Mahecha, A., Hales, B. F., and Robaire, B. (2005). Effects of acute and chronic cyclophosphamide treatment on meiotic progression and the induction of DNA double-strand breaks in rat spermatocytes. Biology of Reproduction 6, 1297-304.
4. Allison, A. C. (2000). Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. Immunopharmacology 2-3, 63-83.
5. Anderson, D., Bishop, J. B., Garner, R. C., Ostrosky-Wegman, P., and Selby, P. B. (1995). Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. Mutation Research 1-2, 115-81.
6. Antonicelli, R., Olivieri, F., Morichi, V., Urbani, E., and Mais, V. (2008). Prevention of cardiovascular events in early menopause: A possible role for hormone replacement therapy. International Journal of Cardiology.
7. Appt, S. E., Kaplan, J. R., Clarkson, T. B., Cline, J. M., Christian, P. J., and Hoyer, P. B. (2006). Destruction of primordial ovarian follicles in adult cynomolgus macaques after exposure to 4-vinylcyclohexene diepoxide: a nonhuman primate model of the menopausal transition. Fertility and Sterility 4 Suppl, 1210-6.
8. Arnon, J., Meirou, D., Lewis-Roness, H., and Ornoy, A. (2001). Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. Human Reproduction Update 4, 394-403.
9. Ataya, K. M., McKanna, J. A., Weintraub, A. M., Clark, M. R., and LeMaire, W. J. (1985). A luteinizing hormone-releasing hormone agonist for the prevention of chemotherapy-induced ovarian follicular loss in rats. Cancer Research 8, 3651-6.
10. Ataya, K. M., Valeriote, F. A., and Ramahi-Ataya, A. J. (1989). Effect of cyclophosphamide on the immature rat ovary. Cancer Research 7, 1660-4.
11. Augood, C., Duckitt, K., and Templeton, A. A. (1998). Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis. Human Reproduction 6, 1532-9.

12. Auroux, M., Dulioust, E., Selva, J., and Rince, P. (1990). Cyclophosphamide in the F0 male rat: physical and behavioral changes in three successive adult generations. Mutation Research **2**, 189-200.
13. Bakkenist, C. J., and Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. Nature **6922**, 499-506.
14. Barton, T. S., Robaire, B., and Hales, B. F. (2005). Epigenetic programming in the preimplantation rat embryo is disrupted by chronic paternal cyclophosphamide exposure. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **22**, 7865-70.
15. Barton, T. S., Robaire, B., and Hales, B. F. (2007). DNA damage recognition in the rat zygote following chronic paternal cyclophosphamide exposure. Toxicological Sciences **2**, 495-503.
16. Bines, J., Oleske, D. M., and Cobleigh, M. A. (1996). Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer. Journal of Clinical Oncology **5**, 1718-29.
17. Blatt, J. (1999). Pregnancy outcome in long-term survivors of childhood cancer. Medical and Pediatric Oncology **1**, 29-33.
18. Blumenfeld, Z. (2007). How to preserve fertility in young women exposed to chemotherapy? The role of GnRH agonist cotreatment in addition to cryopreservation of embryos, oocytes, or ovaries. The Oncologist **9**, 1044-54.
19. Blumenfeld, Z., Avivi, I., Linn, S., Epelbaum, R., Ben-Shahar, M., and Haim, N. (1996). Prevention of irreversible chemotherapy-induced ovarian damage in young women with lymphoma by a gonadotrophin-releasing hormone agonist in parallel to chemotherapy. Human Reproduction **8**, 1620-6.
20. Broekmans, F. J., Kwee, J., Hendriks, D. J., Mol, B. W., and Lambalk, C. B. (2006). A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. Human Reproduction Update **6**, 685-718.
21. Bullejos, M., and Koopman, P. (2004). Germ cells enter meiosis in a rostro-caudal wave during development of the mouse ovary. Molecular Reproduction and Development **4**, 422-8.
22. Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D. J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. Journal of Biological Chemistry **45**, 42462-7.
23. Byrne, J., Rasmussen, S. A., Steinhorn, S. C., Connelly, R. R., Myers, M. H., Lynch, C. F., Flannery, J., Austin, D. F., Holmes, F. F., Holmes, G. E., Strong, L. C., and Mulvihill, J. J. (1998). Genetic disease in offspring of long-term survivors of childhood and adolescent cancer. American Journal of Human Genetics **1**, 45-52.

24. Byskov, A. G., Faddy, M. J., Lemmen, J. G., and Andersen, C. Y. (2005). Eggs forever? Differentiation **9-10**, 438-46.
25. Cannady, E. A., Dyer, C. A., Christian, P. J., Sipes, I. G., and Hoyer, P. B. (2003). Expression and activity of cytochromes P450 2E1, 2A, and 2B in the mouse ovary: the effect of 4-vinylcyclohexene and its diepoxide metabolite. Toxicological Sciences **2**, 423-30.
26. Carlsson, I. B., Scott, J. E., Visser, J. A., Ritvos, O., Themmen, A. P., and Hovatta, O. (2006). Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. Human Reproduction **9**, 2223-7.
27. Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M. J., Pilch, D. R., Staudt, D. W., Lee, A., Bonner, R. F., Bonner, W. M., and Nussenzweig, A. (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. Nat Cell Biol **7**, 675-9.
28. Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P. J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H. T., Sedelnikova, O. A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M. J., Redon, C., Pilch, D. R., Oлару, A., Eckhaus, M., Camerini-Otero, R. D., Tessarollo, L., Livak, F., Manova, K., Bonner, W. M., Nussenzweig, M. C., and Nussenzweig, A. (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. Science **5569**, 922-7.
29. Chang, T. K., and Waxman, D. J. (1993). Cyclophosphamide modulates rat hepatic cytochrome P450 2C11 and steroid 5 alpha-reductase activity and messenger RNA levels through the combined action of acrolein and phosphoramidate mustard. Cancer Research **11**, 2490-7.
30. Chang, T. K., Yu, L., Goldstein, J. A., and Waxman, D. J. (1997). Identification of the polymorphically expressed CYP2C19 and the wild-type CYP2C9-ILE359 allele as low-Km catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation. Pharmacogenetics **3**, 211-21.
31. Chemaitilly, W., Mertens, A. C., Mitby, P., Whitton, J., Stovall, M., Yasui, Y., Robison, L. L., and Sklar, C. A. (2006). Acute ovarian failure in the childhood cancer survivor study. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **5**, 1723-8.
32. Chiarelli, A. M., Marrett, L. D., and Darlington, G. (1999). Early menopause and infertility in females after treatment for childhood cancer diagnosed in 1964-1988 in Ontario, Canada. American Journal of Epidemiology **3**, 245-54 .
33. Codrington, A. M., Hales, B. F., and Robaire, B. (2004). Spermiogenic germ cell phase-specific DNA damage following cyclophosphamide exposure. Journal of Andrology **3**, 354-62.

34. Codrington, A. M., Hales, B. F., and Robaire, B. (2007a). Exposure of male rats to cyclophosphamide alters the chromatin structure and basic proteome in spermatozoa. Human Reproduction **5**, 1431-42.
35. Codrington, A. M., Hales, B. F., and Robaire, B. (2007b). Chronic cyclophosphamide exposure alters the profile of rat sperm nuclear matrix proteins. Biology of Reproduction **2**, 303-11.
36. Colvin, O. M. (1999). An overview of cyclophosphamide development and clinical applications. Current Pharmaceutical Design **8**, 555-60.
37. Couto-Silva, A. C., Trivin, C., Thibaud, E., Esperou, H., Michon, J., and Brauner, R. (2001). Factors affecting gonadal function after bone marrow transplantation during childhood. Bone Marrow Transplantation **1**, 67-75.
38. Danforth, D. R., Arbogast, L. K., and Friedman, C. I. (2005). Acute depletion of murine primordial follicle reserve by gonadotropin-releasing hormone antagonists. Fertility and Sterility **5**, 1333-8.
39. Davis, B. J., Maronpot, R. R., and Heindel, J. J. (1994a). Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. Toxicology and Applied Pharmacology **2**, 216-23.
40. Davis, B. J., Weaver, R., Gaines, L. J., and Heindel, J. J. (1994b). Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol production independent of FSH-cAMP stimulation in rat granulosa cells. Toxicology and Applied Pharmacology **2**, 224-8.
41. de Kleijn, M. J., van der Schouw, Y. T., Verbeek, A. L., Peeters, P. H., Banga, J. D., and van der Graaf, Y. (2002). Endogenous estrogen exposure and cardiovascular mortality risk in postmenopausal women. American Journal of Epidemiology **4**, 339-45.
42. de la Rochebrochard, E., and Thonneau, P. (2002). Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study. Human Reproduction **6**, 1649-56.
43. Dennerstein, L., Dudley, E., and Burger, H. (2001). Are changes in sexual functioning during midlife due to aging or menopause? Fertility and Sterility **3**, 456-60.
44. Desmeules, P. Caractérisation de la toxicité ovarienne de métabolites du cyclophosphamide *in vitro*. 2006. Laval, Qc, Institut National de la Recherche- Institut Armand-Frappier.
45. Desmeules, P., and Devine, P. J. (2006). Characterizing the ovotoxicity of cyclophosphamide metabolites on cultured mouse ovaries. Toxicological Sciences **2**, 500-9.

46. Devine, P. J., Payne, C. M., McCuskey, M. K., and Hoyer, P. B. (2000). Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. Biology of Reproduction **5**, 1245-52.
47. Devine, P. J., Sipes, I. G., and Hoyer, P. B. (2004). Initiation of delayed ovotoxicity by in vitro and in vivo exposures of rat ovaries to 4-vinylcyclohexene diepoxide. Reproductive Toxicology **1**, 71-7.
48. Devine, P. J., Sipes, I. G., Skinner, M. K., and Hoyer, P. B. (2002). Characterization of a rat in vitro ovarian culture system to study the ovarian toxicant 4-vinylcyclohexene diepoxide. Toxicology and Applied Pharmacology **2**, 107-15.
49. Ebner, T., Sommergruber, M., Moser, M., Shebl, O., Schreier-Lechner, E., and Tews, G. (2006). Basal level of anti-Mullerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles. Human Reproduction **8**, 2022-6.
50. Eggan, K., Jurga, S., Gosden, R., Min, I. M., and Wagers, A. J. (2006). Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. Nature **7097**, 1109-14.
51. Encha-Razavi, F., and Escudier, E. (2003). *Embryologie humaine, De la molécule a la clinique*. Masson, Belgium.
52. Escobar, M. L., Echeverria, O. M., Ortiz, R., and Vazquez-Nin, G. H. (2008). Combined apoptosis and autophagy, the process that eliminates the oocytes of atretic follicles in immature rats. Apoptosis **10**, 1253-66.
53. Faddy, M. J. (2000). Follicle dynamics during ovarian ageing. Molecular and Cellular Endocrinology **1-2**, 43-8.
54. Faddy, M. J., and Gosden, R. G. (1996). A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women. Human Reproduction **7**, 1484-6.
55. Faddy, M. J., Gosden, R. G., Gougeon, A., Richardson, S. J., and Nelson, J. F. (1992). Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. Human Reproduction **10**, 1342-6.
56. Fernandez-Capetillo, O., Chen, H. T., Celeste, A., Ward, I., Romanienko, P. J., Morales, J. C., Naka, K., Xia, Z., Camerini-Otero, R. D., Motoyama, N., Carpenter, P. B., Bonner, W. M., Chen, J., and Nussenzweig, A. (2002). DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. Nat Cell Biol **12**, 993-7.
57. Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M., and Nussenzweig, A. (2004). H2AX: the histone guardian of the genome. DNA Repair (Amst) **8-9**, 959-67.
58. Fernandez, S. M., Keating, A. F., Christian, P. J., Sen, N., Hoying, J. B., Brooks, H. L., and Hoyer, P. B. (2008). Involvement of the KIT/KITL signaling pathway in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovarian follicle loss in rats. Biology of Reproduction **2**, 318-27.

59. Forand, A., Dutrillaux, B., and Bernardino-Sgherri, J. (2004). Gamma-H2AX expression pattern in non-irradiated neonatal mouse germ cells and after low-dose gamma-radiation: relationships between chromatid breaks and DNA double-strand breaks. Biology of Reproduction **2**, 643-9.
60. Fortune, J. E. (2003). The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. Animal Reproduction Science **3-4**, 135-63.
61. Fortune, J. E., Cushman, R. A., Wahl, C. M., and Kito, S. (2000). The primordial to primary follicle transition. Molecular and Cellular Endocrinology **1-2**, 53-60.
62. Furuta, T., Takemura, H., Liao, Z. Y., Aune, G. J., Redon, C., Sedelnikova, O. A., Pilch, D. R., Rogakou, E. P., Celeste, A., Chen, H. T., Nussenzweig, A., Aladjem, M. I., Bonner, W. M., and Pommier, Y. (2003). Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. Journal of Biological Chemistry **22**, 20303-12.
63. Gamcsik, M. P., Dolan, M. E., Andersson, B. S., and Murray, D. (1999). Mechanisms of resistance to the toxicity of cyclophosphamide. Current Pharmaceutical Design **8**, 587-605.
64. Glamoclija, V., Vilovic, K., Saraga-Babic, M., Baranovic, A., and Sapunar, D. (2005). Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. Fertility and Sterility **2**, 426-31.
65. Gosden, R. G. (2004). Germline stem cells in the postnatal ovary: is the ovary more like a testis? Human Reproduction Update **3**, 193-5.
66. Gougeon, A. (2005). [Neo-oogenesis in the postnatal ovary: fantasy or reality?]. Gynecol Obstet Fertil **10**, 819-23.
67. Green, D. M., Whitton, J. A., Stovall, M., Mertens, A. C., Donaldson, S. S., Ruymann, F. B., Pendergrass, T. W., and Robison, L. L. (2003). Pregnancy outcome of partners of male survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. Journal of Clinical Oncology **4**, 716-21.
68. Greenfeld, C., and Flaws, J. A. (2004). Renewed debate over postnatal oogenesis in the mammalian ovary. Bioessays **8**, 829-32.
69. Grimes, D. A., and Lopez, L. M. (2007). "Oligozoospermia," "azoospermia," and other semen-analysis terminology: the need for better science. Fertility and Sterility **6**, 1491-4.
70. Gupta, R. K., Aberdeen, G., Babus, J. K., Albrecht, E. D., and Flaws, J. A. (2007). Methoxychlor and its metabolites inhibit growth and induce atresia of baboon antral follicles. Toxicologic Pathology **5**, 649-56.

71. Gupta, R. K., and Flaws, J. A. (2005). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogues and the ovary: do GnRH antagonists destroy primordial follicles? Fertility and Sterility **5**, 1339-42.
72. Gupta, R. K., Miller, K. P., Babus, J. K., and Flaws, J. A. (2006a). Methoxychlor inhibits growth and induces atresia of antral follicles through an oxidative stress pathway. Toxicological Sciences **2**, 382-9.
73. Gupta, R. K., Schuh, R. A., Fiskum, G., and Flaws, J. A. (2006b). Methoxychlor causes mitochondrial dysfunction and oxidative damage in the mouse ovary. Toxicology and Applied Pharmacology **3**, 436-45.
74. Hales, B. F., Barton, T. S., and Robaire, B. (2005). Impact of paternal exposure to chemotherapy on offspring in the rat. Journal of the National Cancer Institute. Monographs. **34**, 28-31.
75. Hanoux, V., Pairault, C., Bakalska, M., Habert, R., and Livera, G. (2007). Caspase-2 involvement during ionizing radiation-induced oocyte death in the mouse ovary. Cell Death and Differentiation **4**, 671-81.
76. Harrouk, W., Codrington, A., Vinson, R., Robaire, B., and Hales, B. F. (2000). Paternal exposure to cyclophosphamide induces DNA damage and alters the expression of DNA repair genes in the rat preimplantation embryo. Mutation Research **3**, 229-41.
77. Helleday, T., Lo, J., van Gent, D. C., and Engelward, B. P. (2007). DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. DNA Repair (Amst) **7**, 923-35.
78. Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B., and Sharma, R. A. (2008). DNA repair pathways as targets for cancer therapy. Nat Rev Cancer **3**, 193-204.
79. Hirshfield, A. N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. International Review of Cytology 43-101.
80. Hirshfield, A. N. (1997). Overview of ovarian follicular development: considerations for the toxicologist. Environmental and Molecular Mutagenesis **1**, 10-5.
81. Hodis, H. N. (2008). Assessing benefits and risks of hormone therapy in 2008: new evidence, especially with regard to the heart. Cleveland Clinic Journal of Medicine S3-12.
82. Hovatta, O. (2004). Cryopreservation and culture of human ovarian cortical tissue containing early follicles. European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology S50-4.

83. Hoyer, P. B. (2005). Damage to ovarian development and function. Cell and Tissue Research **1**, 99-106.
84. Hoyer, P. B., and Devine, P. J. (2002). Endocrinology and Toxicology: The Female Reproductive System. In Handbook of Toxicology (M. J. Derelanko, and M. A. Hollinger, Eds.), pp. 573-596. CRC Press, Boca Raton FL.
85. Hoyer, P. B., and Sipes, I. G. (2007). Development of an animal model for ovotoxicity using 4-vinylcyclohexene: a case study. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol **2**, 113-25.
86. Hsia, K. T., Millar, M. R., King, S., Selfridge, J., Redhead, N. J., Melton, D. W., and Saunders, P. T. (2003). DNA repair gene Ercc1 is essential for normal spermatogenesis and oogenesis and for functional integrity of germ cell DNA in the mouse. Development **2**, 369-78.
87. Hsueh, A. J., Eisenhauer, K., Chun, S. Y., Hsu, S. Y., and Billig, H. (1996). Gonadal cell apoptosis. Recent Progress in Hormone Research **433-55**; discussion 455-6.
88. Hu, X., Christian, P. J., Thompson, K. E., Sipes, I. G., and Hoyer, P. B. (2001). Apoptosis induced in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide is associated with activation of the caspase cascades. Biology of Reproduction **1**, 87-93.
89. Hunt, P. A., and Hassold, T. J. (2008). Human female meiosis: what makes a good egg go bad? Trends in Genetics **2**, 86-93.
90. Hurley, L. H. (2002). DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. Nat Rev Cancer **3**, 188-200.
91. Huser, M., Crha, I., Ventruba, P., Hudecek, R., Zakova, J., Smardova, L., Kral, Z., and Jarkovsky, J. (2008). Prevention of ovarian function damage by a GnRH analogue during chemotherapy in Hodgkin lymphoma patients. Human Reproduction **4**, 863-8.
92. Hussein, M. R. (2005). Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. Human Reproduction Update **2**, 162-77.
93. Igawa, Y., Keating, A. F., Rajapaksa, K. S., Sipes, I. G., and Hoyer, P. B. (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. Toxicology and Applied Pharmacology **3**, 361-9.
94. Jarrell, J., Lai, E. V., Barr, R., McMahon, A., Belbeck, L., and O'Connell, G. (1987). Ovarian toxicity of cyclophosphamide alone and in combination with ovarian irradiation in the rat. Cancer Research **9**, 2340-3.

95. Jarrell, J. F., Bodo, L., YoungLai, E. V., Barr, R. D., and O'Connell, G. J. (1991). The short-term reproductive toxicity of cyclophosphamide in the female rat. Reproductive Toxicology **6**, 481-5.
96. Jick, H., Porter, J., and Morrison, A. S. (1977). Relation between smoking and age of natural menopause. Lancet 1354-1355.
97. Johnson, J., Bagley, J., Skaznik-Wikiel, M., Lee, H. J., Adams, G. B., Niikura, Y., Tschudy, K. S., Tilly, J. C., Cortes, M. L., Forkert, R., Spitzer, T., Iacomini, J., Scadden, D. T., and Tilly, J. L. (2005). Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. Cell **2**, 303-15.
98. Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K., and Tilly, J. L. (2004 ). Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. Nature **6979**, 145-50.
99. Jones, K. T. (2008). Meiosis in oocytes: predisposition to aneuploidy and its increased incidence with age. Human Reproduction Update **2**, 143-58.
100. Jurisicova, A., Lee, H. J., D'Estaing, S. G., Tilly, J., and Perez, G. I. (2006). Molecular requirements for doxorubicin-mediated death in murine oocytes. Cell Death and Differentiation **9** , 1466-74.
101. Kaipia, A., and Hsueh, A. J. (1997). Regulation of ovarian follicle atresia. Annual Review of Physiology 349-63.
102. Kao, S. W., Sipes, I. G., and Hoyer, P. B. (1999). Early effects of ovotoxicity induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide in rats and mice. Reproductive Toxicology **1**, 67-75.
103. Keating, A. F., Rajapaksa, K. S., Sipes, I. G., and Hoyer, P. B. (2008a ). Effect of CYP2E1 gene deletion in mice on expression of microsomal epoxide hydrolase in response to VCD exposure. Toxicological Sciences **2**, 351-9.
104. Keating, A. F., Sipes, I. G., and Hoyer, P. B. (2008b). Expression of ovarian microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase during onset of VCD-induced ovotoxicity in B6C3F(1) mice. Toxicology and Applied Pharmacology **1**, 109-16.
105. Kenney, L. B., Laufer, M. R., Grant, F. D., Grier, H., and Diller, L. (2001). High risk of infertility and long term gonadal damage in males treated with high dose cyclophosphamide for sarcoma during childhood. Cancer **3**, 613-21.
106. Kevenaar, M. E., Meerasahib, M. F., Kramer, P., van de Lang-Born, B. M., de Jong, F. H., Groome, N. P., Themmen, A. P., and Visser, J. A. (2006). Serum antimullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. Endocrinology **7**, 3228-34.

107. Kezele, P. R., Nilsson, E. E., and Skinner, M. K. (2002). Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. Molecular and Cellular Endocrinology 1-2, 37-43.
108. Khanna, K. K., Lavin, M. F., Jackson, S. P., and Mulhern, T. D. (2001). ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. Cell Death and Differentiation 11, 1052-65.
109. Kim, J. H., Han, J. S., and Yoon, Y. D. (1999). Biochemical and morphological identification of ceramide-induced cell cycle arrest and apoptosis in cultured granulosa cells. Tissue and Cell 6, 531-9.
110. Kinney, A., Kline, J., Kelly, A., Reuss, M. L., and Levin, B. (2007). Smoking, alcohol and caffeine in relation to ovarian age during the reproductive years. Human Reproduction 4, 1175-85.
111. Kobayashi, J., Iwabuchi, K., Miyagawa, K., Sonoda, E., Suzuki, K., Takata, M., and Tauchi, H. (2008). Current topics in DNA double-strand break repair. Journal of Radiation Research 2, 93-103.
112. Koh, J. M., Kim, C. H., Hong, S. K., Lee, K. U., Kim, Y. T., Kim, O. J., and Kim, G. S. (1998). Primary ovarian failure caused by a solvent containing 2-bromopropane. European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies 5, 554-6.
113. Krishnan, C., Kaplin, A. I., Brodsky, R. A., Drachman, D. B., Jones, R. J., Pham, D. L., Richert, N. D., Pardo, C. A., Yousem, D. M., Hammond, E., Quigg, M., Trecker, C., McArthur, J. C., Nath, A., Greenberg, B. M., Calabresi, P. A., and Kerr, D. A. (2008). Reduction of disease activity and disability with high-dose cyclophosphamide in patients with aggressive multiple sclerosis. Archives of Neurology 8, 1044-51.
114. Lambalk, C. B., de Koning, C. H., Flett, A., Van Kasteren, Y., Gosden, R., and Homburg, R. (2004). Assessment of ovarian reserve. Ovarian biopsy is not a valid method for the prediction of ovarian reserve. Human Reproduction 5, 1055-9.
115. Lee, H. J., Selesniemi, K., Niikura, Y., Niikura, T., Klein, R., Dombkowski, D. M., and Tilly, J. L. (2007). Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. Journal of Clinical Oncology 22, 3198-204.
116. Lie Fong, S., Baart, E. B., Martini, E., Schipper, I., Visser, J. A., Themmen, A. P., de Jong, F. H., Fauser, B. J., and Laven, J. S. (2008). Anti-Mullerian hormone: a marker for oocyte quantity, oocyte quality and embryo quality? Reprod Biomed Online 5, 664-70.

117. Linet, M. S., Ries, L. A., Smith, M. A., Tarone, R. E., and Devesa, S. S. (1999). Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. Journal of the National Cancer Institute **12**, 1051-8.
118. Liu, K., Rajareddy, S., Liu, L., Jagarlamudi, K., Boman, K., Selstam, G., and Reddy, P. (2006). Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer. Developmental Biology **1**, 1-11.
119. Lohff, J. C., Christian, P. J., Marion, S. L., and Hoyer, P. B. (2006). Effect of duration of dosing on onset of ovarian failure in a chemical-induced mouse model of perimenopause. Menopause **3**, 482-8.
120. Lopez, S. G., and Luderer, U. (2004). Effects of cyclophosphamide and buthionine sulfoximine on ovarian glutathione and apoptosis. Free Radical Biology and Medicine **11**, 1366-77.
121. Lovekamp-Swan, T., and Davis, B. J. (2003). Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. Environmental Health Perspectives **2**, 139-45.
122. Ludeman, S. M. (1999). The chemistry of the metabolites of cyclophosphamide. Current Pharmaceutical Design **8**, 627-43.
123. Maltaris, T., Seufert, R., Fischl, F., Schaffrath, M., Pollow, K., Koelbl, H., and Dittrich, R. (2007). The effect of cancer treatment on female fertility and strategies for preserving fertility. European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology **2**, 148-55.
124. Mayer, L. P., Devine, P. J., Dyer, C. A., and Hoyer, P. B. (2004). The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. Biology of Reproduction **1**, 130-8.
125. McGee, E. A., and Hsueh, A. J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocrine Reviews **2**, 200-14.
126. McLaren, A. (2000). Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. Molecular and Cellular Endocrinology **1-2**, 3-9.
127. Meirou, D. (1999). Ovarian injury and modern options to preserve fertility in female cancer patients treated with high dose radio-chemotherapy for hematological neoplasias and other cancers. Leukemia and Lymphoma **1-2**, 65-76.
128. Meirou, D., Epstein, M., Lewis, H., Nugent, D., and Gosden, R. G. (2001). Administration of cyclophosphamide at different stages of follicular maturation in mice: effects on reproductive performance and fetal malformations. Human Reproduction **4**, 632-7.

129. Meiorow, D., Lewis, H., Nugent, D., and Epstein, M. (1999). Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool. Human Reproduction **7**, 1903-7.
130. Meiorow, D., and Nugent, D. (2001). The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. Human Reproduction Update **6**, 535-43.
131. Meiorow, D., and Schiff, E. (2005). Appraisal of chemotherapy effects on reproductive outcome according to animal studies and clinical data. Journal of the National Cancer Institute. Monographs **34**, 21-5.
132. Menezo, Y. (2006). [Oocyte capacity to repair DNA damage induced in sperm]. Journal de Gynecologie, Obstetrique et Biologie de la Reproduction **5 Pt 2**, 2S19-2S23.
133. Menezo, Y. Jr, Russo, G., Tosti, E., El Mouatassim, S., and Benkhalifa, M. (2007). Expression profile of genes coding for DNA repair in human oocytes using pangenomic microarrays, with a special focus on ROS linked decays. Journal of Assisted Reproduction and Genetics **11**, 513-20.
134. Mikkelsen, T. F., Graff-Iversen, S., Sundby, J., and Bjertness, E. (2007). Early menopause, association with tobacco smoking, coffee consumption and other lifestyle factors: a cross-sectional study. BMC Public Health **147**, 149.
135. Minton, S. E., and Munster, P. N. (2002). Chemotherapy-induced amenorrhea and fertility in women undergoing adjuvant treatment for breast cancer. Cancer Control **6**, 466-72.
136. Moore, M. J. (1991). Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. Clinical Pharmacokinetics **3**, 194-208.
137. Nagarajan, R., and Robison, L. L. (2005). Pregnancy outcomes in survivors of childhood cancer. Journal of the National Cancer Institute. Monographs **34**, 72-6.
138. Neal, M. S., Zhu, J., Holloway, A. C., and Foster, W. G. (2007). Follicle growth is inhibited by benzo-[a]-pyrene, at concentrations representative of human exposure, in an isolated rat follicle culture assay. Human Reproduction **4**, 961-7.
139. Neale, M. J., and Keeney, S. (2006). Clarifying the mechanics of DNA strand exchange in meiotic recombination. Nature **7099**, 153-8.
140. Nilsson, E., Rogers, N., and Skinner, M. K. (2007). Actions of anti-Mullerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition. Reproduction **2**, 209-21.

141. Nilsson, E., and Skinner, M. K. (2001). Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. Journal of the Society for Gynecologic Investigation 1 Suppl Proceedings, S17-20.
142. O'Driscoll, M., and Jeggo, P. A. (2006). The role of double-strand break repair - insights from human genetics. Nat Rev Genet 1, 45-54.
143. Oktay, K., Briggs, D., and Gosden, R. G. (1997). Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 11, 3748-51.
144. Oktay, K., Oktem, O., Reh, A., and Vahdat, L. (2006). Measuring the impact of chemotherapy on fertility in women with breast cancer. Journal of Clinical Oncology 24, 4044-6.
145. Oktay, K., and Sonmezer, M. (2008). Gonadotropin-releasing hormone analogs in fertility preservation-lack of biological basis? Nat Clin Pract Endocrinol Metab 9, 488-9.
146. Oktay, K., Sonmezer, M., Barad, D., and Gleicher, N. (2009). Trying to reduce ovarian damage in patients with Hodgkin lymphoma using GnRH agonists? Fertility and Sterility 1, 298-9; author reply 299.
147. Oktay, K., Sonmezer, M., Oktem, O., Fox, K., Emons, G., and Bang, H. (2007). Absence of conclusive evidence for the safety and efficacy of gonadotropin-releasing hormone analogue treatment in protecting against chemotherapy-induced gonadal injury. The Oncologist 9, 1055-66.
148. Pal, L., and Santoro, N. (2002). Premature ovarian failure (POF): discordance between somatic and reproductive aging. Ageing Res Rev 3, 413-23.
149. Pallapies, D. (2006). Trends in childhood disease. Mutation Research 2, 100-11.
150. Parrott, J. A., and Skinner, M. K. (1999). Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. Endocrinology 9, 4262-71.
151. Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M., and Bonner, W. M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. Current Biology 15, 886-95.
152. Pedersen, T., and Peters, H. (1968). Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. Journal of Reproduction and Fertility 3, 555-7.
153. Pepling, M. E. (2006). From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. Genesis 12, 622-32.

154. Pepling, M. E., and Spradling, A. C. (2001). Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. Developmental Biology **2**, 339-51.
155. Perez, G. I., Jurisicova, A., Matikainen, T., Moriyama, T., Kim, M. R., Takai, Y., Pru, J. K., Kolesnick, R. N., and Tilly, J. L. (2005). A central role for ceramide in the age-related acceleration of apoptosis in the female germline. FASEB Journal **7**, 860-2.
156. Perez, G. I., Tao, X. J., and Tilly, J. L. (1999). Fragmentation and death (a.k.a. apoptosis) of ovulated oocytes. Molecular Human Reproduction **5**, 414-20.
157. Peters, H. (1969). The development of the mouse ovary from birth to maturity. Acta Endocrinologica **1**, 98-116.
158. Petrek, J. A., Naughton, M. J., Case, L. D., Paskett, E. D., Naftalis, E. Z., Singletary, S. E., and Sukumvanich, P. (2006). Incidence, time course, and determinants of menstrual bleeding after breast cancer treatment: a prospective study. Journal of Clinical Oncology **7**, 1045-51.
159. Petrillo, S. K., Desmeules, P., Truong, T. Q., and Devine, P. J. (en préparation). Detection of DNA damage in dormant oocytes after phosphoramidate mustard exposures of cultured rodent ovaries. Toxicology and Applied Pharmacology.
160. Pilch, D. R., Sedelnikova, O. A., Redon, C., Celeste, A., Nussenzweig, A., and Bonner, W. M. (2003). Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. Biochemistry and Cell Biology **3**, 123-9.
161. Plowchalk, D. R., and Mattison, D. R. (1991). Phosphoramidate mustard is responsible for the ovarian toxicity of cyclophosphamide. Toxicology and Applied Pharmacology **3**, 472-81.
162. Plowchalk, D. R., and Mattison, D. R. (1992). Reproductive toxicity of cyclophosphamide in the C57BL/6N mouse: 1. Effects on ovarian structure and function. Reproductive Toxicology **5**, 411-21.
163. Plowchalk, D. R., and Teeguarden, J. (2002). Development of a physiologically based pharmacokinetic model for estradiol in rats and humans: a biologically motivated quantitative framework for evaluating responses to estradiol and other endocrine-active compounds. Toxicological Sciences **1**, 60-78.
164. Pouilles, J. M., Tremollieres, F., Bonneau, M., and Ribot, C. (1994). Influence of early age at menopause on vertebral bone mass. Journal of Bone and Mineral Research **3**, 311-5.
165. Pulte, D., Gondos, A., and Brenner, H. (2008). Trends in 5- and 10-year survival after diagnosis with childhood hematologic malignancies in the United States, 1990-2004. Journal of the National Cancer Institute **18**, 1301-9.

166. Rajah, R., Glaser, E. M., and Hirshfield, A. N. (1992). The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. Developmental Dynamics **3**, 177-92.
167. Rajapaksa, K. S., Cannady, E. A., Sipes, I. G., and Hoyer, P. B. (2007a ). Involvement of CYP 2E1 enzyme in ovotoxicity caused by 4-vinylcyclohexene and its metabolites. Toxicology and Applied Pharmacology **2**, 215-21.
168. Rajapaksa, K. S., Sipes, I. G., and Hoyer, P. B. (2007b). involvement of microsomal epoxide hydrolase enzyme in ovotoxicity caused by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. Toxicological Sciences **2**, 327-34.
169. Reddy, P., Liu, L., Adhikari, D., Jagarlamudi, K., Rajareddy, S., Shen, Y., Du, C., Tang, W., Hamalainen, T., Peng, S. L., Lan, Z. J., Cooney, A. J., Huhtaniemi, I., and Liu, K. (2008). Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. Science **5863**, 611-3.
170. Reddy, P., Shen, L., Ren, C., Boman, K., Lundin, E., Ottander, U., Lindgren, P., Liu, Y. X., Sun, Q. Y., and Liu, K. (2005). Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. Developmental Biology **2**, 160-70.
171. Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., and Bonner, W. (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. Current Opinion in Genetics and Development **2**, 162-9.
172. Ren, S., Yang, J. S., Kalhorn, T. F., and Slattery, J. T. (1997). Oxidation of cyclophosphamide to 4-hydroxycyclophosphamide and deschloroethylcyclophosphamide in human liver microsomes. Cancer Research **19**, 4229-35.
173. Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W. M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. Journal of Cell Biology **5**, 905-16.
174. Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., and Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. Journal of Biological Chemistry **10**, 5858-68.
175. Rohan, T. E., Negassa, A., Chlebowski, R. T., Habel, L., McTiernan, A., Ginsberg, M., Wassertheil-Smoller, S., and Page, D. L. (2008). Conjugated equine estrogen and risk of benign proliferative breast disease: a randomized controlled trial. Journal of the National Cancer Institute **8**, 563-71.
176. Russell, L. B., Hunsicker, P. R., and Shelby, M. D. (1996). Chlorambucil and bleomycin induce mutations in the specific-locus test in female mice. Mutation Research **1**, 25-35.

177. Sanders, J. E., Hawley, J., Levy, W., Gooley, T., Buckner, C. D., Deeg, H. J., Doney, K., Storb, R., Sullivan, K., Witherspoon, R., and Appelbaum, F. R. (1996). Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulfan or total-body irradiation and bone marrow transplantation. Blood 7, 3045-52.
178. Scott, J. E., Carlsson, I. B., Bavister, B. D., and Hovatta, O. (2004). Human ovarian tissue cultures: extracellular matrix composition, coating density and tissue dimensions. Reprod Biomed Online 3, 287-93.
179. Sedelnikova, O. A., Rogakou, E. P., Panyutin, I. G., and Bonner, W. M. (2002). Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. Radiation Research 4, 486-92.
180. Shrivastav, M., De Haro, L. P., and Nickoloff, J. A. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. Cell Research 1, 134-47 .
181. Shumaker, S. A., Legault, C., Rapp, S. R., Thal, L., Wallace, R. B., Ockene, J. K., Hendrix, S. L., Jones, B. N. 3rd, Assaf, A. R., Jackson, R. D., Kotchen, J. M., Wassertheil-Smoller, S., and 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 20, 2651-62.
182. Signorello, L. B., Cohen, S. S., Bosetti, C., Stovall, M., Kasper, C. E., Weathers, R. E., Whitton, J. A., Green, D. M., Donaldson, S. S., Mertens, A. C., Robison, L. L., and Boice, J. D. Jr (2006). Female survivors of childhood cancer: preterm birth and low birth weight among their children. Journal of the National Cancer Institute 20, 1453-61.
183. Skinner, M. K. (2005). Regulation of primordial follicle assembly and development. Human Reproduction Update 5, 461-71.
184. Sklar, C. ( 2005). Maintenance of ovarian function and risk of premature menopause related to cancer treatment. Journal of the National Cancer Institute. Monographs. 34, 25-7.
185. Sklar, C. A., Mertens, A. C., Mitby, P., Whitton, J., Stovall, M., Kasper, C., Mulder, J., Green, D., Nicholson, H. S., Yasui, Y., and Robison, L. L. (2006). Premature menopause in survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study. Journal of the National Cancer Institute 13, 890-6.
186. Smeenk, J. M., Sweep, F. C., Zielhuis, G. A., Kremer, J. A., Thomas, C. M., and Braat, D. D. (2007). Antimullerian hormone predicts ovarian responsiveness, but not embryo quality or pregnancy, after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. Fertility and Sterility 1, 223-6.

187. Sonmezer, M., and Oktay, K. (2006). Fertility preservation in young women undergoing breast cancer therapy. The Oncologist 5, 422-34.
188. Sotomayor, R. E., and Cumming, R. B. (1975). Induction of translocations by cyclophosphamide in different germ cell stages of male mice: cytological characterization and transmission. Mutation Research 3, 375-88.
189. Sotomayor, R. E., Sega, G. A., and Cumming, R. B. (1978). Unscheduled DNA synthesis in spermatogenic cells of mice treated in vivo with the indirect alkylating agents cyclophosphamide and mitomen. Mutation Research 2, 229-40.
190. Springer, L. N., McAsey, M. E., Flaws, J. A., Tilly, J. L., Sipes, I. G., and Hoyer, P. B. (1996). Involvement of apoptosis in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in rats. Toxicology and Applied Pharmacology 2, 394-401.
191. Srivastava, N., Gochhait, S., de Boer, P., and Bamezai, R. N. (2008). Role of H2AX in DNA damage response and human cancers. Mutation Research.
192. Suh, E. K., Yang, A., Kettenbach, A., Bamberger, C., Michaelis, A. H., Zhu, Z., Elvin, J. A., Bronson, R. T., Crum, C. P., and McKeon, F. (2006). p63 protects the female germ line during meiotic arrest. Nature 7119, 624-8.
193. Takai, Y., Matikainen, T., Jurisicova, A., Kim, M. R., Trbovich, A. M., Fujita, E., Nakagawa, T., Lemmers, B., Flavell, R. A., Hakem, R., Momoi, T., Yuan, J., Tilly, J. L., and Perez, G. I. (2007). Caspase-12 compensates for lack of caspase-2 and caspase-3 in female germ cells. Apoptosis 4, 791-800.
194. Telfer, E. E., Gosden, R. G., Byskov, A. G., Spears, N., Albertini, D., Andersen, C. Y., Anderson, R., Braw-Tal, R., Clarke, H., Gougeon, A., McLaughlin, E., McLaren, A., McNatty, K., Schatten, G., Silber, S., and Tsafri, A. (2005). On regenerating the ovary and generating controversy. Cell 6, 821-2.
195. Thompson, K. E., Bourguet, S. M., Christian, P. J., Benedict, J. C., Sipes, I. G., Flaws, J. A., and Hoyer, P. B. (2005). Differences between rats and mice in the involvement of the aryl hydrocarbon receptor in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovarian follicle loss. Toxicology and Applied Pharmacology 2, 114-23.
196. Thomson, A. B., Critchley, H. O., and Wallace, W. H. (2002). Fertility and progeny. European Journal of Cancer 12, 1634-44; discussion 1645-6.
197. Tilly, J. L., and Kolesnick, R. N. (2002). Sphingolipids, apoptosis, cancer treatments and the ovary: investigating a crime against female fertility. Biochimica et Biophysica Acta 2-3, 135-8.
198. Tsai-Turton, M., Luong, B. T., Tan, Y., and Luderer, U. (2007). Cyclophosphamide-induced apoptosis in COV434 human granulosa cells involves oxidative stress and glutathione depletion. Toxicological Sciences 1, 216-30.

199. Umland, E. M. (2008). Treatment strategies for reducing the burden of menopause-associated vasomotor symptoms. J Manag Care Pharm 3 Suppl, 14-9.
200. Utian, W. H., Archer, D. F., Bachmann, G. A., Gallagher, C., Grodstein, F., Heiman, J. R., Henderson, V. W., Hodis, H. N., Karas, R. H., Lobo, R. A., Manson, J. E., Reid, R. L., Schmidt, P. J., and Stuenkel, C. A. (2008). Estrogen and progestogen use in postmenopausal women: July 2008 position statement of The North American Menopause Society. Menopause 4 Pt 1, 584-602.
201. Uzumcu, M., Kuhn, P. E., Marano, J. E., Armenti, A. E., and Passantino, L. (2006). Early postnatal methoxychlor exposure inhibits folliculogenesis and stimulates anti-Mullerian hormone production in the rat ovary. Journal of Endocrinology 3, 549-58.
202. Valerie, K., and Povirk, L. F. (2003). Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. Oncogene 37, 5792-812.
203. van Attikum, H., and Gasser, S. M. (2005). The histone code at DNA breaks: a guide to repair? Nat Rev Mol Cell Biol 10, 757-65.
204. Van Blerkom, J., and Davis, P. W. (1998). DNA strand breaks and phosphatidylserine redistribution in newly ovulated and cultured mouse and human oocytes: occurrence and relationship to apoptosis. Human Reproduction 5, 1317-24.
205. van Gent, D. C., Hoeijmakers, J. H., and Kanaar, R. (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. Nat Rev Genet 3, 196-206.
206. Vega, E. M., Egea, M. A., and Mautalen, C. A. (1994). Influence of the menopausal age on the severity of osteoporosis in women with vertebral fractures. Maturitas 2, 117-24.
207. Vijg, J. (2007). *Aging of the Genome: The dual role of DNA in life and death*. Oxford Biosciences, Great Britain.
208. Visser, J. A., de Jong, F. H., Laven, J. S., and Themmen, A. P. (2006). Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. Reproduction 1, 1-9.
209. Visser, J. A., and Themmen, A. P. (2005). Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. Molecular and Cellular Endocrinology 1-2, 81-6.
210. Wallace, W. H., Thomson, A. B., and Kelsey, T. W. (2003). The radiosensitivity of the human oocyte. Human Reproduction 1, 117-21.
211. Wallace, W. H., Thomson, A. B., Saran, F., and Kelsey, T. W. (2005). Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics 3, 738-44.

212. Wang, H., and Hoog, C. (2006). Structural damage to meiotic chromosomes impairs DNA recombination and checkpoint control in mammalian oocytes. Journal of Cell Biology 4, 485-95.
213. Ward, I. M., and Chen, J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. Journal of Biological Chemistry 51, 47759-62.
214. Yu, X., Kamijima, M., Ichihara, G., Li, W., Kitoh, J., Xie, Z., Shibata, E., Hisanaga, N., and Takeuchi, Y. (1999). 2-Bromopropane causes ovarian dysfunction by damaging primordial follicles and their oocytes in female rats. Toxicology and Applied Pharmacology 3, 185-93.
215. Zhang, J., Tian, Q., Yung Chan, S., Chuen Li, S., Zhou, S., Duan, W., and Zhu, Y. Z. (2005). Metabolism and transport of oxazaphosphorines and the clinical implications. Drug Metabolism Reviews 4, 611-703.

## Annexe

### Effets du 4-vinylcyclohexene diépoxyde (VCD) sur des ovaires de rongeurs nouveau-nés cultivés

#### Introduction

Le 4-vinylcyclohexène diépoxyde (VCD) est un sous-produit industriel ovotoxique qui provient du 4-vinylcyclohexène (VCH). Le VCH est métabolisé en VCD par les cytochromes p450 hépatiques ainsi que CYP2E1 dans l'ovaire (Keating *et al.*, 2008a). Il a été démontré chez les rattes (Fischer 344) et souris (C57BL6/j, B6C3F(1)) *in vitro* (exposition continuuel) que le VCD cible particulièrement les follicules primordiaux (Devine *et al.*, 2002; Hoyer et Sipes, 2007; Keating *et al.*, 2008b). Chez la souris, le VCD a été utilisé *in vivo* pour éliminer les follicules primordiaux afin d'étudier la physiologie ovarienne et le contrôle hormonale de la population ovarienne (Thomson *et al.*, 2002; Wang et Hoog, 2006; Lohff *et al.*, 2006). Le mécanisme de toxicité du VCD qui lui permet de détruire particulièrement les follicules primordiaux n'est pas bien connu. Une des possibilités qui a été suggérée est l'activation de la voie apoptotique des ovocytes et des cellules de la granulosa (Springer *et al.*, 1996; Kao *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2001). Une autre possibilité est que le VCD et ses métabolites interagissent avec la voie de signalisation de Kit/KitL qui est un facteur essentiel pour la survie des follicules primordiaux et petit primaires (Fernandez *et al.*, 2008).

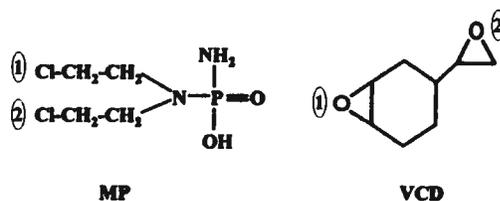


Figure 11 : La structure des métabolites ovotoxiques (MP et VCD) contenant deux groupes réactifs.

Nous avons exploré une autre possibilité: l'endommagement de l'ADN. Ce mécanisme pourrait être commun à tous les produits toxiques ciblant particulièrement les follicules primordiaux. Nous avons démontré que des cassures à doubles brins (DSBs) sont présentes dans les ovocytes des follicules après une exposition *in vitro* à la moutarde

phosphoramidée (MP), le métabolite actif du cyclophosphamide (CPA) (Petrillo *et al.*, en préparation). Étant donné que nous avons montré une différence de sensibilité à la MP entre les souris et les rattes *in vitro*, nous avons effectué des tests avec des ovaires de souris et rattes afin d'observer si le VCD causait des DSBs.

Ces expériences et résultats sont une contribution dans le cadre d'une collaboration avec le Dre PB Hoyer de l'Université d'Arizona (Tucson, AZ). J'ai effectuée toutes les cultures d'ovaires de souris et toutes les analyses dans notre laboratoire. Les cultures d'ovaires de rattes Fischer 344 ont été effectuées dans le laboratoire de Dre PB Hoyer. J'ai effectuée les analyses de ces résultats dans notre laboratoire.

## **Méthodologie**

### *-Cultures in vitro*

Le VCD a été dilué dans le milieu de culture juste avant d'être ajouté aux puits des plaques de cultures. Les ovaires contrôles n'ont pas été exposé au VCD.

*Souris* - Des ovaires de souris CD-1 ont été prélevés de nouveaux-nés de 4 jours et mis en culture. Au 4<sup>e</sup> jour de culture, les ovaires ont été exposés au VCD (5, 10, 20 et 30  $\mu\text{M}$ ) pour déterminer quelle(s) concentration(s) causeraient la perte significative des follicules primordiaux. La méthode de culture utilisée est identique à celle décrite dans (Petrillo *et al.*, en préparation). Les ovaires fixés 8 jours après l'exposition ont été utilisés pour le comptage de follicules. À partir de ces résultats, la deuxième série d'expériences, utilisant les mêmes conditions de culture à celle décrite, était pour déterminer préliminairement si le VCD causait des DSBs. Les expositions pour les analyses IHC (24 h et 4 jours) incluaient un groupe témoin et deux concentrations de VCD (10 et 30  $\mu\text{M}$ ). Les deux concentrations de VCD ont été choisies pour en avoir une qui cause et une qui ne cause pas la perte significative des follicules primordiaux respectivement.

*Rattes* - Les ovaires de rattes Fisher 344, provenant du laboratoire de Dre Hoyer, ont été cultivés d'une manière similaire mais continuellement exposés au VCD dès le jour 0 de culture. L'exposition de 24 h incluait un groupe exposé à 30  $\mu$ M VCD. L'exposition continue de 8 jours incluait deux concentrations de VCD (20 et 30  $\mu$ M). Les échantillons de rattes étaient uniquement pour des analyses d'IHC.

*-Comptage de follicules*

Le nombre de follicules ovariens sains a été déterminé dans toutes les douze sections tel que décrit dans le manuscrit (Petrillo *et al.*, en préparation). Voir l'article pour les détails concernant la préparation des échantillons et l'histologie.

*-IHC*

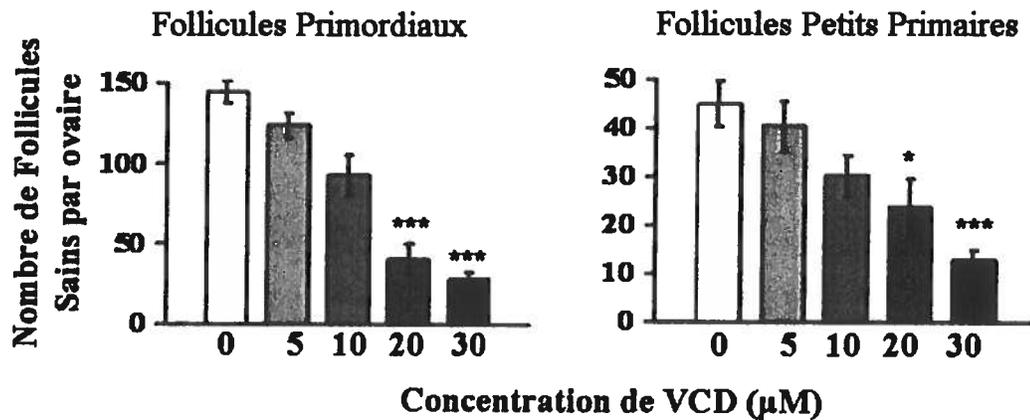
La préparation des échantillons et l'analyse IHC a été faite comme décrit dans le manuscrit (Petrillo *et al.*, en préparation). En bref les ovaires de souris CD-1 et rattes F344 ont été analysés pour des foyers de la forme phosphorylée de l'histone H2AX ( $\gamma$ H2AX). Les dilutions de l'anticorps primaire (1 :50,  $\gamma$ H2AX, Upstate) et secondaire (1 :75, biotinylé de lapin, Vector Laboratories) étaient identiques à celles de le manuscrit (Petrillo *et al.*, en préparation).

*-Statistiques*

Les valeurs des nombres de follicules correspondent à la moyenne  $\pm$  écart-type de la moyenne. Les données n'avaient pas une distribution normale. Par conséquent un test non paramétrique Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc Dunn a été effectué à l'aide du logiciel GraphPad Prism5.

## Résultats

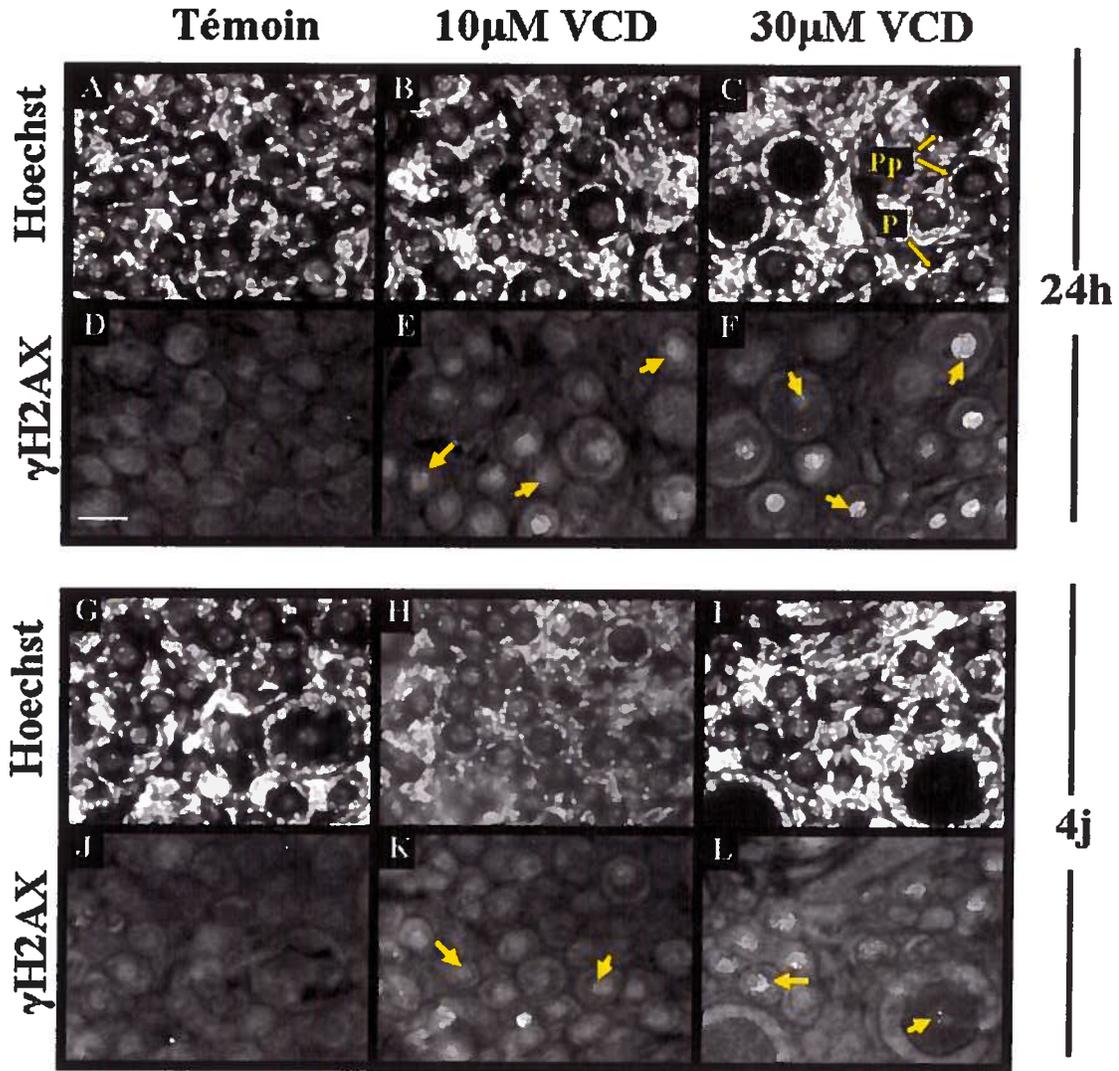
Le comptage du nombre de follicules pour chaque stade folliculaire a été effectué sur les ovaires de souris CD-1 exposés au VCD *in vitro*. Les résultats du comptage folliculaire démontrent qu'une seule exposition au  $\geq 20 \mu\text{M}$  VCD a réduit significativement le nombre de follicules primordiaux et petits primaires ( $p < 0,05$ , Figure 12).



**Figure 12 :** Nombre de petits follicules dans les ovaires de souris cultivés 8 jours après une exposition à différentes concentrations de 4-vinylcyclohexène diépoxyde (VCD). Des ovaires de souris CD-1 ont été prélevés de nouveaux-nés de 4 jours et isolés avant d'être mis en culture et exposés au jour 4 de culture tel que décrit dans l'article (Pettillo *et al.*, en préparation). Le nombre de follicules ovariens sains a été compté toutes les douze sections. Les valeurs correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM. Les astérisques rapportent une différence significative avec les témoins, \* =  $p < 0,05$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ,  $n = 15-20$  ovaires dans 5-6 expériences différentes.

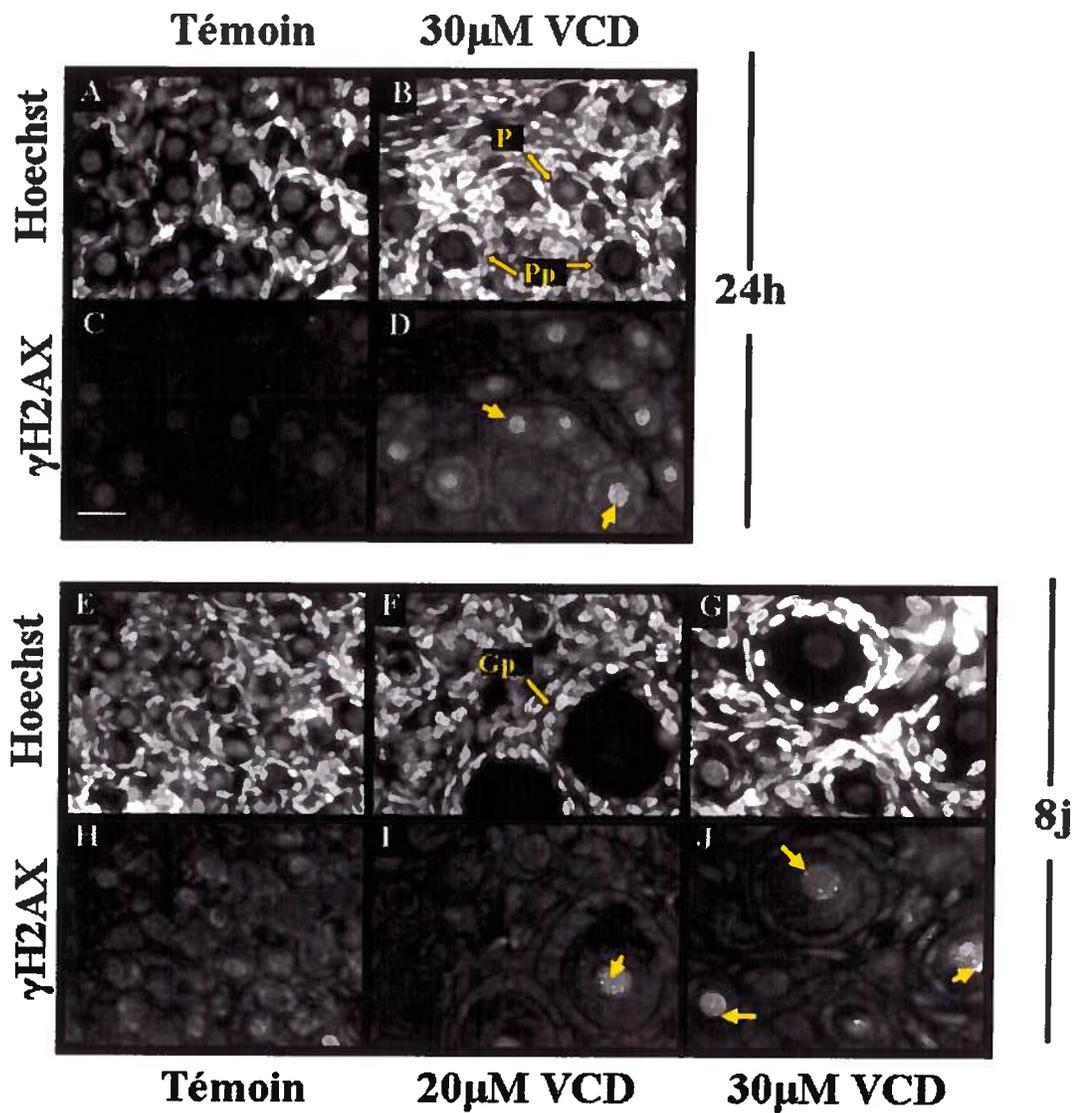
Les ovocytes (follicules primordiaux et petits primaires) et quelques cellules de la granulosa (grands primaires et petits secondaires) étaient pycnotiques dans les échantillons décrit ci-dessus. Le VCD semble affecter les ovocytes, spécifiquement chez les petits follicules quiescents. Des foyers  $\gamma\text{H2AX}$  étaient présents dans des noyaux des ovocytes dans tous les stades folliculaires présents dans les ovaires exposés au VCD (10 et 30  $\mu\text{M}$ , plus fréquemment chez les petits follicules et rarement dans les cellules de la granulosa (Figure 13). Ils semblaient plus nombreux après une exposition à 30  $\mu\text{M}$  (Figure 13 F, L), qui réduit significativement le nombre de petits follicules,

que à 10  $\mu\text{M}$  (Figure 13 E, K). Ces résultats sont similaires aux changements que nous avons observés lors du comptage de follicules.



**Figure 13** : Immunomarquage pour  $\gamma\text{H2AX}$  dans des ovaires de souris CD-1 nouveau-nés de 4 jours et exposés pour 24 h ou 4 jours au VCD au jour 4 de la culture. Les photos du haut A-C et G-I montrent le marquage du Hoeschst (noyaux) à 24 h et 4 jours respectivement. Celles du bas (D-F et J-L) montrent le marquage des foyers  $\gamma\text{H2AX}$  (flèches) à 24 h et 4 jours pour les mêmes sections respectivement. Les différents stades folliculaires marqués pour  $\gamma\text{H2AX}$  sont montrés (P= primordial, Pp= Petit primaire). La barre représente 10  $\mu\text{m}$ .

Les foyers  $\gamma$ H2AX étaient aussi présents dans des ovaires cultivés de ratte exposées au VCD d'une façon continue pendant 24 h ou 8 jours dès le jour 0 de culture. Ces expériences avec des ratte Fischer 344 faisaient partie de tests préliminaires (n =1-2 ovaires(s) par condition pour chaque point de temps dans une expérience). Les foyers de  $\gamma$ H2AX étaient présents dans les noyaux des ovocytes de tous les stades folliculaires après les expositions au VCD. Les ovocytes des ovaires témoins avaient très peu de foyers comparé aux groupes exposés (Figure 14). Il semblait avoir plus de foyers dans les ovocytes des ovaires (8 jours) exposés à 30  $\mu$ M VCD, une concentration qui cause la perte de follicules primordiaux, comparé aux ovaires témoins ou exposés à 10  $\mu$ M VCD (Figure 14, E-J).



**Figure 14 :** Immunomarquage pour  $\gamma$ H2AX dans des ovaires de rattes Fischer 344 nouveaux-nés de 4 jours et exposés au VCD continuellement pour 24 h ou 8 jours à partir du jour 0 de culture. Les photos A-B et E-G montrent le marquage obtenu avec Hoeschst à 24 h et 4 jours qui permet d'observer l'ADN respectivement. Celles du bas C-D et H-J montrent le marquage des foyers  $\gamma$ H2AX (flèches) à 24h et 8 jours pour les mêmes sections respectivement. Les différents stades folliculaires marqués pour  $\gamma$ H2AX sont montrés (P= primordial, Pp= Petit primaire, Gp = grand primaire). La barre représente 10  $\mu$ m.

## Discussion

Les stades folliculaires affectés par le VCD sont aussi ceux affectés par la MP. Chez les souris CD-1, le nombre de follicules primordiaux et petits primaires était significativement réduit après une exposition *in vitro* de  $\geq 20 \mu\text{M}$  VCD. Lors des expositions à la MP *in vitro*, les follicules primordiaux et petits primaires étaient significativement réduits avec des concentrations de  $\geq 3 \mu\text{M}$  et  $\geq 0,1 \mu\text{M}$  MP respectivement (Petrillo *et al.*, en préparation). Ces données suggèrent que la MP est plus toxique que le VCD. Ils suggèrent aussi que les follicules petits primaires sont aussi sensibles au VCD que les primordiaux.

Il est difficile de comparer précisément les résultats d'IHC pour les souris et les rattes parce que les conditions de culture (temps d'exposition et culture et concentrations de VCD utilisées) étaient différentes. Les données de la littérature suggèrent que les ovaires de rattes (F344) sont plus résistantes au VCD *in vitro* que ceux de souris, si on compare les concentrations qui causent la perte de follicules pour chaque espèce (Devine *et al.*, 2002; Devine *et al.*, 2004). La différence de sensibilité entre les espèces de rongeurs pourrait être attribuée aux différences physiologiques des ovaires. Une étude *in vivo* effectuée chez les souris C57BL/6 et les rattes F344 a montré que les souris étaient plus sensibles au VCD que les rattes. Cette différence est liée à la présence ou non du récepteur d'aryle d'hydrocarbure (AhR) respectivement chez les rattes et souris (Thomson *et al.*, 2002).

La découverte des dommages à l'ADN (des cassures à doubles brins) dans les ovaires après une exposition *in vitro* au VCD est le fruit d'un «hasard». Nous pensons utiliser ces expériences comme contrôle négatif pour nos expériences avec la MP puisque le VCD n'a jamais été considéré comme génotoxique auparavant. L'un des mécanismes d'actions suggérés du VCD est l'apoptose (mort cellulaire) durant lequel des DSBs sont formés lorsque l'ADN est digéré en des fragments de 140pb. Toutefois nos résultats suggèrent que ce n'est pas l'apoptose "normale" qui est activée car les ovocytes contiennent des foyers individuels et distincts de  $\gamma\text{H2AX}$  et les noyaux ne sont pas marqués comme lors de la fragmentation de l'ADN pendant l'apoptose. Nous avons

découvert que des DSBs sont induits dans les ovaires de rattes F344 après une exposition continue au VCD (Figure 13), même après une exposition à une concentration (20  $\mu$ M) qui ne causait pas de pertes folliculaires significatives (Devine *et al.*, 2002).

Les différences de sensibilité au toxique (MP versus VCD) chez les rongeurs sont évidentes en se basant sur la dose ou la concentration nécessaire pour changer le nombre de follicules sains observé lors du comptage. Par contre, il serait possible que le même mécanisme d'action (ex. dommages à l'ADN) existe pour la MP et le VCD au niveau moléculaire, tel que suggéré avec les analyses. Ces différences et similarités entre les toxiques peuvent être associées à la complexité de leur métabolisme et les propriétés chimiques des métabolites (ex. sa nature lipophile et la taille) qui peuvent changer l'absorption des agents dans l'ovaire et les cellules.

En conclusion, ces résultats suggèrent qu'il existe une différence quantitative de sensibilité aux produits toxiques entre les rattes et souris. De plus, les foyers  $\gamma$ H2AX suggèrent qu'il y a un mécanisme commun entre les toxiques qui affectent les follicules primordiaux et petits primaires. Le groupe du Dre Hoyer cultive actuellement des ovaires de rattes de la même façon que nous. C'est-à-dire, exposer les ovaires de rattes une seule fois au jour 4 de culture et les récupérer 24h ou 8 jours après l'exposition. La quantification des foyers  $\gamma$ H2AX de souris CD-1 et de rattes F344 seront comparées pour que nous puissions faire plus d'analyses et des statistiques.