

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

CARACTÉRISATION ET IMPACT DES ISOFORMES D'AKT ET DE LA VOIE DE
SIGNALISATION PI3K/AKT DANS L'OVAIRE, SUR LA RÉSERVE OVARIENNE,
LA DYNAMIQUE FOLLICULAIRE ET DANS LE VIEILLISSEMENT OVARIEN

THÈSE PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE DU
DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
DADOU LIKONZA LOKENGO

MAI 2023

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire, de cette thèse ou de cet essai a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire, de sa thèse ou de son essai.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (PH. D.)

Direction de recherche :

Éric Asselin Directeur de recherche

Monique Cadrin Codirectrice de recherche

Jury d'évaluation de la thèse :

Éric Asselin Directeur de recherche

Monique Cadrin Codirectrice de recherche

Carlos Reyes-Moreno Président de jury

Alexandre Fisette Évaluateur interne

Claude Robert Évaluateur externe

À titre posthume.

*Je dédie cette thèse à mon épouse
Nadine NGONDE et à mes enfants Samuella, Samuel et
Carmel LOKENGO ainsi qu'à mes regrettés parents,
pour ce qu'ils représentent dans ma vie.*

REMERCIEMENTS

Premièrement, j'aimerais remercier mon Dieu, le très haut, créateur et maître des temps et des circonstances. De lui nous tirons vie, intelligence, force et tout ce qui est nécessaire pour l'aboutissement de tous nos projets dont cette thèse. Merci, Seigneur Jésus-Christ pour ta fidélité, je peux dire Eben Ezer.

Deuxièmement, j'aimerais remercier grandement mon directeur de recherche, Éric Asselin, d'avoir accepté mon intégration dans son équipe alors que nous ne nous connaissions pas avant. Je le remercie d'avoir cru en moi, de m'avoir supporté tout au long de ce cheminement dans ce domaine qui était pour moi très théorique et livresque au début. Éric, je te serai reconnaissant pour ton leadership, ton encadrement qui m'ont poussé au dépassement de soi et à plus de rigueur scientifique. Ton sens d'organisation dans la conduite de l'équipe de recherche et du laboratoire m'a permis de consolider et de refonder des caractéristiques des scientifiques. Ce, en facilitant ma participation aux congrès internationaux, par tes conseils, orientations et suggestions concernant mes idées, hypothèses et projets. Plus encore, travailler avec toi m'a permis d'étayer une autonomie intellectuelle et une expérience professionnelle solide. Aussi, beaucoup d'autres souvenirs sociaux et ton soutien pour moi resteront gravés en moi toute la vie. Tu resteras un des mentors qui m'auront permis de réaliser ce rêve grandiose.

Je remercie Monique Cadrin, ma codirectrice, pour ses remarques pertinentes et pointillées mêlées d'humilité qui m'ont permis d'étayer cette thèse. Au travers d'elle, je remercie le corps professoral du Département de biologie médicale de l'Université du Québec à Trois-Rivières pour leur contribution, notamment au travers de différents séminaires. En particulier, je remercie Patrick Narbonne de m'avoir facilité l'accès à son microscope stéréoscopique sans lequel, une bonne partie de cette thèse n'aurait pas pu se réaliser aisément.

J'aimerais remercier particulièrement un autre mentor, Justin Mboloko Esimo, pour son encadrement dans ma vie tant étudiante que professionnelle comme médecin, mais aussi pour

l'aboutissement à ce doctorat. Son leadership, sa passion pour la science, la recherche et son dévouement dans l'encadrement de la jeunesse et à la patientèle resteront pour moi une référence. Au travers de lui, je tiens à remercier tous mes maitres et encadreurs (que je ne saurai tous citer ici) de la Faculté de médecine de l'Université de Kinshasa. Ils et elles ont su semer en moi les ingrédients nécessaires et utiles à l'accomplissement de cette thèse.

Je remercie aussi Sophie Parent, malgré le court temps passé ensemble avec elle au laboratoire, pour ses judicieux conseils, son aide et son expertise technique dès mes premiers moments et pas au laboratoire. Sa disponibilité et sa bonne humeur demeurent des qualités qui me marqueront longuement.

Je remercie mes collègues du laboratoire qui ont été d'un précieux apport quant à leurs contributions techniques et intellectuelles, soutien et pour des moments passés ensemble. Je cite François Fabi et Pascal Adam, pour leurs aides dans la mise en place de certaines expérimentations et protocoles; Christian Mayemba, pour son apport dans les manipulations; Junie Huriette Chansi Kegni et Laurence Tardif, pour leurs conseils et aides techniques dans la réalisation de mes projets. Mais également Nicholas Thibodeau, Léa Renaud ainsi que les différent(e)s stagiaires pour des moments de collaboration passés dans le laboratoire.

J'adresse un remerciement particulier à mon épouse Nadine Ngonde Nanikundila ainsi qu'à mes chers enfants pour avoir supporté mes longues absences et surtout accepté de soutenir à tout point de vue mes difficiles décisions. Que vous trouvez ici ma reconnaissance profonde et la fierté de vous avoir comme famille! Laissez que cette thèse soit pour vous, mes enfants, un modèle de dévouement au travail et à la productivité. Au travers de vous, je remercie également mes frères et sœurs ainsi que ma belle-famille pour leur soutien tous azimuts.

Je ne saurais oublier de remercier le Programme canadien de bourses de la Francophonie qui, par l'octroi de sa bourse, m'a permis de compléter ce doctorat. Au travers de lui, mes remerciements vont au Canada et à mon pays, la République démocratique du Congo pour cette coopération bilatérale.

En fin à l'ensemble de personnes que j'ai côtoyées ces dernières années et qui ont permis, chacune à sa façon, d'accomplir ce rêve, dont le parcours aura été long et émaillé des rebondissements, je dis merci.

RÉSUMÉ

L'infertilité du couple représente un problème majeur de santé publique par sa prévalence qui tourne autour de 16 % ou plus. Parmi les causes féminines de celle-ci, les pathologies ovariennes tiennent une place déterminante. Au sein de l'ovaire, organe complexe et dynamique, se déroulent des processus biologiques nécessaires à la fertilité et à la bonne santé de la femme. Parmi ces processus, il y a la régulation de la réserve ovarienne (RO), la dynamique folliculaire, l'ovulation ainsi que le vieillissement ovarien (VO). Ils s'y déroulent également des processus pathologiques dont la diminution de la RO et l'insuffisance ovarienne prématurée (IOP). L'IOP est un problème de santé qui a pris de l'ampleur au cours des dernières décennies et pour lequel un effort particulier a été mis dans le développement de thérapies. Ce dernier appelle d'abord à l'élucidation des mécanismes qui entraînent la survenue de la pathologie. Les différents processus impliqués dans la dynamique de l'ovaire et le développement de pathologies exigent la participation des voies moléculaires de signalisation. La voie phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) /Akt en occupe une place centrale et elle est cruciale étant donné son implication dans la prolifération, la croissance, la différenciation et l'apoptose cellulaires. En effet, ces processus cellulaires sous-tendent les différents événements biologiques susmentionnés qui sont impliqués dans le fonctionnement normal de l'ovaire, mais aussi dans le développement de certaines pathologies ovariennes comme le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) et l'IOP. Akt existe sous trois isoformes (Akt1, Akt2 et Akt3) qui partagent jusqu'à 80 % d'homologie structurale, selon les espèces, bien qu'elles soient codées par trois gènes différents. Akt3 est l'isoforme d'Akt la moins exprimée et la moins étudiée dans divers organes, dont l'ovaire. Les données retrouvées dans la littérature établissent que les trois isoformes d'Akt possèdent certaines spécificités dans leurs localisations tissulaires et cellulaires. En dehors de leurs redondances fonctionnelles, elles possèdent des rôles spécifiques, voire opposés dans divers processus physiologiques et pathologiques. La participation d'Akt dans ces processus se fait en médiant l'action d'hormones et de facteurs de croissance. Cependant, bien qu'Akt soit impliqué dans les différents processus susmentionnés, les connaissances concernant l'implication des différentes isoformes d'Akt dans l'ovaire demeurent peu connues. Il nous est paru de ce fait important de cerner l'expression, la localisation ainsi que l'implication des isoformes d'Akt dans l'ovaire. Les hypothèses principales étudiées dans notre thèse sont les suivantes :

- 1) Les isoformes d'Akt sont différemment exprimées et régulées dans l'ovaire à travers le cycle œstral par la présence des stéroïdes ovariens.
- 2) Les stéroïdes ovariens ainsi que le 4-vinylcyclohexène diepoxide (VCD) régulent Akt de manière isoforme-spécifique.
- 3) Il existe une spécificité dans l'implication des isoformes d'Akt dans le processus du VO malgré les redondances possibles.
- 4) Akt3 pourrait jouer un rôle dans divers processus biologiques ovariens, particulièrement dans la préservation de la RO, la dynamique folliculaire et l'ovulation.
- 5) Akt joue un rôle crucial dans la protection de la RO et, de ce fait, pourrait être un élément de régulation dans la prévention de son épuisement précoce. Ainsi, dans le cadre de cette thèse, nous avons analysé l'expression des isoformes d'Akt dans l'ovaire au travers du cycle œstral et déterminé leurs implications dans le VO. Nous avons aussi porté une attention particulière sur l'effet de l'élimination d'Akt3 sur la RO, la dynamique folliculaire, le volume ovarien et l'ovulation. Cette étude permettra de mettre les bases pour envisager des thérapies spécifiques qui auront pour but de réduire entre autres, VO précoce le SPOK et l'IOP.

Dans un premier temps, nous avons analysé dans un modèle *in vivo* soit la souris C57 BL/6J, l'expression, la localisation et l'activation des isoformes d'Akt dans l'ovaire au travers du cycle œstral. Les résultats obtenus montrent que les isoformes d'Akt possèdent certaines spécificités quant à leur localisation dans les différents compartiments et structures ovariens ainsi que dans leur localisation subcellulaire dans les différents types cellulaires. De plus, leur expression, localisation et activation, au travers du cycle œstral, varient de manière isoforme-spécifique. Ces résultats suggèrent que la régulation des isoformes d'Akt est dépendante de la régulation hormonale propre à chaque phase du cycle. Par exemple, cette régulation pourrait se faire par la Follicle stimulating hormone (FSH) et l'œstradiol (E₂) en proestrus, la Luteinizing Hormone (LH) en œstrus, la progestérone en metestrus et diestrus. Ces variations spécifiques des isoformes d'Akt suggèrent qu'elles joueraient des rôles spécifiques, à côté de rôles redondants, dans des phases particulières du cycle œstral.

Dans un deuxième temps, notre travail s'est intéressé à la régulation des isoformes d'Akt par les stéroïdes ovariens grâce à un modèle moins complexe *in vitro* réalisé sur des cellules de la granulosa. Ces cellules président ensemble avec l'ovocyte au destin folliculaire et possèdent des récepteurs pour différentes hormones et molécules qui agissent sur les follicules. Les résultats nous suggèrent que la régulation de l'expression d'Akt1 et 2 par la dihydrotestostérone (DHT) et l'E₂ tend à se réaliser de manière isoforme-spécifique. L'activation des isoformes d'Akt et de certaines de leurs cibles par ces deux stéroïdes se fait significativement de manière opposée, mais non spécifique; l'E₂ augmente le niveau de leur activation tandis que la DHT le diminue.

Dans un troisième temps, nous avons étudié *in vivo* l'implication d'Akt3 sur la dynamique folliculaire et l'ovulation grâce à un modèle de *Knock out* (KO) constitutif (*Akt3*^{-/-}). Le volume ovarien était diminué de manière significative dans toutes les phases du cycle œstral chez les souris *Akt3*^{-/-}. Nos résultats ont aussi démontré que l'élimination d'Akt3 entraîne une diminution significative de la RO et une augmentation des follicules secondaires chez les souris âgées de 45 jours. Ces résultats suggèrent que Akt3 joue un rôle de frein à la sortie des follicules du pool de la RO. Nous avons observé également une baisse significative du nombre de corps jaunes chez les souris *Akt3*^{-/-} âgées de 100 jours comparativement aux souris de type sauvage. Ces observations suggèrent qu'Akt3 jouerait aussi un rôle dans l'ovulation et par conséquent la formation des corps jaunes. Ces données suggèrent de nouveaux rôles pour Akt3 dans la physiologie ovarienne.

Finalement, en vue d'étudier le rôle des isoformes d'Akt dans le VO/épuisement de la RO, nous avons induit le VO *in vitro* et *in vivo*, à l'aide d'un traitement avec le 4-vinylcyclohexène diépoxyde (VCD) un agent ovo-toxique ciblant les follicules primordiaux et primaires. Nous avons analysé l'expression ainsi que l'activation des isoformes d'Akt. Nos résultats montrent qu'*in vitro*, les isoformes d'Akt sont régulées à un double niveau par le VCD. Au niveau protéique, la quantité des trois isoformes d'Akt et de leurs cibles (Bad (pro-apoptotique), Foxo3a (facteur de transcription), GSK3β (métabolisme du glucose) et mTOR (serine/thréonine kinase) est significativement réduite. *In vitro* le VCD réduit significativement l'activation de deux isoformes étudiées (Akt1 et Akt2) ainsi que de leurs cibles moléculaires susmentionnées. Au niveau transcriptionnel, nous avons aussi observé que l'expression (ARNm) est régulée à la baisse pour Akt1 et Akt3. Cependant, *in vivo*, bien qu'en induisant le VO, des effets du VCD sur les isoformes d'Akt n'ont pas été observés. Ces résultats permettront

d'orienter des études futures sur les stratégies à développer pour cibler les isoformes d'Akt dans le traitement du VO.

En conclusion, chacune des études conduites dans cette thèse nous a permis de cerner encore mieux la régulation et les rôles des isoformes d'Akt dans l'ovaire. Notre travail servira des bases pour des études futures en vue, par exemple, de développer des stratégies qui ciblent les isoformes d'Akt pour des thérapies concernant entre autres les patientes à risque du VO précoce ou d'infertilité d'origine ovarienne.

Mots-clés : AKT, PI3K, réserve ovarienne, ovulation, folliculogénèse, vieillissement ovarien, insuffisance ovarienne, 4-vinylcyclohexène diépoxyde, androgènes, œstrogènes, cycle œstral.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iv
RÉSUMÉ	vii
LISTE DES FIGURES	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xv
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 Anatomie et régulation endocrinienne de l’ovaire	1
1.1.1 Anatomie macroscopique et microscopique de l’ovaire	2
1.1.2 Microscopie et dynamique fonctionnelle des follicules	4
1.1.3 Régulation fonctionnelle hypothalamo-hypophysaire (HT-HP) et interne de l’ovaire.....	6
1.2 Réserve ovarienne et dynamique de la croissance folliculaire.....	10
1.3 Vieillesse ovarien, infertilité et ses autres conséquences	15
1.4 Aspects moléculaires de la formation de la réserve ovarienne, la dynamique folliculaire, du vieillissement ovarien et implication de la voie PI3K/Akt.....	19
1.5 Voie de signalisation PI3K/Akt	25
1.5.1 Structure, isoformes, activation et régulation d’Akt	26
1.5.2 Cibles moléculaires d’Akt impliquées dans la dynamique folliculaire, la réserve ovarienne et le vieillissement ovarien.....	29
1.6 Interaction entre la voie PI3K/Akt et les hormones régulant les fonctions endocrines de l’ovaire.....	32
1.7 Les traitements hormonaux chez la femme et leur impact sur l’ovaire	33
1.7.1 Les œstrogènes	34
1.7.2 Les androgènes.....	35
1.8 Pathologies ovariennes retentissant sur la folliculogénèse et impliquant la voie PI3K/Akt : cas du SOPK.....	36
1.9 Problématique, hypothèses et objectifs de la recherche.....	37
1.10 Choix du modèle expérimental, correspondances avec la femme et éléments spécifiques du cycle œstral.....	39

CHAPITRE II	
MATÉRIEL ET METHODES.....	46
2.1 Animaux et procédures d'étude	46
2.2 Isolation et culture des cellules de la granulosa ovarienne	47
2.3 Induction du vieillissement ovarien par le 4-vinylcyclohexène diépoxyde	48
2.3.1 Expérimentation <i>in vitro</i>	48
2.3.2 Expérimentation <i>in vivo</i>	48
2.4 Traitements avec les stéroïdes ovariens réalisés sur les cellules de la granulosa	49
2.5 Frottis vaginal pour détermination des phases du cycle œstral.....	49
2.6 Histologie ovarienne, compte de follicules, de corps jaunes et calcul du volume ovarien.....	49
2.6.1 Compte de follicules ovariens et de corps jaunes	49
2.6.2 Calcul du volume ovarien	50
2.7 Immunohistochimie et immunocytochimie.....	51
2.8 Immunofluorescence	52
2.9 Extraction de protéines et Western blot	53
2.10 Extraction de l'ARN et RT-qPCR.....	54
2.11 Analyses statistiques	55
2.12 Considérations éthiques	55
CHAPITRE III	
RÉSULTATS	56
3.1 Expression des isoformes d'Akt dans les différents compartiments et structures ovariens	56
3.2 Localisation subcellulaire, intensité et activation des isoformes d'Akt au cours du cycle œstral.....	58
3.3 Validation du Knock out d'Akt3 dans notre modèle	64
3.4 La déficience en Akt3 impacte la réserve ovarienne et la dynamique folliculaire	65
3.5 L'élimination d'Akt3 est accompagnée de la diminution des corps jaunes et du volume ovarien.....	69
3.6 Validation du modèle de cellules de la granulosa.....	73
3.7 Expression et localisation des isoformes d'Akt dans les cellules de la granulosa.....	74
3.8 Régulation de l'expression et de la localisation des isoformes d'Akt par les stéroïdes ovariens	74

3.9	Impact du traitement stéroïde sur la phosphorylation des isoformes et des cibles d'Akt	78
3.10	Validation du modèle de vieillissement ovarien induit par le 4-vinylcyclohexène diépoxyde (VCD).....	81
3.11	Effets du VCD sur l'expression protéique, l'activation des isoformes d'Akt et sur l'expression de la caspase-3 clivée.....	84
3.12	Régulation de l'expression des ARNm des isoformes d'Akt par le VCD	89
3.13	Impact du VCD sur l'expression d'Akt total, sur l'expression et la phosphorylation des cibles d'Akt.....	91
CHAPITRE IV		
DISCUSSION.....		94
4.1	Les isoformes d'Akt sont différemment exprimées dans les compartiments et structures ovariens.....	94
4.2	La localisation, l'intensité et l'activation des isoformes d'Akt varient de manière isoforme-spécifique au cours du cycle œstral	97
4.3	La déficience d'Akt3 impacte la réserve ovarienne et la dynamique folliculaire.....	101
4.4	L'effet de la déficience d'Akt3 sur l'ovulation.....	103
4.5	La déficience en Akt3 entraine la diminution du volume ovarien	104
4.6	Les isoformes d'Akt dans les cellules de la granulosa ovarienne et leur régulation par les stéroïdes ovariens	105
4.7	Régulation des isoformes d'Akt dans le vieillissement ovarien induit par le VCD.....	109
4.8	Les cibles d'Akt dans le vieillissement ovarien et leur régulation par les stéroïdes ovariens	112
4.9	Limitations méthodologiques.....	114
CHAPITRE V		
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		116
5.1	Conclusion	116
5.2	Perspectives.....	119
5.2.1	Perspectives à court terme.....	120
5.2.2	Perspectives à long terme.....	121
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		123
ANNEXE		
LES DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES DU CHAPITRE II ET III.....		138

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Anatomie macroscopique des organes reproducteurs. A) humains, B) souris	2
1.2 Schémas illustrant différentes structures dans une coupe microscopique de l'ovaire.....	3
1.3 Différentes catégories folliculaires dans l'ovaire	6
1.4 Cinétiques des hormones durant le cycle menstruel féminin	8
1.5 Représentation schématique de la perte folliculaire, de la qualité ovocytaire et des différents événements reproductifs en fonction de l'âge de la femme.....	16
1.6 Représentation schématique des isoformes d'Akt.....	27
1.7 Représentation schématique des cibles moléculaires d'Akt impliquées dans l'ovaire.....	30
1.8 Profil hormonal sérique durant les différentes phases du cycle œstral chez la souris ..	41
3.1 Les isoformes d'Akt s'expriment différemment dans les structures et compartiments ovariens.....	57
3.2 Localisation subcellulaire, intensité et activation des isoformes d'Akt au travers du cycle œstral chez les souris C 57 BL/6J de type sauvage âgées de 100 jours	63
3.3 Validation de l'élimination d'Akt3.....	64
3.4 La déficience en Akt3 impacte la réserve ovarienne et la dynamique folliculaire	68
3.5 Effet de l'élimination d'Akt3 sur le corps jaune, la fertilité et le volume ovarien	72
3.6 Validation du modèle des cellules de la granulosa ovarienne	73
3.7 Régulation de l'expression et localisation des isoformes d'Akt par les stéroïdes ovariens.....	77
3.8 Impact du traitement stéroïdien sur Akt total, la phosphorylation de ses isoformes et celle de ses cibles.....	80

3.9	Compte de follicules et validation du modèle de vieillissement ovarien induit par le 4-vinylcyclohexène diépoxyde (VCD)	83
3.10	Effets du 4-vinylcyclohexène diépoxyde (VCD) sur l'expression protéique, l'activation des isoformes d'Akt et sur l'expression de la caspase-3 clivée.....	87
3.11	Localisation et intensité des isoformes d'Akt à la suite du traitement avec le VCD...	89
3.12	Régulation de l'expression des ARNm des isoformes d'Akt par le 4-vinylcyclohexène diépoxyde (VCD).....	90
3.13	Le 4-vinylcyclohexène diépoxyde (VCD) induit la réduction d'expression d'Akt total, de l'expression et de l'inactivation de ses cibles.....	93
5.1	Représentation schématique de principales implications des isoformes d'Akt et de leur signalisation dans l'ovaire	119
Sup.1	Différentes phases du cycle œstral	138
Sup.2	Ovaires représentatifs des contrôles négatifs des anticorps dirigés contre les isoformes d'Akt	139

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AMH	Hormone antimüllérienne
AMP	Assistance médicale à la procréation
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AR	Androgen receptor
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATM	Ataxie-télangiactasie
Bad	BCL-2 associated agonist of cell death
BMP	Bone morphogenic protein
CBP	CREB binding protein
CG	Cellules de la granulosa
CNX43	Connexine 43
CRISPR	Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées
D	Diestrus
DHT	Dihydrotestostérone
E	Œstrus
E ₂	Œstradiol
ER α/β	Récepteurs alpha/bêta des œstrogènes
FMR	Fragile X mental retardation
FOXO3a	Forkhead box O3a
FSH	Follicle-stimulating hormone

FSH-RBI	FSH receptor binding inhibitor
bFGF	basic fibroblast growth factor
GDF	Growth differentiation factor
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 bêta
HT-HP	Hypothalamo-hypophysaire
ICC	Immunocytochimie
IGF	Insulin growth factor
IHC	Immunohistochimie
IGFBP	Insulin growth factor binding protein
INHB	Inhibine B
IOP	Insuffisance ovarienne prématurée
KGF	Keratinocyte growth factor
KL	Kit Ligand
KO	Knock out
LIF	Leukemia inhibiting factor
LH	Luteinizing Hormone
M	Metestrus
mTOR	Mammalian target of rapamycin
OMI	Oocyte Maturation Inhibitor
P	Proestrus
p	Phosphorylé
p27	Protéine 27
PBS	Phosphate Buffer saline
PDGF	Platelet-derived growth factor

PFA	Paraformaldehyde
PDK1	3-phosphoinositide-dependent kinase 1
PH	Pleckstrine Homology domain
PIP2	Phosphatidylinositol (4, 5)-biphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
RO	Réserve ovarienne
RTK	Récepteurs à tyrosine Kinase
SDF1	Chemo attractive cytokine Stromal derived factor 1
SOPK	Syndrome des ovaires polykystiques
SST	Somatostatine
UI	Unité internationale
VCD	4-vinylcyclohexène diépoxyde
VO	Vieillissement ovarien
WB	Western blot
WT	Wild type

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Anatomie et régulation endocrinienne de l'ovaire

L'appareil reproducteur féminin de la femme, tel qu'illustré en figure 1.1, est composé de plusieurs organes internes et externes. Les organes génitaux externes constituent la vulve qui est composée du vestibule vaginal, du clitoris, des lèvres et des glandes annexes ainsi que du mont de pubis. Ces organes externes sont situés en dehors de la cavité abdomino-pelvienne; ils jouent un rôle dans la copulation et permettent l'entrée du sperme dans les voies génitales féminines (1). Les organes génitaux internes sont situés dans le pelvis féminin et sont constitués du tiers supérieur du vagin, de l'utérus, des trompes de Fallope et des ovaires (2). Le vagin, l'utérus et les trompes forment les voies génitales féminines et jouent un rôle important dans le passage des spermatozoïdes. Elles permettent également la rencontre et la fusion d'un de ces derniers avec l'ovule lors du processus appelé fécondation qui se déroule au niveau du tiers externe des trompes. L'utérus va ensuite servir de lieu d'implantation et de développement de l'embryon et va jouer un rôle dans le processus de la parturition (2, 3). Étant donné l'étendue de la matière et la complexité de ces organes, nous allons nous concentrer seulement, dans les lignes qui suivent, à la description de l'ovaire qui est au cœur de notre sujet d'intérêt.

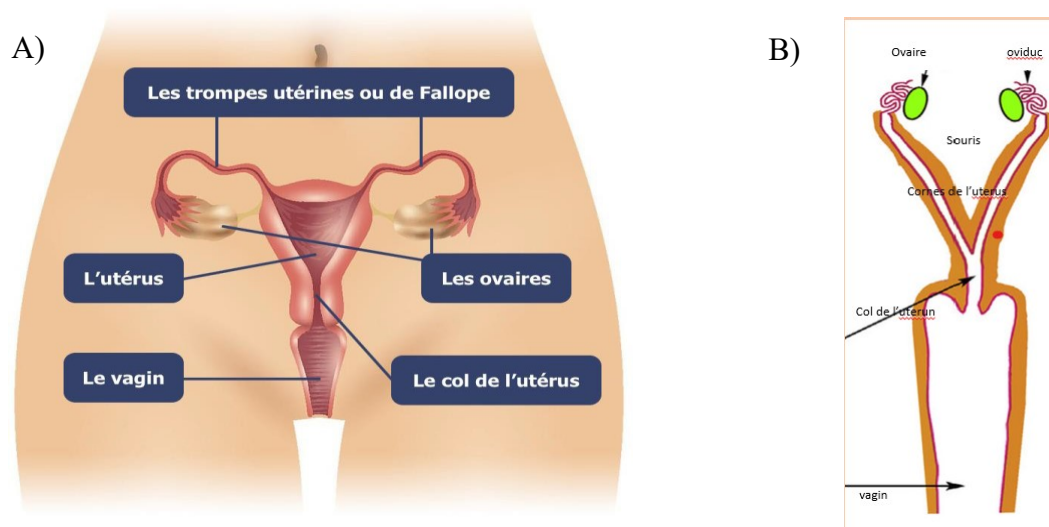


Figure 1.1 Anatomie macroscopique des organes reproducteurs. A) humains, B) souris. (Tirée de <https://acteurdemasante.lu/fr> et DOI :[10.1016/j.diff.2019.07.004](https://doi.org/10.1016/j.diff.2019.07.004))

1.1.1 Anatomie macroscopique et microscopique de l'ovaire

Les ovaires constituent les glandes génitales féminines principales à l'opposé des glandes génitales annexes relevées ci-dessus. Ils jouent une fonction biologique complexe et double qui consiste en la sécrétion hormonale comme celle des androgènes, des œstrogènes et de la progestérone (fonction endocrine), et en la production cyclique des ovules (fonction exocrine). De ce point de vue, les ovaires sont des organes déterminants de la fertilité féminine (2). C'est grâce aux sécrétions hormonales venant de ces ovaires que dépendent en grande partie la physiologie féminine. Sur le plan anatomique, les ovaires sont qualifiés, avec les trompes, d'annexes utérines. Cependant, leur rôle est plutôt principal. Les ovaires, au nombre de deux, sont localisés dans le pelvis féminin, en général dans la fossette para-utérine derrière le ligament large grâce à différents ligaments. Ils sont des organes complexes notamment en raison de la dynamique qui s'y déroule. En effet, ils changent non seulement de position, mais également de volume selon les phases du cycle menstruel, la parité, l'état gravidique et l'âge de la femme, et ce, dans un contexte physiologique (2).

Sur le plan microscopique, cette complexité se manifeste par le polymorphisme de sa structure. L'ovaire est recouvert d'un épithélium et est formé de deux zones : une centrale, la médullaire et l'autre périphérique, la corticale. Cette corticale est constituée du stroma dans

lequel se trouvent les follicules à différents stades de maturité ou de croissance comme illustrés sur la figure 1.2 ci-dessous.

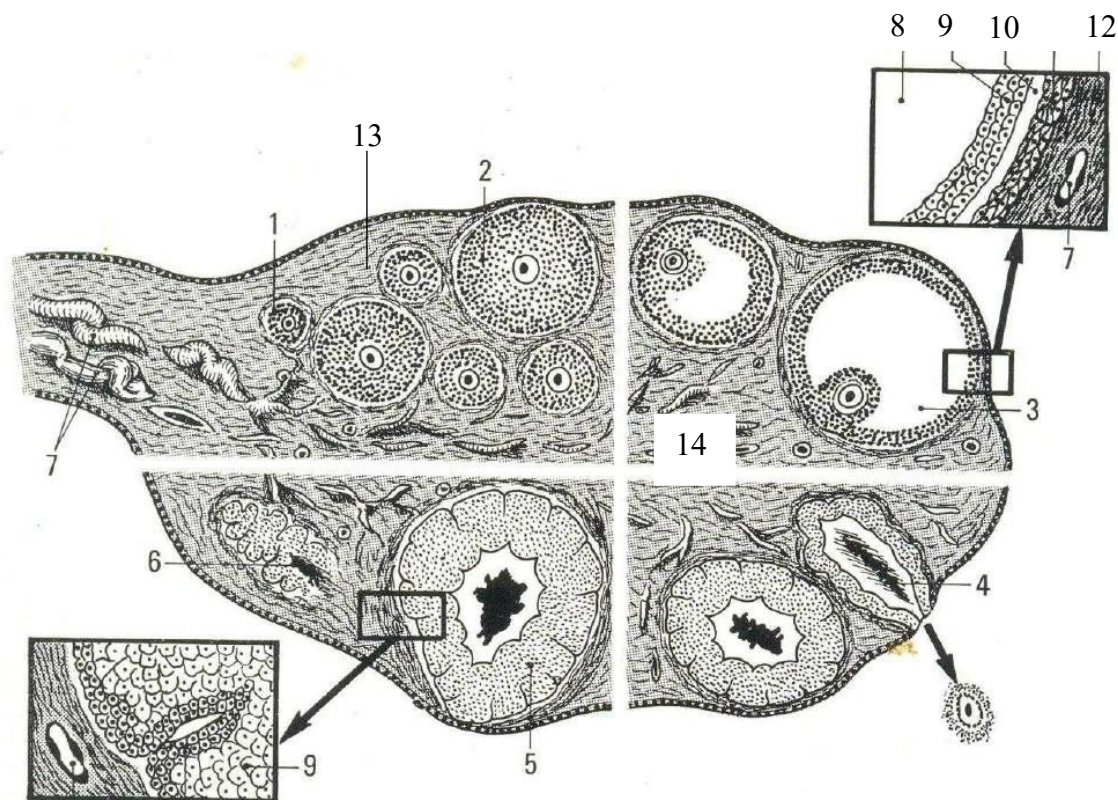


Figure 1.2 Schémas illustrant différentes structures dans une coupe microscopique de l'ovaire.

- (1) Follicule primordial. (2) Follicule secondaire. (3) Follicule mature. (4) Follicule rompu et libération de l'ovule. (5) Corps jaune. (6) Corps fibrohyalin. (7) Capillaires. (8) Liquide folliculaire. (9) Granulosa. (10) Vitrée. (11) Thèque interne. (12) Thèque externe. (13) Corticale. (14) Médullaire. (Tirée et adaptée de Kamina, 2002.)

Nous reviendrons plus loin sur ces différents follicules dans la section réservée à la dynamique folliculaire. Notons que les follicules sont des structures grossièrement sphériques et répartis en ordre croissant en primordiaux, primaires, secondaires et matures. Il y a aussi des follicules en atrophie.

Un follicule primordial est constitué en son centre d'un ovocyte primordial qui possède un noyau peu volumineux ayant un nucléole apparent et un réseau chromatique délicat,

un cytoplasme ayant de fines granulations et présentant près du noyau une structure arrondie appelée corps vitellin. Outre l'ovocyte, le follicule primordial est entouré d'une seule couche de cellules aplaties. Le follicule est qualifié de primaire lorsque cette assise cellulaire devient cubique ou cuboïdale. Son ovocyte s'agrandit, double ou triple de volume et son cytoplasme contient en plus des granulations fines, des granulations réfringentes de nature graisseuse (2, 4). Le follicule devient secondaire lorsque plus d'une couche de cellules entoure l'ovocyte. Son ovocyte devient de plus en plus large. Le follicule va devenir tertiaire ou antral quand il croît grâce à la prolifération des cellules de la granulosa, la croissance de l'ovocyte, et la constitution ainsi que le développement progressif d'une cavité centrale remplie de fluide, appelée antrum. Pendant ce temps, les cellules stromales entourant l'ovocyte et la granulosa se différencient en une couche double appelée la thèque (5).

1.1.2 Microscopie et dynamique fonctionnelle des follicules

Le follicule constitue l'unité fonctionnelle de l'ovaire et se trouve noyé dans le stroma ovarien. Ce stroma est un tissu conjonctif constitué d'éléments cellulaires fusiformes disposés en faisceaux, de fines fibres collagènes, de vaisseaux sanguins et lymphatiques, de nerfs ainsi que des composants ovariens spécifiques comme les cellules souches ovariennes. Il assure le renouvellement du contingent cellulaire en constant remaniement et sert de support structural et biochimique aux différentes cellules (2, 6).

Comme mentionné ci-dessus et repris dans la figure 1.3 ci-dessous, le follicule comprend une cellule germinale qu'est l'ovocyte entouré dans son stade mature de deux types de couches, la granulosa et la thèque. La granulosa entoure directement l'ovocyte. La thèque est externe et se continue avec le stroma. Le follicule mature possède également une cavité centrale appelée antrum. La thèque est alors divisée en deux couches, la thèque interne et la thèque externe. La thèque et la granulosa sont séparées par une couche bien distincte, la membrane propria ou la membrane basale. Ces différentes couches folliculaires possèdent une histologie et des fonctions bien distinctes (7). En effet, les cellules de la granulosa sont des cellules aplaties dans les follicules primordiaux, cubiques dans les follicules avancés. Puis, poursuivant le processus de

différenciation, elles auront un aspect des cellules épithéliales alors que les cellules de la thèque sont d'aspect fibroblastiques.

Les cellules de la thèque vont également se différencier plus tard et prendre un aspect épithélioïde pour la thèque interne. Au stade primaire, les gaps jonctions (jonctions communicantes constituées entre autres des connexines dont la CNX 43) apparaissent entre les cellules de la granulosa et facilitent la communication ainsi que les échanges entre elles. D'un autre côté, toujours au stade primaire, les cellules de la granulosa envoient des prolongements cytoplasmiques pour communiquer avec l'ovocyte (2, 5). C'est à partir du stade de follicule secondaire que le follicule est irrigué par une ou deux artérioles. Cette irrigation vasculaire permet ainsi que le follicule soit exposé aux molécules et substances qui circulent dans le sang comme les hormones en plus des molécules sécrétées localement (2). Dans le follicule antral mature, la granulosa est d'aspect mince au niveau du pôle superficiel du follicule, et à son pôle opposé elle forme un amas de cellules contenant l'ovule et qui est appelé *cumulus oophorus*. La granulosa joue un rôle sécrétoire dans la synthèse entre autres de l'hormone antimüllérienne (AMH), et des œstrogènes grâce à l'aromatisation des androgènes venus de la thèque interne. Elle sert également de support métabolique, de signalisation et d'apport nutritionnel pour la croissance et la maturation de l'ovocyte. Elle détient ainsi un rôle clé dans le destin du follicule entier. Le destin folliculaire est présidé de concert entre l'ovocyte qui en assure le rôle central et les autres cellules formant le follicule (granulosa, thèque) (8, 9). En ce qui concerne la thèque, la thèque interne contient des cellules polyédriques, de nombreux capillaires sinusoides et sécrète la folliculine, les androgènes, et aussi en partie les œstrogènes (2, 7). La thèque externe, qui présente un aspect membraneux conjonctif feuilleté, contient un réseau vasculaire qui permet de fournir les capillaires à la thèque interne. Dans l'ensemble, la thèque joue également un rôle dans le maintien de la structure du follicule (9).

Outre la sécrétion des hormones sexuelles féminines qui constitue leur fonction endocrine, les ovaires possèdent une fonction exocrine. Celle-ci consiste en l'ovulation, c'est-à-dire à la libération cyclique d'un ovule en vue d'une éventuelle fécondation. Après l'ovulation, le follicule se transforme en corps jaune qui va se mettre à sécréter de façon prépondérante la progestérone.

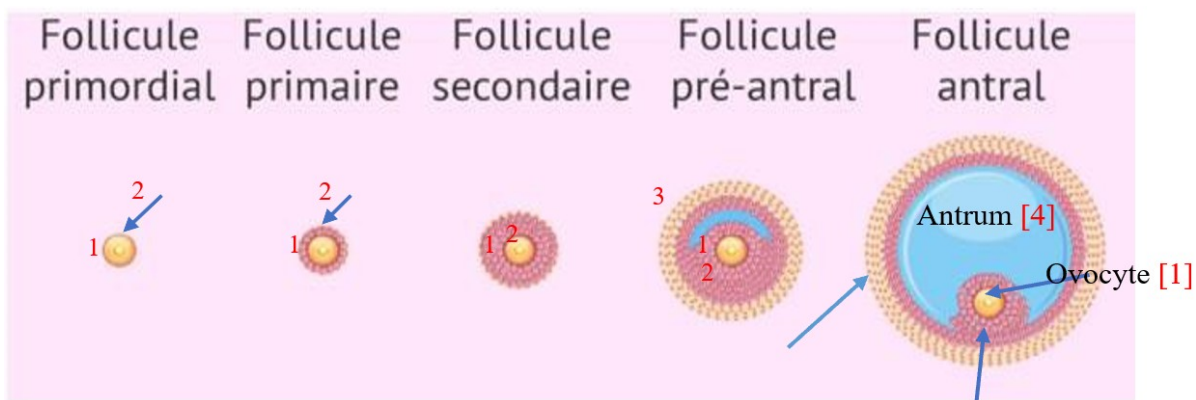


Figure 1.3 Différentes catégories folliculaires dans l’ovaire.
(Adaptée de <https://pmafertilite.com/>.)

1.1.3 Régulation fonctionnelle hypothalamo-hypophysaire (HT-HP) et interne de l’ovaire

L’ovaire est le siège d’interactions complexes qui aboutissent à la régulation de la croissance, de la sélection d’un nombre déterminé de follicules à ovuler selon les espèces, ainsi qu’à une sécrétion hormonale adéquate. Ces interactions se font entre l’ovaire et le système hypothalamo-hypophysaire dans le cadre de la régulation neuroendocrine. Elles se déroulent également entre les cellules de différents compartiments ovariens dans le cadre de la régulation paracrine. Enfin, elles concernent les sécrétions de certaines cellules sur elles-mêmes dans le cadre de la régulation autocrine.

Au sein de l’ovaire, la régulation de la sécrétion de la plupart des substances se fait de manière autocrine et paracrine notamment en ce qui concerne l’inhibition de la synthèse des œstrogènes. En effet, la sécrétion des œstrogènes est inhibée par plusieurs molécules sécrétées localement dont les androgènes, l’inhibine (INHB), la prolactine, la FSH-RBI (FSH-Receptor Binding Inhibitor) et la progestérone. Ces molécules agissent en bloquant l’activité de l’aromatase, et envoient les follicules en atresie par accumulation des androgènes. Ce mode de régulation met en évidence les rôles de substances intra- ovariennes dans la dynamique folliculaire (7). En dehors de la sécrétion des hormones, d’autres processus sont également régulés par cette double modalité de régulation, autocrine et paracrine : la maturation ovocytaire qui est bloquée *in vivo* au stade diplotène de la première division méiotique par l’Oocyte Maturation Inhibitor (OMI) et l’Adénine monophosphate cyclique (AMPc) jusqu’à la décharge

pré-ovulatoire de LH. Ce modèle est simplifié et plusieurs autres voies de signalisation sont aussi impliquées. La rupture de la paroi folliculaire lors de l'ovulation et la formation du corps jaune qui ne se réalisent qu'après la synthèse locale de prostaglandines (PG) et de la relaxine ainsi que de diverses enzymes protéolytiques. La synthèse de PG, de la relaxine et de ces diverses enzymes est consécutive à la décharge de la LH (7).

En ce qui concerne la régulation neuroendocrine de l'ovaire, son fonctionnement est sous le contrôle de l'hypophyse antérieure grâce notamment à la sécrétion de gonadotrophines qui sont des hormones glycoprotéiques. Il s'agit de la FSH et de la LH qui sont sécrétées de manière pulsatile chez les mammifères femelles. La FSH permet le développement folliculaire en agissant sur les cellules de la granulosa via ses récepteurs. Sa présence y entraîne entre autres l'expression des récepteurs de la LH afin de favoriser la sécrétion des stéroïdes ovariens. La LH quant à elle agit aussi au niveau de la thèque, et après l'ovulation, sur le corps jaune pour favoriser également la sécrétion des stéroïdes ovariens (7, 10). Ces deux hormones agissent continuellement de manière synergique particulièrement au milieu du cycle où elles atteignent leurs pics de sécrétion. Ce qui permet le déclenchement de l'ovulation. En dehors de ce pic, leurs quantités demeurent relativement faibles dans la circulation générale. La sécrétion de ces deux gonadotrophines est stimulée et modulée par la sécrétion pulsatile d'une autre hormone hypothalamique, la Gonadolibérine ou la Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH). La fréquence et l'amplitude de cette sécrétion pulsatile de GnRH sont elles-mêmes sous le contrôle de stéroïdes ovariens. L'hypothalamus reçoit ainsi des influences nerveuses et chimiques, puis va à son tour réguler la sécrétion des gonadotrophines. Cette pulsativité de la sécrétion de la GnRH est très importante dans la modulation de la sécrétion des gonadotrophines tout au long du cycle. En effet, une administration continue de la GnRH entraîne le phénomène de désensibilisation connu sous le terme de *down-regulation*. Celle-ci consiste pour une cellule, à la suite d'une stimulation externe, au blocage de ses canaux calciques nécessaires à la sécrétion d'une hormone, et en la diminution de l'expression des récepteurs hormonaux du stimulus (7, 10). Ce phénomène résulte, en ce qui concerne la GnRH, en l'inhibition de la sécrétion des gonadotrophines dans l'hypophyse. La sécrétion de GnRH détermine aussi le rapport entre les quantités de deux gonadotrophines. En effet, si la fréquence de sécrétion de GnRH diminue, le rapport LH/FSH diminue aussi, c'est-à-dire, il y a plus de sécrétion de FSH que de LH.

En fait, c'est ce qui se produit dans la première moitié du cycle menstruel avant l'ovulation. Dans la deuxième moitié du cycle, le phénomène est inversé. La sécrétion de GnRH est régulée de deux manières. La première manière, par le phénomène de *feed-back*, où les taux circulants des stéroïdes sexuels ovariens contrôlent la sécrétion de gonadotrophines généralement en sens inverse dans le cadre du *feed-back* négatif. En effet, des taux élevés de ces stéroïdes dans la circulation plasmatique vont freiner la sécrétion de GnRH. Lorsque leur taux diminue, la sécrétion de GnRH est stimulée. La sécrétion de LH semble être essentiellement contrôlée par celle de la progestérone et de l'E₂ alors que celle de la FSH est en plus contrôlée par les INHB et les activines sécrétées au niveau ovarien. Comme leurs noms l'indiquent, les INHB (complexe de protéines) s'opposent à la libération de la FSH tandis que les activines la stimule. L'INHB est sécrétée par les follicules en croissance notamment pour l'INHB B et permet de réguler le taux de FSH. Ces deux hormones représentent donc des marqueurs de la RO. Ainsi, un taux d'INHB bas entraîne le développement prématuré de follicules et est le témoin d'une perte importante de la RO. La baisse du taux d'INHB va se refléter également par un taux élevé de FSH. Il sied de signaler que dans le système reproducteur, il existe un phénomène de *feed back* positif, qui se produit au milieu du cycle menstruel. Dans ce cas, des niveaux élevés d'œstrogènes entraînent une stimulation de la sécrétion des gonadotrophines (10, 11). Ces différentes régulations établissent une cinétique bien coordonnée des hormones au cours du cycle menstruel comme relevé dans la figure 1.4 ci-dessous.

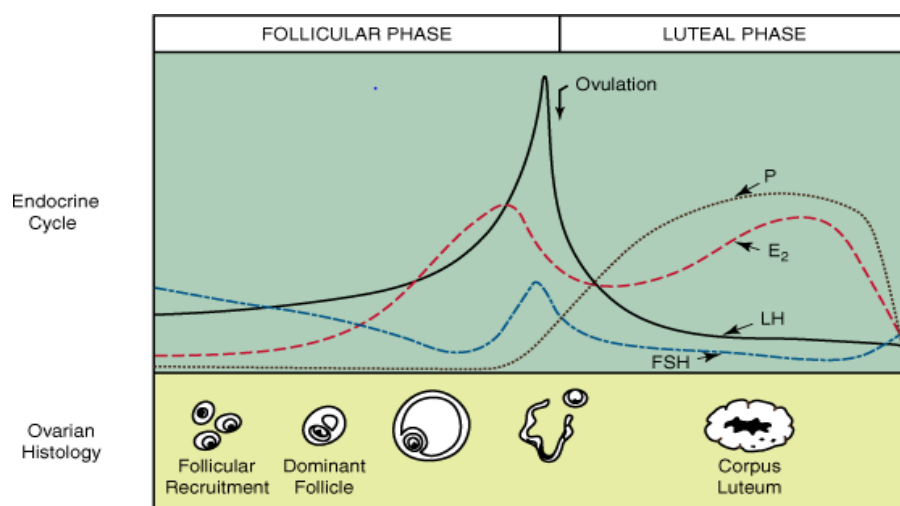


Figure 1.4 Cinétiques des hormones durant le cycle menstruel féminin.

P : progestérone, E₂ : œstradiol/ œstrogènes, LH : Luteinizing hormone, FSH : Follicle-stimulating hormone. (Tirée de Williams, 2008.)

Ainsi, au cours de la première phase du cycle menstruel ou la phase pré-ovulatoire, il y a sécrétion croissante des œstrogènes sous l'action de la FSH. La croissance folliculaire peut alors s'intensifier au niveau des ovaires grâce à la prolifération de cellules de la granulosa. Les œstrogènes sécrétés agissent aussi au niveau de l'endomètre et y entraînent la croissance et la prolifération cellulaires. Au milieu du cycle menstruel, lorsque le taux des œstrogènes atteint un niveau élevé (200 picogramme/l) pendant une durée de deux jours, il y aura une décharge ovulante lors du pic de la sécrétion de gonadotrophines. La décharge de gonadotrophines (particulièrement la LH) provoque alors la rupture du ou des follicules dominant selon l'espèce animale et l'ovulation. Après la rupture du ou des follicules dominants, dans la phase post-ovulatoire du cycle ou la phase lutéale, il y a baisse des œstrogènes. À la suite de l'ovulation, le follicule dominant se transforme en corps jaune dont les cellules sécrètent de la progestérone. Durant cette deuxième phase du cycle menstruel, le corps jaune ovarien produit également des œstrogènes. Ayant une durée de vie déterminée, le corps jaune va dégénérer; ce qui conduit à une chute du taux de la progestérone et des œstrogènes. La chute de ces deux hormones a pour conséquence la desquamation de l'endomètre et l'apparition des règles. Du point de vue hormonal, cette baisse d'œstrogènes et de la progestérone va entraîner l'élévation de la sécrétion des gonadotrophines essentiellement de la FSH en début du cycle et un autre cycle recommence (10, 11).

Outre la régulation neuroendocrine, il sied de relever une deuxième manière de réguler la sécrétion de la GnRH. En effet, le système nerveux central, grâce aux nombreuses connexions nerveuses dont dispose l'hypothalamus avec les différentes régions du système nerveux, peut aussi réguler la GnRH. C'est ce qui explique que la libération et la sécrétion de la GnRH sont aussi contrôlées par des substances comme les prostaglandines, la dopamine, l'endorphine ainsi que par de nombreuses autres substances. C'est également par le moyen du système nerveux que s'explique le rôle des émotions, du stress, de la nutrition et des substances psychotropes dans la reproduction en influençant la sécrétion de la GnRH (10, 11).

1.2 Réserve ovarienne et dynamique de la croissance folliculaire

Il a été longuement admis que les mammifères femelles naissent avec un nombre prédéterminé de follicules ovariens en stock. Une controverse existe cependant puisque des études réalisées par Johnson en 2004 ont montré l'existence chez la souris de cellules germinales en mitose (12, 13). Le débat n'est pas clos étant donné le caractère contradictoire de ces publications. Néanmoins, à un moment donné de leur vie, les mammifères femelles disposent d'un nombre de follicules au repos, et ce sont ces follicules au repos qui constituent ce qu'on appelle la *réserve ovarienne* (RO) (4, 5). Cette RO se constitue déjà depuis la vie intra-utérine chez les grands mammifères. Chez la souris elle se poursuit un peu après la naissance. La RO est constituée par les follicules primordiaux et les petits follicules primaires. En effet, des études ont montré que chez les bovins 60 % de follicules transitoires restent présents et marqués par la Bromo-deoxyuridine (un marqueur de la réplication de l'ADN) plusieurs mois après l'injection de celle-ci (4); ce qui suggère le caractère quiescent de cette catégorie de follicules. Aussi, un autre argument de ce caractère quiescent des follicules petits primaires est l'expression élevée du facteur de transcription FOXO3, qui bloque l'activation des follicules. En revanche, l'expression de FOXO3 chute drastiquement dans les follicules grands primaires (4, 14). Cette RO s'épuise continuellement depuis la vie intra-utérine par l'atrésie folliculaire par apoptose. L'atrésie constitue ainsi le mécanisme majeur de l'épuisement de follicules, car 90 % des follicules s'épuisent par cette voie. De plus, ce phénomène se poursuit durant toute la vie de la femelle et concernera les follicules de différents âges. L'atrésie des follicules plus jeunes est difficile à détecter sur le plan morphologique. Celle de follicules plus avancés peut l'être notamment par la vacuolisation du cytoplasme de l'ovocyte, son aspect éosinophilique et l'aspect pycnotique des noyaux de cellules de la granulosa (15, 16). À l'étape finale, l'apoptose aboutit à la dégradation des cellules avec constitution des corps apoptotiques qui vont être phagocytés par les macrophages (15). Un autre mécanisme d'épuisement de la RO est le phénomène de la croissance et de la maturation de follicules qui aboutissent à l'ovulation de façon cyclique. Cette deuxième voie d'épuisement est mineure, car chez la femme par exemple, seulement environ 400 follicules ovuleront durant toute sa vie (4). Ce deuxième mécanisme, également appelé folliculogenèse, témoigne de cette dynamique folliculaire complexe qui se déroule dans l'ovaire. Comme mentionné plus haut, un follicule est qualifié de primordial lorsqu'il est constitué de l'ovocyte entouré d'une couche de cellules de la granulosa aplaties;

il est dit transitoire lorsque cette couche contient un mélange de cellules aplaties et cuboïdes. Il devient primaire lorsque cette couche unique de cellules de la granulosa contient des cellules cuboïdes. Ces follicules de la réserve peuvent être gardés au repos pendant de nombreuses années grâce à l'action de l'AMH sécrétée par les follicules en croissance bien qu'*in vitro* dans les cultures cellulaires certains auteurs rapportent des effets contraires pour l'AMH. L'AMH s'oppose à l'action de Kit Ligand et bloque l'activation de la croissance des follicules primordiaux, préservant ainsi de l'épuisement les follicules du stock de la réserve (5, 17, 18).

L'épuisement de la RO dépend de l'équilibre entre le renouvellement de cellules germinales et le phénomène d'atrésie, de la croissance et la maturation folliculaires selon que l'on considère la théorie de la multiplication, ou simplement de l'épuisement du stock folliculaire prédéterminé depuis la vie intra-utérine. Selon cette dernière théorie largement admise, le stock de follicules constitué durant la vie intra-utérine est de 6 millions chez le fœtus humain de 3 mois. À la naissance, à la suite de l'atrésie, ce stock chute à 2 millions. Chez l'humain, il ne restera qu'environ 300 000 follicules à la puberté, 100 000 à l'âge de 20 ans, moins de 10 000 à 40 ans et lorsque la ménopause survient, il en reste entre 10 et moins de 1000 (19-21). À partir de cette réserve, chaque follicule est appelé à connaître une des deux destinées comme signalé ci-haut : la croissance et la maturation ou l'atrésie. Ces deux phénomènes sont hautement régulés sur le plan moléculaire et nous y reviendrons dans les lignes qui suivent dans une section réservée.

La croissance et la maturation folliculaires impliquent deux phénomènes concomitants qui sont la folliculogénèse et l'ovogénèse. La folliculogénèse concerne la croissance et la maturation d'un nombre déterminé de follicules, selon les espèces, depuis leur réserve jusqu'à l'ovulation, par des vagues successives. Elle est divisée en 4 étapes principales : l'initiation; la croissance; la sélection et dominance d'un follicule ou de plus selon les espèces dans le pool de follicules sélectionnables; puis la maturation pré-ovulatoire des follicules sélectionnés (5). L'ovogénèse, consiste en la croissance et la maturation de l'ovocyte au sein du follicule. Ici nous insisterons essentiellement sur les aspects morphologiques de la folliculogénèse étant donné que ceux de l'atrésie folliculaire ont été abordés ci-dessus; les aspects moléculaires de ces phénomènes seront abordés dans une section plus loin.

L'initiation de la croissance folliculaire débute, chez l'humain, lorsque le noyau de l'ovocyte du follicule primordial atteint une taille de 19 μm . L'activation de la croissance et sa poursuite jusqu'au stade préantral sont indépendantes de la FSH, et seraient sous la dépendance du Kit Ligand (5). Dès cette activation, le follicule entre dans la phase de **la croissance basale**. Il croît à la fois par la multiplication du nombre de cellules de la granulosa et aussi, par l'augmentation de la taille de l'ovocyte. Le premier stade de follicule croissant est le follicule primaire où il se développe entre les cellules de la granulosa des gap-jonctions. Celles-ci permettent aux différents nutriments, ions organiques, petits métabolites et seconds messagers de passer d'une cellule à l'autre grâce aux canaux. Progressivement, le follicule devient secondaire. Il est alors formé de deux ou plusieurs couches de cellules de la granulosa qui entourent l'ovocyte. À partir de ce moment, le follicule est irrigué par une artériole qui se termine en anastomose sur le follicule. Cette vascularisation permet au follicule d'être exposé aux substances qui circulent dans le sang. C'est également pendant cette phase que les cellules stromales autour du follicule se mettent à se différencier pour constituer la thèque folliculaire. La thèque va également se différencier en thèque interne et externe au fur et à mesure que le follicule croît (5). Les cellules de la thèque interne vont prendre un aspect épithélioïde, alors que celles de la thèque externe garderont un aspect fibroblastique, sans trop de différence avec le reste des cellules stromales. À ce moment, les follicules deviennent préantraux et constituent selon certains auteurs le premier stade de follicules en croissance sur le plan de la classification morphologique. Avec la croissance, va apparaître au sein du follicule une cavité appelée antrum qui va se remplir de liquide folliculaire dont la composition est proche de celle du sérum. Ce follicule est appelé antral précoce. La croissance va continuer par la multiplication des cellules de la granulosa et de la thèque, mais aussi par l'augmentation de l'antrum due à l'accumulation de liquide. Dès que le follicule atteint une taille entre 2 et 5 mm, il devient sélectionnable pour évoluer et éventuellement ovuler. Chez l'humain, le temps nécessaire pour qu'un follicule atteigne le stade antral précoce est estimé à environ 2 à 3 mois. Il faut autour de 70 jours supplémentaires pour atteindre le stade de follicule dominant (2 à 5 mm) (5). Ces observations sont soutenues par des données cliniques des transplantations des ovaires réalisées chez les patientes (22). Pendant que les cellules de la granulosa et de la thèque se multiplient et prolifèrent, l'ovocyte aussi croît. Chez l'humain, son diamètre passe de 40 μm dans le follicule grand primaire à un diamètre autour de 100 μm dans le follicule antral précoce.

Delà, cette croissance rapide va ralentir et à terme, dans le follicule pré-ovulatoire, il atteint un diamètre de 140 μm . En dehors de cette croissance, l'ovocyte reste bloqué au stade diplotène de la prophase de la première division méiotique tout au long de la folliculogénèse. L'ovocyte va contrôler la croissance folliculaire grâce à ses différentes sécrétions comme détaillé ci-dessous. **La sélection et la dominance** vont suivre cette deuxième phase de la folliculogénèse. En effet, les follicules dominants qui sont visibles dans toutes les phases du cycle menstruel verront leur nombre et leur qualité augmenter dans la phase lutéale tardive. Ces observations sont appuyées par différentes études réalisées chez l'humain et le singe (23, 24). L'augmentation du nombre et de la qualité des follicules fait suite à l'élévation du taux de FSH, elle-même due à la destruction du corps jaune. Le nombre de ces follicules est variable notamment selon les espèces, mais décroît avec le VO. Les follicules évoluent en groupe et constituent des cohortes. C'est parmi ces follicules que ceux ou celui destiné(s) à ovuler dans le cycle suivant émergeront d'une de cohortes (23, 25). Ces follicules destinés à ovuler deviendront très sensibles aux changements hormonaux sanguins alors que les follicules antraux précoces ne le sont pas. La prolifération de cellules de la granulosa de follicules de la cohorte qui a émergé s'accroît considérablement durant cette phase. Les follicules les plus larges de la cohorte qui sont très sensibles au taux le plus faible de FSH vont demeurer. Ils vont émerger dès le début de la phase folliculaire pour continuer la croissance afin d'ovuler. C'est ce phénomène qui est appelé la dominance. Après ce stade, le(s) follicule(s) dominant(s) va/vont entrer dans **la phase de maturation** pré-ovulatoire. Il(s) va/vont rapidement augmenter de taille notamment par une prolifération de cellules de la granulosa. En effet, chez l'humain, la taille du follicule dominant va passer d'une moyenne de 6,9 mm à 18,8 mm du début de la phase folliculaire à la phase folliculaire tardive. Pendant ce temps, le follicule va posséder de 5 millions à jusqu'à 100 millions de cellules de la granulosa. Dès ce moment, les follicules sont prêts à ovuler sur le plan morphologique. Cependant, plusieurs modifications sur le plan moléculaire doivent s'opérer. En ce qui concerne l'ovocyte, la poursuite de sa méiose (une étape cruciale de sa maturation) ne se fera qu'après le pic ovulatoire de la LH. Plusieurs moyens ou tests sont utilisés pour évaluer la RO. Ils peuvent être répartis en deux groupes : les tests statiques et les tests dynamiques¹. Les tests statiques sont réalisés sans administration préalable d'un médicament;

¹ Les différentes valeurs des tests reprises dans ce paragraphe représentent les seuils considérés comme normaux chez la femme en âge de procréer.

ils reflètent la taille de la réserve folliculaire. Ce groupe comprend les tests directs comme le compte de follicules antraux (CFA) ($\geq 4-6$ follicules de 2-5 mm de diamètre par ovaire) et la détermination du volume ovarien (volume ovarien moyen $\geq 3 \text{ cm}^3$) réalisés grâce à l'échographie endovaginale. Il comprend également les tests directs qui font partie du dosage sérique des marqueurs endocriniens, car ils sont produits par des follicules en croissance : le taux basal de l'AMH ($> 1,2 \text{ } \mu\text{g/l}$), d'INHB ($> 45 \text{ pg/ml}$) et d'E₂ ($< 80 \text{ ng/ml}$). Enfin, dans les tests statiques, il y a le test indirect, soit le dosage sérique basal de la FSH ($\leq 10-15 \text{ UI/l}$) (26, 27). Ce sont les tests statiques les plus pratiqués en clinique, et ils sont réalisés entre le deuxième et le cinquième jour du cycle menstruel. Il sied nécessaire de relever deux autres tests statiques couramment pratiqués dans le cadre de la recherche, notamment le compte de follicules de la RO après histologie ovarienne et l'étude du flux ovarien par doppler grâce à l'échographie (26, 28). Bien que le compte de follicules à l'histologie demeure la référence de ces tests, en clinique, le taux d'AMH est considéré comme le meilleur marqueur. Un prélèvement d'un ovaire entraînerait le bris du tissu. En effet, le taux de l'AMH montre une bonne corrélation avec le CFA et les différents paramètres d'évaluation des issues cliniques en assistance médicale à la procréation (AMP) (28, 29). Les tests dynamiques sont réalisés après administration des médicaments (FSH, GnRH ou citrate de clomifène). Ils sont basés sur la variation du taux sérique de la FSH et/ou d'E₂ après cette stimulation médicamenteuse. Une élévation exagérée de la FSH ou une sécrétion insuffisante d'E₂ témoignent d'une mauvaise RO. Selon plusieurs auteurs, ces tests dynamiques, tout en étant très laborieux, n'apportent pas une valeur prédictive supplémentaire par rapport au précédent groupe de tests. Ils sont de ce fait de plus en plus abandonnés au profit du premier groupe de tests (26, 28). Ce groupe contient 3 tests dont le test au citrate de clomifène ou clomiphene citrate challenge test (CCC Test), le test à la FSH exogène ou exogenous FSH ovarian reserve test (EFORT) et le test à la GnRH ou GnRH stimulation test (GAST). Le CCC Test consiste en la mesure de la FSH au J3 du cycle menstruel avant administration, et au J10 du cycle menstruel après administration de 100 mg/j de citrate de clomifène (du J5 au J9 du cycle). L'EFORT consiste au dosage sérique de la FSH et d'E₂ de base et 24 heures après administration intramusculaire au J3 du cycle menstruel de 300 UI de FSH. Le GAST consiste au dosage d'E₂ avant et après administration entre J2-3 du cycle menstruel d'un agoniste de la GnRH (26, 28).

Aucun de ces tests ne possède à lui seul une sensibilité et une spécificité à 100 %. Chacun d'eux possède certains avantages. Par exemple, le taux basal de la FSH est considéré comme un indicateur précoce de la diminution de la RO; le CCC test permet de refléter mieux la chance de conception chez les patientes âgées au-delà de la trentaine. Ils souffrent tous des difficultés de comparaison de leur efficacité à cause des résultats controversés de différentes études. Bien que certains auteurs recommandent de les combiner pour améliorer leur performance, une méta-analyse n'a cependant pas montré le bénéfice de cette approche en comparaison avec certains marqueurs pris isolément comme le CFA. Cette observation a été faite par exemple pour leur capacité de prédiction d'une bonne réponse en AMP (26, 30).

1.3 Vieillesse ovarien, infertilité et ses autres conséquences

Le vieillissement reproductif chez la femme est en grande partie dû aux changements liés à l'âge au niveau de l'ovaire. Ces changements ovariens liés à l'âge constituent le VO qui est en réalité un processus dont le point final est la ménopause. Ce processus de vieillissement détermine la durée de la vie reproductive de la femme. Il est variable selon les femmes et il détermine la fertilité féminine. En effet, certaines femmes demeurent naturellement fertiles jusqu'à leur cinquantaine pendant que d'autres deviennent sous fertiles à leur mi-trentaine (21). C'est la diminution du nombre de follicules et la baisse de la qualité ovocytaire qui en est la base. Elles sous-tendent toutes les modifications de la plupart des changements observés lors du VO. Les résultats de différentes études montrent que c'est la perte des follicules primordiaux, qui se déroule graduellement depuis la vie intra-utérine, qui est la principale cause de ce VO. De plus, avec l'avancement en âge, le taux de l'atrésie folliculaire augmente et au-delà de la trentaine, la perte s'accélère comme on peut le voir sur la figure 1.5 ci-dessous (21).

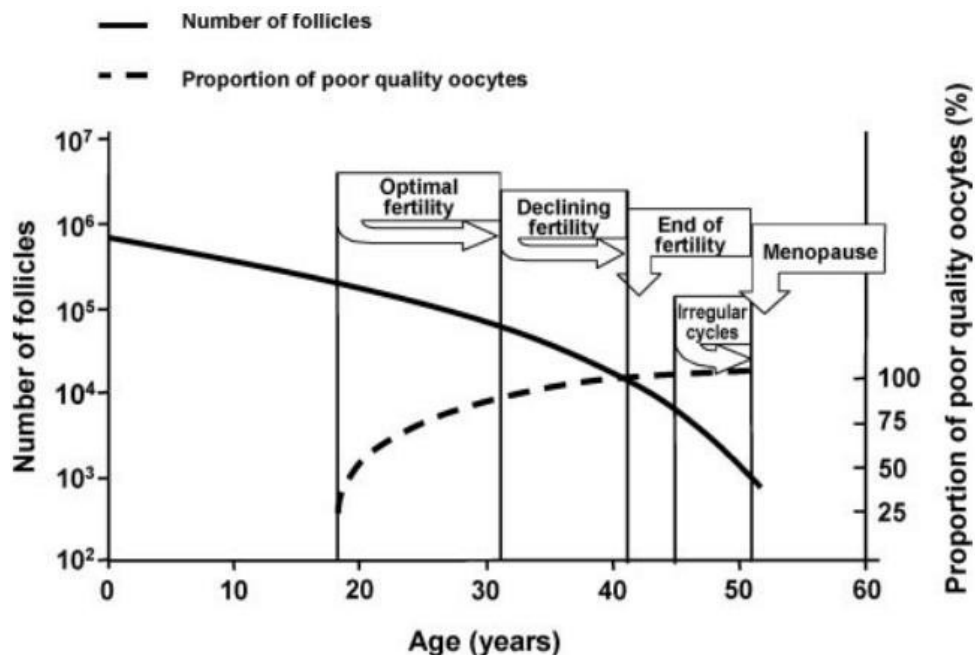


Figure 1.5 Représentation schématique de la perte folliculaire, de la qualité ovocytaire et des différents événements reproductifs en fonction de l'âge de la femme. (Tirée de Broekmans, 2009.)

Comme mentionné plus haut, au cours du vieillissement de l'ovaire, le stock de follicules primordiaux de la femme s'épuise avec l'âge, ou le taux de l'atrésie folliculaire dépasse celui du renouvellement folliculaire. En plus de cette décroissance en nombre des follicules, la qualité de l'ovocyte aussi décroît considérablement avec le vieillissement, et ce, à partir d'environ l'âge de 30 ans. La perte de la qualité de l'ovocyte est essentiellement la conséquence de la non-disjonction méiotique et elle résulte en un accroissement du taux d'aneuploïdie chez les femmes âgées. On pense que les mécanismes à la base de la non-disjonction méiotique seraient dus aux changements survenus au niveau de cellules de la granulosa, au fait que l'ovocyte reste pendant de nombreuses années en quiescence, ou à l'accumulation des dommages subis par l'ovocyte (21).

Les modifications du nombre des follicules et de la qualité ovocytaire ne se manifestent pas pendant de nombreuses années. C'est vers la mi-trentaine et la quarantaine que ces modifications vont commencer à se manifester. L'irrégularité du cycle menstruel et la ménopause sont les manifestations les plus évidentes du VO. Les autres signes comme la sous-fertilité et les dysovulations sont plus discrets et surviennent avant la ménopause.

En effet, à la suite de la diminution des follicules, les ovulations deviendront rares et cela aboutira à l'élongation de la durée de cycles menstruels ainsi qu'à leur irrégularité. Parallèlement à cette baisse des ovulations, la fertilité aussi diminue. Cette période correspond à la transition ménopausique et s'observe autour de 46 ans en moyenne avec des variations plus ou moins entre 35 ans et 54 ans (31-34). À la ménopause, l'étape finale de ce processus, la femme a alors perdu la quasi-totalité de ses follicules; il y a arrêt des menstruations qui arrive vers l'âge de 51 ans avec des variations qui se situent entre 40 ans et 60 ans (29, 34, 35). Sur le plan endocrinologique, un des premiers signes de ce VO est l'élévation du taux sanguin de FSH. Celle-ci est consécutive à la baisse du nombre des follicules qui aboutit à une baisse du taux à la fois de l'INHB A et des stéroïdes sexuels. La baisse de stéroïdes et de l'INHB lève ainsi leur mécanisme de *feed-back* négatif. Cette élévation du taux de FSH précède même l'apparition clinique de l'irrégularité des cycles menstruels. Cette augmentation du taux de FSH va croître avec la perte de follicules. L'élévation de FSH va aboutir dans un premier temps au raccourcissement des cycles menstruels à cause de la sélection précoce des follicules; puis les cycles vont devenir longs avec la rareté et l'épuisement de follicules sensibles au taux de FSH et des anovulations vont avoir lieu. La ménopause sera accomplie avec l'épuisement des follicules sélectionnables, et elle a comme signe majeur, une aménorrhée d'au moins 12 mois. Durant cette période, le peu de follicules restants va garder une activité synthétique des stéroïdes comme en témoigne le taux basal d'E₂ chez ces femmes. Chez les rongeurs, on pense que c'est plus la perte de la réponse au *feed-back* positif de l'E₂ qui serait à la base de l'arrêt des ovulations. Cependant, des follicules fonctionnels persistent encore à des âges avancés chez les rongeurs. L'âge de la survenue du VO est variable, mais il est qualifié de précoce quand il survient avant 40 ans d'âge chez la femme comme cela arrive dans le cas d'IOP. L'IOP se manifeste par la perturbation de marqueurs de la RO, notamment la baisse du taux sérique de l'AMH et de l'INH B ainsi que l'élévation du taux de la FSH sous des seuils admis comme mentionnés précédemment.

Le VO s'accompagne des conséquences sur la santé de la femme, surtout s'il survient très tôt comme dans le cadre de l'IOP. Ces conséquences sont de deux ordres sur le plan clinique : les conséquences immédiates dues à la dysovulation ou l'anovulation, et les conséquences tardives dues à l'hypoestrogénie (28). Parmi les conséquences immédiates, il y a essentiellement

l'infertilité à cause du trouble de l'ovulation. Chez les femmes jeunes atteintes d'IOP, cela peut représenter un drame lorsqu'elles désirent concevoir. D'autres conséquences corollaires à ces troubles de l'ovulation et à la baisse de la qualité ovocytaire et de la folliculogénèse sont la baisse de la réponse ovarienne à la stimulation lors de la prise en charge en AMP, la diminution du taux de grossesse chez ces femmes, ainsi que l'augmentation du taux d'avortements (28, 36). Les conséquences tardives sont représentées par l'ostéoporose (avec ses lots de conséquences, notamment les fractures pathologiques), l'augmentation des maladies cardiovasculaires par des lésions endothéliales, les maladies coronariennes, l'infarctus du myocarde et les dyslipidémies (37). Aussi sont évoqués, le risque d'altération de la vie sexuelle et les troubles psychiatriques comme la dépression, l'anxiété, bien que certaines études affirment une association moins forte (37).

Sur le plan des déterminants de l'âge de la survenue du VO naturel (ménopause), plusieurs facteurs sont reconnus, notamment les facteurs environnementaux, le style de vie comme l'utilisation de la contraception hormonale, le tabagisme et la parité. En effet, la contraception hormonale et la multiparité paraissent retarder la survenue de la ménopause bien que les données semblent parfois contradictoires et même contraires à cette hypothèse (35, 38). En revanche, il est bien établi que le tabagisme accélère la survenue de la ménopause (35, 39). En dehors de ce groupe de facteurs, des facteurs génétiques interviennent et on suggère qu'ils peuvent contrôler jusqu'à 80 % l'âge de la survenue de la ménopause. Plusieurs arguments sont avancés, à savoir l'existence d'un lien entre l'âge de la ménopause de la mère et de la fille et aussi entre les sœurs. Concernant l'IOP, qui est une forme de survenue précoce du VO, les données étiologiques démontrent qu'il y a plusieurs causes possibles parmi lesquelles les causes iatrogènes (la chirurgie ovarienne mutilatrice, la chimiothérapie et la radiothérapie), infectieuses (Herpes zoster, cytomégalovirus et virus des oreillons), auto-immunes (syndrome polyglandulaire auto-immun, Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy syndrome), génétiques et idiopathiques (21). Les causes génétiques revêtent un intérêt particulier, car elles permettent de comprendre les mécanismes du contrôle génétique de la ménopause. Elles regroupent diverses perturbations qui peuvent être chromosomiques autosomales ou sexuelles (liées à X). Parmi les anomalies liées à X, on peut citer le syndrome de Turner (45 X0), le syndrome de l'X fragile avec la prémutation du gène FMR1 ainsi que les

mutations de divers autres gènes localisés sur le chromosome sexuel X qui jouent un rôle connu dans le développement de l'ovaire ou dans la dynamique folliculaire (BMP15, DIAPH2, POF2, DACH2, POF1B, BHLHB9, FMR2). Les mutations autosomales concernent également les gènes qui ont des fonctions particulières sur l'ovaire comme le récepteur de la LH, le récepteur de la FSH, Inhibin-A, FOXL2, DAZL1, GALT, CYP 17, FSH β , EIF2B, CYP19, POLG, Noggin, LH, AIRE, ESR1, CYP1B1-4, NOBOX, DMC1, EIF5B, FIGLA, GDF9, GPR3, TGFBR (13, 21).

Ces différentes étiologies agissent par deux mécanismes majeurs qui déterminent l'équilibre entre les mitoses et l'atrésie des follicules (40). Il s'agit premièrement des IOP qui surviennent par déplétion folliculaire. Celle-ci peut consister en un déficit initial des follicules ou en un déficit accéléré. **Le déficit initial** de follicules arrive notamment par l'arrêt de la méiose des ovogonies au stade zygotène/pachytène comme on l'observe dans la mutation du gène ATM responsable du syndrome portant le même nom (40). Cette observation a été validée par des modèles animaux (41). **Le déficit folliculaire accéléré** arrive par une atrésie exagérée des follicules normalement constitués comme dans les cas des anomalies chromosomiques et diverses mutations génétiques du chromosome sexuel, ainsi que dans les causes iatrogènes et infectieuses (40). Le deuxième mécanisme est **le dysfonctionnement folliculaire** qui consiste en un blocage de la maturation folliculaire à un stade ou un autre comme dans le cas de la mutation du gène FSH, GDF-9 (40). Tous ces mécanismes de contrôle de la survenue du VO revêtent des aspects moléculaires abordés dans le point suivant.

1.4 Aspects moléculaires de la formation de la réserve ovarienne, la dynamique folliculaire, du vieillissement ovarien et implication de la voie PI3K/Akt

Lors de la constitution de la RO, les cellules germinales primordiales formant des kystes d'ovocytes, après leur intense division, seront appelées à se séparer. C'est la rupture de ces kystes qui permet de libérer des ovocytes individuels. Ces ovocytes vont alors s'entourer des cellules aplaties pour former des follicules primordiaux (42). Lors de la formation de cette RO, plusieurs molécules jouent des rôles spécifiques. En effet, la rupture de ces kystes est sous le contrôle de facteurs comme l'activine, la BMP-15 selon des résultats obtenus par les études sur

des souris transgéniques (42). Des études *in vitro* ont montré que l'œstrogène, en régulant l'expression de l'activine, s'opposerait à la rupture de ces kystes (43-45). Après la rupture des kystes, d'autres facteurs de transcription interviennent pour la formation du follicule primordial. Il s'agit de Factor in the germline α (FIGLA) qui code, via un autre facteur de transcription, basic helix-loop-helix (bHLH), des gènes de la formation de la zone pellucide (42). Il y a également FOXL2 et FoxO3 qui participent à la formation du follicule primordial. Plusieurs études réalisées sur des souris transgéniques ayant subies de KO de gènes de ces facteurs ainsi que leurs mutations observées chez l'humain démontrent leur implication. Ces observations sont relevées dans une revue de la littérature publiée par Richards et Pangas (42).

La dynamique folliculaire ainsi que le VO sont des processus hautement régulés qui impliquent l'action de plusieurs hormones. En effet, la FSH, l'AMH, les stéroïdes ovariens ainsi que d'autres molécules de signalisation paracrine et autocrine agissent sur les différentes composantes folliculaires dans ces deux processus (4, 46-48). Ces différentes hormones et molécules vont agir sur les cellules folliculaires et l'ovocyte par différentes voies de signalisation à la suite de la liaison à leurs récepteurs. Dans la première phase de la dynamique folliculaire, le gène *Kit* qui encode pour la protéine Kit, un récepteur présent au niveau des cellules de la thèque et de l'ovocyte et le gène *Mgf* codant pour le Kit ligand sont d'importants régulateurs de l'ovogenèse et de la folliculogénèse. En effet, ils induisent l'activation de l'initiation de la croissance folliculaire bloquée jusque-là au stade primaire. Cependant, les mécanismes à la base de cette activation restent encore méconnus à ces jours. Le C-kit s'exprime aussi sur les cellules de la granulosa et de la thèque interne chez l'humain (5). Le C-kit est un récepteur tyrosine kinase ; et la liaison de Kit ligand au C-kit active la voie de signalisation sous-jacente notamment la voie PI3K qui active plusieurs protéines kinases dont Akt. Une fois Akt activé, comme nous le verrons dans le point suivant, Il y a induction de la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose ainsi que l'activation de voies métaboliques nécessaires à la croissance cellulaire (4). Akt agit en phosphorylant diverses protéines pour soit les inhiber ou les activer. En effet, Akt inhibe par exemple les facteurs de transcription FOXO3 et p27, car ces deux dernières sont inhibitrices de l'activation de la croissance folliculaire. En revanche, l'activation de la voie de signalisation d'Akt permet l'activation de la croissance folliculaire en médiant l'action d'autres molécules présentes aussi bien dans l'ovocyte comme

platelet-derived growth factor (PDGF) et basic fibroblast growth factor (bFGF), que dans les cellules de la thèque comme keratinocyte growth factor (KGF), bien que KGF passe d'abord par la stimulation de KL. Beaucoup d'autres études *in vitro* sur des ovaires entiers ont montré le rôle activateur de croissance des molécules comme bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) venant du stroma ovarien, et de la BMP-7 sécrétée par la thèque des follicules antraux, ainsi que du Growth differentiation factor 9 (GDF-9) et du leukemia inhibiting factor (LIF) produits par l'ovocyte (4). L'initiation de la croissance folliculaire est régulée ou inhibée par d'autres molécules afin d'éviter une entrée massive des follicules en croissance et l'épuisement précoce de la RO. En effet, des études ont montré que l'AMH bloque l'activation de follicules au repos en inhibant l'expression de C-kit, de KL, du récepteur 1 de bFGF et de KGF. En dehors d'AMH, qui est reconnue comme la principale protéine inhibitrice de la croissance, d'autres molécules sont aussi impliquées dans l'inhibition de la croissance comme le facteur de transcription FOXL2 qui est présent dans les cellules de la granulosa aplaties, le SDF1 (chemoattractive cytokine stromal derived factor-1) ovocytaire et la somatostatine (SST) (5, 42).

Dans la deuxième phase de la dynamique folliculaire qui est la croissance, jusqu'à l'étape de follicules préantraux de 2 mm chez l'humain, ce sont essentiellement les facteurs locaux qui interviennent. Cette première partie de la croissance est ainsi qualifiée de basale (5). Parmi ces facteurs, il y a le GDF-9 et la BMP-15 qui sont produits par l'ovocyte en croissance. La différenciation des cellules de la thèque interne à partir du stroma qui entoure le follicule est contrôlée principalement par la LH. D'autres facteurs comme KL, GDF9 et epidermal growth factor (EGF) sont aussi impliqués dans le développement de la thèque (49-51). L'IGF-I agit aussi comme facteur de différenciation de cellules de la thèque interne des follicules préantraux en augmentant l'expression des récepteurs de la LH. La prolifération des cellules de la granulosa durant la croissance basale est lente. Plusieurs facteurs régulent cette prolifération. Il s'agit entre autres de l'activine A et l'AMH qui sont produites par les follicules préantraux larges et antraux précoces, et qui contrecarrent l'effet de la FSH. À ce stade, les cellules de la granulosa sont non différenciées puisqu'elles n'expriment pas l'aromatase, les enzymes de synthèse de la progestérone et les récepteurs de la LH (51-53). Cela est dû aux différents facteurs locaux susmentionnés (GDF9, BMP-15, EGF et FGF2) ainsi qu'à d'autres (TGF- α , KGF) qui

permettent la prolifération, mais qui inhibent la différenciation induite par la FSH. La croissance ovocytaire est essentiellement sous le contrôle du KL qui lui-même est contrôlé par GDF-9 (50).

Dans la troisième phase, quand le follicule devient sélectionnable, lorsqu'il atteint et dépasse 2 mm chez la femme, il est exposé et devient sensible aux différentes molécules qui circulent dans le sang, notamment la FSH. La FSH va ainsi agir sur les follicules sélectionnables pour induire la prolifération et la différenciation de cellules de la granulosa en induisant l'expression des enzymes nécessaires à la stéroïdogénèse. Les IGFs dont IGF-II, sécrétées par les cellules de la granulosa de follicules pré-ovulatoires, jouent également un rôle crucial dans ces processus en médiant l'action de la FSH sur les follicules sélectionnables. En effet, la FSH va induire la synthèse d'une protéase d'IGFBP-4 (chez l'humain, il s'agit du pregnancy-associated plasma protein-A, (PAPP-bA). La protéase va dégrader l'IGFBP-4, libérer ainsi l'IGF-II et le rendre biologiquement disponible pour agir. Des modèles KO d'IGF-II ont montré une croissance folliculaire normale jusqu'au stade sélectionnable avant d'y être bloquée. La FSH, pour agir, va se lier à son récepteur membranaire et activer l'adénylate cyclase qui va générer la synthèse de l'AMPc dans la cellule. L'AMPc va alors activer la protéine kinase A (PKA). La FSH active aussi d'autres voies de signalisation comme la voie PI3K qui va phosphoryler et activer Akt pour assurer la prolifération et la différenciation des cellules de la granulosa tel que mentionné ci-dessus (42, 54).

Dans la quatrième phase, celle de la maturation, plusieurs changements moléculaires s'opèrent ou s'accroissent. Les follicules acquièrent une grande activité stéroïdogénique, notamment la production des androgènes par les cellules de la thèque interne grâce à l'action de l'INHB A qui stimule la P450c17 α /lyase. Au niveau de cellules de la granulosa, l'aromatase est stimulée par la production croissante de l'IGF-II. Et le NGF stimule la production de l'E₂ et l'expression de récepteurs de FSH. L'E₂ et l'activine vont contribuer à accroître l'action de la FSH. En effet, l'activine active les facteurs de transcription SMAD2/3 et SMAD4 qui régulent plusieurs gènes induits par la FSH et impliqués dans le cycle cellulaire et la stéroïdogénèse dont le gène de l'aromatase et le CCND2 (42). L'accumulation croissante du taux d'E₂ et d'INHB B vont inhiber le taux circulant de FSH par *feed-back* négatif comme décrit ci-dessus. Les cellules de la granulosa seront alors capables de lier la LH. Ainsi, le pic de la LH au milieu du cycle va agir pour continuer la différenciation des cellules de la granulosa. Après ce pic, la prolifération

des cellules de la granulosa s'arrête, et l'équipement enzymatique est essentiellement dirigé vers la production de la progestérone. Les cellules de la granulosa expriment les récepteurs de la progestérone, bien que certaines controverses existent quant à l'expression de ces récepteurs de la progestérone sur des follicules de stades plus jeunes (5). En effet, Gava *et al.* ont rapporté dans une étude sur les souris l'expression des récepteurs B de la progestérone dans les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque interne dans les follicules du stade primaire jusqu'aux follicules antraux et corps jaunes (55). En revanche, d'autres études ne révèlent cette expression seulement que dans les follicules pré-ovulatoires en dehors des corps jaunes (56, 57).

La LH induit d'autres parts le déclin de l'expression des protéines de jonctions communicantes, aboutissant ainsi à une dissociation du complexe cumulo-ovocytaire. Cette dissociation est l'effet de facteurs locaux produits par les cellules de la granulosa et l'ovocyte en réponse directe ou indirecte à la présence de la LH (5). Parmi ces facteurs, il y a l'amphireguline et l'épireguline, des membres de la famille des EGF, la prostaglandine E (PG E) et également BMP-15 et GDF-9 qui stimulent la synthèse de la cyclooxygénase 2 (5, 42). L'activation d'Akt joue un rôle important dans ces dernières phases de la dynamique folliculaire et l'ovulation ainsi que dans la formation du corps jaune (58). En effet, le rôle de la voie PI3K est bien établi dans les cellules de la granulosa bien que leur régulation paraisse complexe et pourrait être spécifique et varier selon les stades folliculaires (58). Fan *et al.* ont démontré dans leur étude chez les souris déficientes conditionnelles en PTEN (la phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) dans les cellules de la granulosa et les cellules lutéales, que l'activation d'Akt dans ces cellules aboutit à une stimulation de la croissance folliculaire et de l'ovulation ainsi qu'à l'accumulation de corps jaunes (58, 59).

L'atrésie folliculaire quant à elle, comme mentionné plus haut, est sous-tendue par l'apoptose qui implique également des aspects moléculaires très complexes. Deux mécanismes sont à la base de la survenue de l'apoptose : le premier, appelé la voie extrinsèque, est activé par la liaison des molécules de la mort cellulaire aux récepteurs cellulaires de surface (récepteurs de la mort); tandis que le second, appelé la voie intrinsèque, est activé par des signaux intracellulaires et passe par la mitochondrie. Concernant le premier mécanisme, l'apoptose est initiée par la liaison à leurs récepteurs des molécules diverses comme Fas, Tumor necrosis factor

(TNF), interféron (IFN) et TNF-related apoptosis- inducing Ligand (TRAIL). Ce qui conduit, via des *death domains* de ces récepteurs, au recrutement et à l'activation des caspases qui vont initier et exécuter l'apoptose dans une réaction en cascade. Pour le deuxième mécanisme, les signaux cellulaires de mort (stress cellulaire, dommage à l'ADN, agents toxiques et défaut dans la réparation de l'ADN) permettent aux protéines pro-apoptotiques mitochondriales de la famille de Bcl2 dont Bax, Bak et Bad de se dimériser sur la membrane mitochondriale. Cette dimérisation modifie la perméabilité mitochondriale et permet ainsi la sortie vers le cytoplasme du cytochrome C. Ce dernier va s'associer à l'apoptotic protease-activating factor 1 (Apaf-1) et lier la caspase 9, constituant ce qu'on appelle l'apoptosome. L'apoptosome va alors initier l'activation en cascade des caspases et conduire ultimement à la mort cellulaire (15). L'initiation de l'atrésie dépendra de la balance entre plusieurs molécules pro-apoptotiques (TGF- β , interleukin-6, androgènes, reactive oxygen species, Bax, Fas, p53, TNF et les caspases) et anti-apoptotiques (gonadotrophines, insulin-like growth factor-1, interleukin-1 β , EGF, bFGF, TGF- α , Bcl-2, Bcl-xlong). Elle dépend également des diverses voies de régulation de ces deux mécanismes d'initiation de l'apoptose dont dispose la cellule.

Enfin, la voie PI3K/Akt est impliquée dans le processus du VO dont le mécanisme de base implique l'apoptose et la croissance folliculaire, deux processus dans lesquels Akt est impliquée. En effet, Akt régule l'apoptose des cellules de la granulosa qui constituent un véritable soutien nutritionnel de l'ovocyte et, président ainsi au destin folliculaire (60). Akt participe aussi à l'activation de la folliculogénèse et, ainsi, interfère dans la gestion de la RO. Des études établissent que les délétions des gènes de la voie PI3K/Akt aboutissent au VO prématuré. En effet, la délétion des cibles d'Akt comme le FOXO3a, mais aussi des molécules en amont d'Akt comme 3-phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) et PTEN entraîne le VO prématuré (61-63). Il a donc été rapporté que des souris déficientes en Foxo3a (Foxo3^{-/-}) exhibent un niveau d'infertilité et d'IOP avant la maturité sexuelle par activation excessive de la folliculogénèse et la déplétion subséquente de la RO (61). Selon ces études, la délétion de Foxo3a lève son inhibition ovocytaire de l'activation de la folliculogénèse. Dans les modèles où Foxo3a est constitutivement actif au niveau des ovocytes, la croissance folliculaire est perturbée (retardée) pour les follicules au-delà du stade de follicule primaire (64). Cette observation est soutenue par des études concernant la délétion ovocytaire de PTEN,

un régulateur négatif de l'activation de la voie PI3K/Akt, qui donne un tableau clinique similaire à celui de la déficience en Foxo3a (61). Concernant PDK1, sa déficience au niveau de l'ovocyte aboutit à l'inactivation d'Akt et à la rétention nucléaire de Foxo3a, à l'accroissement de l'apoptose ovocytaire, ainsi qu'au blocage de la croissance folliculaire (61).

1.5 Voie de signalisation PI3K/Akt

La voie de signalisation PI3K/Akt est à ce jour reconnue comme une des voies clés dans la signalisation cellulaire, étant donné ses diverses implications dans les phénomènes biologiques vitaux pour la cellule. En effet, elle médie au niveau cellulaire l'action de certains facteurs de croissance comme décrit plus haut (65). Elle constitue une cascade de signalisation qui implique des kinases ayant des cibles précises dépendantes du type et de l'état de cellules. PI3K est une kinase située dans le cytoplasme et qui s'amarre aux récepteurs transmembranaires des facteurs de croissance possédant une activité tyrosine kinase. Cet amarrage permet la modification conformationnelle de PI3K et l'activation de sa sous-unité catalytique. Ladite activation est responsable de la phosphorylation sur le groupement hydroxyle du carbone en position 3 des phospholipides membranaires, notamment le phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate (PIP2) (65, 66). PIP2 va ainsi être transformé en phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate (PIP3), et c'est grâce à ce dernier que les protéines qui possèdent le domaine d'homologie à la pleckstrine (PH) vont être recrutées pour interagir. Il s'agit, entre autres, d'Akt qui est au centre de notre recherche et pour laquelle nous décrivons dans les lignes qui suivent la structure, la biosynthèse, la régulation, les isoformes ainsi que les cibles moléculaires reconnues comme fréquemment impliquées dans la physiologie ou la pathologie ovariennes. Cette voie de signalisation est régulée négativement à ce niveau par PTEN qui déphosphoryle PIP3 en PIP2. PTEN assure ainsi le contrôle de l'activation d'Akt, et évite les effets néfastes pouvant découler de l'activation permanente des cibles de PI3K (46, 65). Par exemple, pour l'ovaire, un excès d'activation folliculaire peut aboutir à un épuisement de la RO (4).

1.5.1 Structure, isoformes, activation et régulation d'Akt

Akt, également appelé protéine kinase B (PKB), est une protéine kinase qui existe sous trois isoformes codées par trois gènes différents. Il s'agit d'Akt1 ou PKB α , Akt2 ou PKB β et Akt3 ou PKB γ (65). Les gènes qui codent pour Akt1, Akt2 et Akt3 sont respectivement localisés sur les bras longs des chromosomes 14, 19 et 1 (67). Ces trois isoformes d'Akt possèdent une forte homologie structurale qui peut atteindre 80 % selon l'espèce. Comme le montre la figure 1.6 ci-dessous, leur structure est constituée de trois domaines, soit le domaine PH, le domaine catalytique et le domaine hydrophobique (65). Chacun de ces domaines est crucial pour le rôle de la protéine. En effet, le PH domaine est très important pour la liaison avec les phosphoinositides spécifiquement PIP3 pour les isoformes d'Akt. Il joue un rôle dans leur localisation au niveau de la membrane, et permet ainsi leur interaction avec différentes autres molécules. Le domaine catalytique est intéressant, car, comme son nom l'indique, sa fonction est de permettre aux isoformes d'Akt d'induire des modifications sur leurs cibles. Le domaine catalytique contient des sites de phosphorylation spécifiques pour l'activation de chaque isoforme (un site par isoforme). Le domaine hydrophobique contient aussi des sites spécifiques de phosphorylation (également un par isoforme) pour la régulation de la protéine. Ainsi, pour leur activation, ces isoformes possèdent un site thréonine et un site sérine critiques. Akt1 exhibe son site de phosphorylation de la thréonine à la position 308 (T308) dans son domaine catalytique et son site de phosphorylation sur la sérine dans le domaine hydrophobique à la position 473 (S473). Pour ce qui est d'Akt2, il est phosphorylé sur la thréonine 309 et sur la sérine 474. Akt3 est phosphorylé sur la thréonine 305 et la sérine 472 (65, 67).

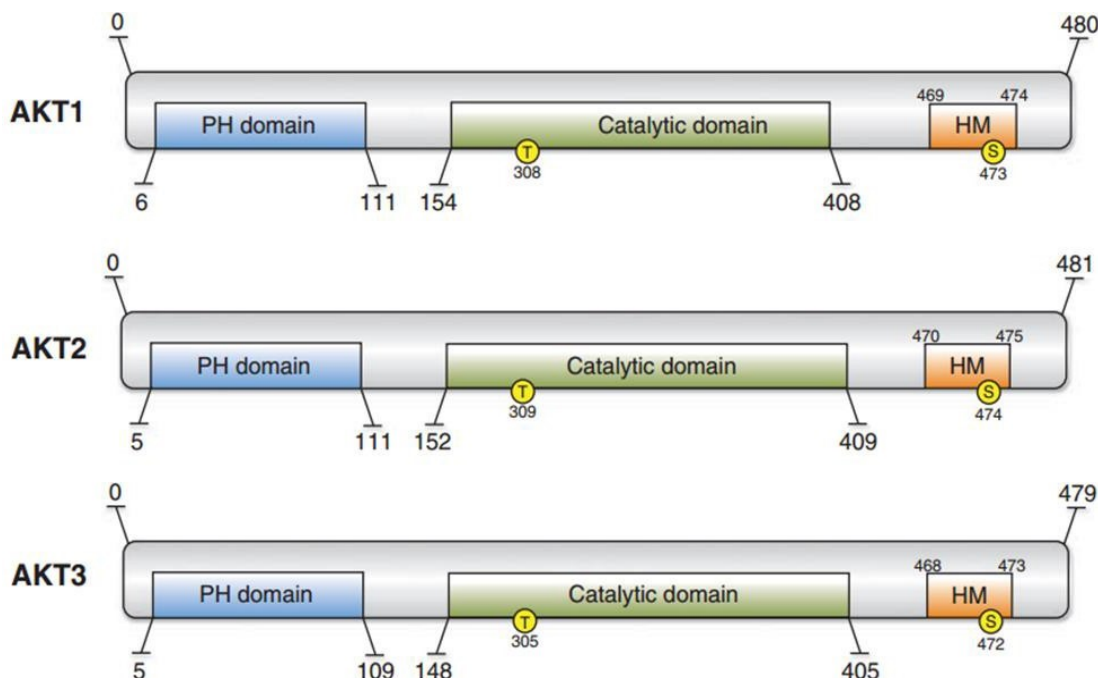


Figure 1.6 Représentation schématique des isoformes d'Akt.

Elle montre les différents domaines et les sites de phosphorylation critique. PH (Pleckstrine homology), HM (Hydrophobic motif). (Tirée de Fabi *et al.*, 2014.)

La forme inactive d'Akt est cytosolique et non phosphorylée. Le recrutement d'Akt au niveau membranaire grâce au PIP3 se produit à la suite de l'activation de PI3K. La liaison d'Akt avec PIP3 résulte en sa modification conformationnelle qui permet alors sa phosphorylation sur des résidus spécifiques, comme mentionné plus haut, par des kinases appropriées. Une de ces kinases est la PDK1 recrutée, comme Akt, grâce à son domaine PH par le PIP3 pour être par la suite phosphorylée et activée. PDK1 va phosphoryler Akt sur le résidu thréonine de son site catalytique, T308, T309 et T305 selon qu'il s'agit respectivement d'Akt1, Akt2 ou Akt3. Pour une activation complète, le résidu sérine doit être aussi phosphorylé. Cette deuxième phosphorylation se réalise par une autre kinase, mechanistic target of rapamycin complex 2 (mTORC2) (46, 65). Une fois phosphorylé et activé, Akt peut être transporté dans différents compartiments cellulaires pour agir en phosphorylant ses nombreuses cibles moléculaires que nous développerons dans des lignes plus loin. Nous nous concentrerons sur les cibles impliquées dans l'ovaire et qui jouent un rôle dans les aspects développés dans cette thèse. Il s'agit notamment de FoxO3a, Bad, GSK3 β et mTOR. Il semble avec les données émergentes que la présence de PIP3 soit nécessaire au site d'action d'Akt pour y assurer la stabilité de sa forme

phosphorylée. La présence de PIP3 au site d'action d'Akt suggérerait l'existence des membranes biologiques dans ces sites (68). La phosphorylation des cibles d'Akt résulte soit en leur activation pour certaines, soit en leur inactivation pour d'autres. La phosphorylation de cibles spécifiques permet à Akt de jouer ses différentes fonctions reconnues comme la survie cellulaire, l'évasion de l'apoptose, la prolifération cellulaire, la différenciation et la régulation métabolique (69-73).

Bien qu'elles possèdent 80 % d'homologie structurale, les isoformes d'Akt jouent des rôles spécifiques à côté des redondances dans les processus physiologiques et pathologiques. Ces observations ont été démontrées par diverses études réalisées sur des souris transgéniques ou encore *in vitro*. Les souris déficientes en Akt1 présentent une mortalité néonatale élevée ainsi qu'une réduction de la masse corporelle (74). Celles déficientes en Akt2 développent un dysmétabolisme glucidique, une discrète réduction de la masse corporelle, mais aucune malformation majeure n'est visible (75). Les souris déficientes en Akt3 exhibent une réduction de la taille du cerveau (76). De plus, de doubles combinaisons de KO des isoformes d'Akt ont révélé leurs redondances fonctionnelles. En effet, le double KO d'Akt1 et 2 résulte en une altération majeure de la peau, des muscles ainsi qu'en des troubles de l'adipogenèse. Ces troubles entraînent la mort des souris peu de temps après leur naissance (77). Les souris déficientes en Akt1 et 3 meurent au douzième jour de vie intra- utérine en raison de troubles du développement, d'anomalies cardiovasculaires et du système nerveux (78). Pour ce qui est des souris déficientes en Akt2 et 3, elles présentent des désordres au niveau du métabolisme glucidique, une réduction de la masse corporelle, des testicules et du poids cérébral, mais sont viables (79). D'autres études comme celles de Veillette *et al.* (80) menées dans notre laboratoire ont établi l'implication spécifique d'Akt3 lors de l'implantation embryonnaire *in vivo* chez le rat. En effet, elles ont démontré que seul Akt3 était impliqué dans la phosphorylation de l'endomètre au J5 de la grossesse, et que cette phosphorylation était nécessaire à la poursuite de la grossesse. Des études réalisées *in vitro*, dont celle menée également au sein de notre laboratoire ont établi qu'il y a une réduction significative d'Akt1 et 2 lors de l'induction de la décidualisation des cellules stromales endométriales humaines immortalisées. En effet, durant la décidualisation induite, l'expression protéique ainsi que la phosphorylation de ces deux isoformes d'Akt décroissent. Cependant, la surexpression des isoformes d'Akt entraîne une diminution du processus de décidualisation objectivée par la baisse de ses marqueurs, soit l'insulin-like growth

factor binding protein 1 (IGFBP1) et la prolactine (PRL) (69). La spécificité fonctionnelle des isoformes d'Akt peut aller jusqu'à des oppositions fonctionnelles. En effet, Linnerth *et al.* (81), ont relevé *in vivo* chez la souris que l'inhibition d'Akt1 réduisait la prolifération cellulaire dans le cancer ovarien tandis que celle d'Akt2 augmentait la croissance tumorale.

L'inactivation d'Akt résulte de l'action de PTEN qui va aboutir à la baisse de l'affinité d'Akt à l'égard des phospholipides membranaires, et à sa délocalisation ainsi qu'à sa modification conformationnelle. Ces différents événements empêchent l'exposition des sites d'activation d'Akt (70). D'autres phosphatases comme PH domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatase (PHLPP) peuvent déphosphoryler directement Akt (66). C'est ce qui assure la régulation de l'action d'Akt sur ses cibles moléculaires.

1.5.2 Cibles moléculaires d'Akt impliquées dans la dynamique folliculaire, la réserve ovarienne et le vieillissement ovarien

L'action d'Akt se réalise dans l'ovaire au travers de ses principales cibles comme illustrée dans la figure 1.7 ci-dessous.

a) FOXO3a

Foxo3a appartient à une famille des facteurs de transcription appelée FOXO qui comprend trois protéines, dont Foxo3a qui joue un rôle bien établi dans la physiologie ovarienne. Sa localisation nucléaire est nécessaire pour l'accomplissement de sa fonction. Les FOXO permettent la transcription de plusieurs gènes qui contrôlent le destin de la cellule, notamment des gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques et des gènes codant pour des protéines capables de bloquer le déroulement du cycle cellulaire (71). Lorsque Akt est activé, il va alors phosphoryler FOXO3a sur des sites thréonine et sérine spécifiques (T32, S253 et S315). Cette phosphorylation va permettre l'exportation nucléaire de FOXO3a et sa séquestration cytosolique grâce à la protéine 14-3-3. La phosphorylation de FOXO3a amène donc son inhibition, et l'empêche de réaliser sa fonction de facteur de transcription. Il va en résulter le blocage de l'apoptose.

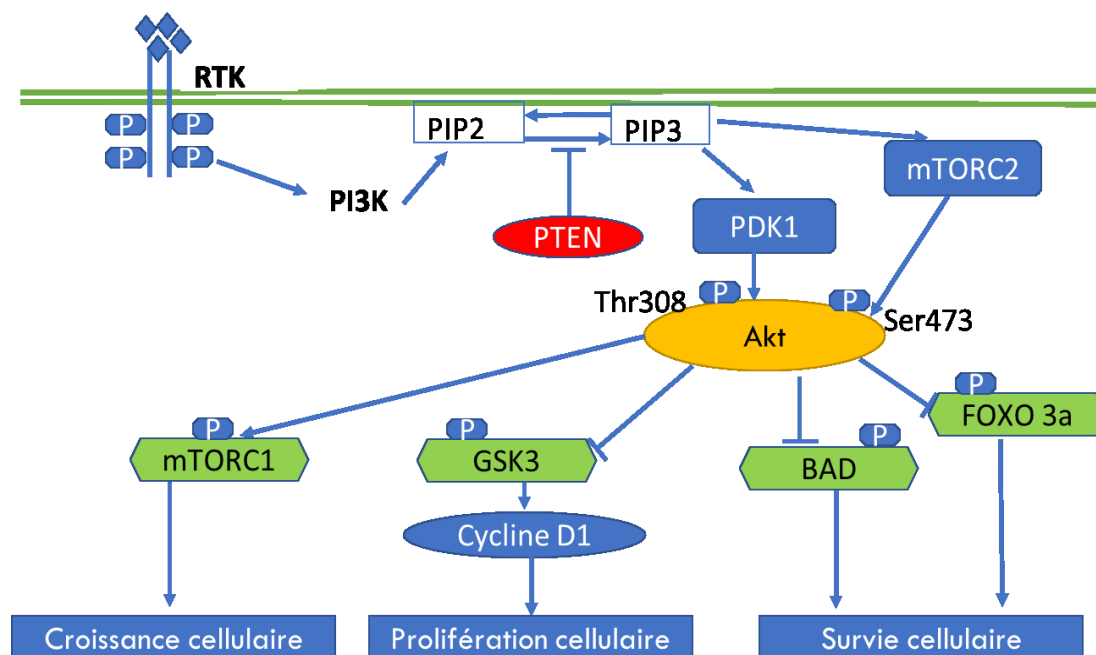


Figure 1.7 Représentation schématique des cibles moléculaires d'Akt impliquées dans l'ovaire.

Elle montre les actions d'Akt sur ses cibles et les effets principaux qui en résultent.

b) BAD

BAD fait partie de protéines de la famille Bcl-2 dont les membres jouent un rôle dans la régulation de l'apoptose et possèdent un domaine caractéristique, le BH3-only. Ce domaine est très important dans l'action apoptotique de ces protéines (82). Certains membres de cette famille sont pros tandis que d'autres, anti-apoptotiques (83, 84). BAD fait partie des membres promoteurs de l'apoptose. Il se lie aux mitochondries et se dimérise avec Bcl-2 ou Bcl-X_L. Ce qui aboutit à la formation des canaux sur les membranes mitochondriales, et à la libération du cytochrome C, capable d'activer des facteurs qui déclencheront l'apoptose (82). Akt phosphoryle directement BAD sur sa sérine 136 et l'inhibe. En effet, cette phosphorylation amène BAD à se lier à la protéine 14-3-3 et le sépare de ses cibles (71), ce qui prévient la survenue de l'apoptose.

c) GSK3 β

GSK3 β est aussi une sérine/thréonine kinase comme Akt. Il existe un autre isoforme de GSK3 qui est le GSK3 α . Également comme Akt, les deux isoformes de GSK3 possèdent une homologie structurale, des redondances fonctionnelles, mais également des spécificités (85). Sous sa forme non phosphorylée, GSK3 est active et capable de phosphoryler ses cibles. Sa phosphorylation par Akt sur sa sérine 9 pour GSK3 β , entraîne son inactivation. En effet, cette phosphorylation diminuerait l'accessibilité des substrats de GSK3 à son site catalytique. Les substrats de GSK3 participent pour la plupart au métabolisme cellulaire et à la prolifération cellulaire. GSK3 est également reconnu pour avoir la capacité d'inhiber la protéine pro survie Bcl-2 (71). En plus, GSK3 phosphoryle les cyclines notamment D et E qui sont reconnus jouer un rôle central dans la transition de la phase G1 à S du cycle cellulaire. La phosphorylation de ces cyclines par GSK3 les conduit à la dégradation par le protéasome. Ainsi, la phosphorylation inhibitrice de GSK3 par Akt permet d'éviter la dégradation de ces cyclines et de ce fait, de promouvoir l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire, et leur prolifération (71).

d) mTOR

mTOR représente une confluence des voies de signalisation pour la prolifération cellulaire et est en réalité un complexe protéique. Il perçoit, entre autres, la disponibilité des nutriments pour la cellule et le niveau d'énergie cellulaire. Deux complexes de mTOR existent dans la cellule, le mTORC1 et le mTORC2. Le mTORC1 est composé de mTOR, du regulatory associated protein of mTOR (Raptor), de proline rich Akt/PKB substrate protein (PRAS40), du death domain containing mTOR interacting protein (Deptor) et du mammalian lethal with SEC13 protein 8 (mLST8). Lorsque Akt est activé, il permet à mTORC1 de participer à la biosynthèse protéique et à la croissance cellulaire. En effet, une fois phosphorylé, Akt va phosphoryler tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) et c'est TSC2 qui va participer à l'activation de mTORC1 en le phosphorylant (86, 87). L'activation de mTORC1 induit la phosphorylation de eIF4E binding protein (4EBP1) et permet ainsi la déstabilisation du complexe 4EBP1-eIF4E. Une fois libérée de 4EBP1, eIF4E stimulera la traduction des ARNm coiffés et, ensuite, la phosphorylation nécessaire pour l'activation de la p70 ribosomal S6 kinase (p70S6K) sur sa thréonine 389. p70S6K est une protéine qui possède comme substrat principal la protéine

ribosomale S6. Cette dernière représente une composante essentielle de la sous-unité ribosomale 40S. L'activation de la protéine S6 aboutit à la synthèse protéique (87-89). Le mTORC2, lui est nécessaire pour l'activation d'Akt comme précédemment relevé et est composé de mTOR, mLST8, raptor independent companion of mTOR (riCTOR), mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1 (mSIN1) et de ProTOR-1 (protein observed with rictor-1) (87).

1.6 Interaction entre la voie PI3K/Akt et les hormones régulant les fonctions endocrines de l'ovaire

Comme relevé ci-dessus, la voie PI3K/Akt est une des voies centrales dans la survie, la prolifération ainsi que la dynamique folliculaire. Elle se trouve dans la croisée des chemins de l'action de différentes hormones qui agissent sur l'ovaire. Il y a d'une part les gonadotrophines hypophysaires (FSH et LH), dont nous avons relevé les aspects moléculaires dans les paragraphes antérieurs. En dehors de ces hormones, il y a celles produites au niveau ovarien qui entrent en interaction avec la voie PI3K/Akt. Dans le cadre de notre étude, nous allons aborder essentiellement les interactions entre cette voie et les androgènes ainsi que les œstrogènes. En effet, ces différents stéroïdes influencent Akt, et Akt à son tour les influence, ce qui établit une véritable communication croisée.

Akt, les œstrogènes et les récepteurs aux œstrogènes : les œstrogènes exercent leurs effets biologiques en se liant et en activant leurs récepteurs cytoplasmiques qui migrent ensuite dans le noyau, et agissent comme facteur de transcription. En plus, cette liaison d'œstrogènes avec leurs récepteurs induit des effets non génomiques. L'action des œstrogènes est très complexe. Outre la voie de liaison avec ses récepteurs cytoplasmiques qui aboutissent à des actions génomiques et non génomiques, les œstrogènes possèdent des actions issues de leur liaison directe avec leurs récepteurs membranaires (90). Plusieurs études démontrent ainsi que les œstrogènes sont capables de générer des actions rapides par leur interaction avec un nombre limité de récepteurs membranaires d'œstrogènes. Cette interaction résulte en l'activation, entre autres, de la voie PI3K/Akt. En effet, les œstrogènes, après liaison à leurs récepteurs membranaires, vont activer la phosphorylation d'Akt. Cette activation se fait soit directement en activant PI3K, soit indirectement en stimulant les récepteurs de facteurs de croissance comme

l'insulin-like growth factor receptor (IGFR) et l'epidermal growth factor receptor (EGFR) (90, 95-97). Akt activé phosphoryle ER α et crée ainsi une communication croisée avec les œstrogènes. En effet, Akt phosphoryle ER α sur des sites spécifiques (sérine 167). La phosphorylation d'ER α permet l'augmentation de son activité translationnelle, la transcription de ses gènes cibles même en l'absence des œstrogènes (90, 91). Des études *in vitro* sur des lignées cellulaires ont montré que cette phosphorylation d'ER α sur la sérine 167 accroît le niveau protéique d'ER α en inhibant sa dégradation par le protéasome (92). Par conséquent, Akt contribue à l'augmentation de l'action des œstrogènes via leurs récepteurs. En dehors de ces effets liés à la phosphorylation des sites spécifiques, il a été démontré que l'activation constitutive d'Akt diminuait la liaison des ER α avec l'ADN (93). Akt influence aussi le récepteur bêta des œstrogènes (ER β). En effet, des études sur les souris ont démontré que la phosphorylation d'ER β sur la sérine 255 était capable d'inhiber son activité transcriptionnelle en inhibant son interaction avec son cofacteur, le CBP (94).

Akt, les androgènes et les récepteurs des androgènes : Comme pour ER, les récepteurs aux androgènes (AR) interagissent aussi avec la voie de signalisation impliquant Akt. Des études *in vitro* et cliniques ont démontré qu'Akt phosphoryle AR sur les sérines 213 et 791. Ce qui aboutit à la réduction de la transactivation, de la stabilité d'AR ainsi qu'à la réduction de la traduction de ses gènes cibles (91). Certaines études ont montré l'existence d'une synergie entre Akt et AR en dehors de la voie de phosphorylation (98). En effet, Xin *et al.* ont démontré que le cancer de la prostate était progressif aussi bien chez les mutants qui manquent ces sites de phosphorylation spécifique d'AR par Akt que chez les souris de type sauvage (98). AR à son tour, influence l'activité d'Akt. En effet, AR permet la stabilisation de la protéine FKBP5 qui est une chaperonne de la phosphatase d'Akt, la PHLPP. La PHLPP induit la déphosphorylation d'Akt. Celle-ci aboutit à l'inactivation d'Akt. En stabilisant la chaperonne de la PHLPP, AR contribue à maintenir la PHLPP active, et à participer ainsi à l'inactivation d'Akt (99, 100).

1.7 Les traitements hormonaux chez la femme et leur impact sur l'ovaire

Divers traitements hormonaux sont utilisés en thérapeutique gynécologique dans la prise en charge des diverses pathologies. En pratique courante, 5 types de substances sont utilisées à

cette fin avec des buts variés. Ce sont les œstrogènes, les progestatifs, les agonistes de la GnRH, les stimulateurs d'ovulation et de façon moins fréquente, les androgènes. Dans le cadre de notre étude, nous allons aborder essentiellement les œstrogènes et les androgènes bien que les stimulateurs d'ovulation et les agonistes de la GnRH ont un effet sur l'ovaire et la dynamique folliculaire. Ces deux groupes d'hormones stéroïdiennes sont couramment utilisés en thérapie chez la femme, et leurs effets sont très variables. Ils possèdent des récepteurs qui appartiennent à la famille des récepteurs stéroïdiens. Ces derniers sont principalement localisés au niveau cytoplasmique, et migrent dans le noyau après leurs liaisons avec les ligands, et agissent comme facteur de transcription. Ils stimulent de ce fait la synthèse des ARNm des gènes cibles (7).

1.7.1 Les œstrogènes

Les œstrogènes sont couramment utilisés en thérapeutique et leur chef de file est le $17\beta\text{-E}_2$. Sur le plan physiologique, leurs actions sont étendues sur l'organisme étant donné l'expression de leurs récepteurs dans divers organes. Ces récepteurs s'expriment au niveau du tissu adipeux, de l'os, de l'hypothalamus, de l'hypophyse, du sein, de l'utérus, du vagin et de l'ovaire ainsi que dans d'autres organes. Il existe principalement deux types des récepteurs aux œstrogènes comme signalé ci-haut, et c'est leur répartition qui permet la résultante des actions au sein d'un tissu. Notre étude étant ciblée sur l'ovaire, il sied de signaler qu'au sein de l'ovaire, $\text{ER}\alpha$ est plus exprimé au sein des cellules de la granulosa, alors que les cellules thécales expriment plus $\text{ER}\beta$. Chacune des isoformes d'ER possède des effets spécifiques. En effet, $\text{ER}\alpha$ serait plus impliqué dans la prolifération alors qu' $\text{ER}\beta$ dans la différenciation (7).

En thérapeutique, les œstrogènes sont principalement utilisés en contraception dite hormonale, le plus souvent en combinaison œstroprogestative chez les femmes en âge de reproduction (101, 102). Chez les femmes ménopausées et les femmes atteintes d'IOP, ils sont essentiellement utilisés comme traitement substitutif pour prévenir les complications de la carence hormonale (103, 104). Cela se réalise le plus souvent en utilisation locale (au niveau vaginal par exemple) quand ils sont utilisés seuls. Ils sont associés avec les progestatifs quand ils sont utilisés par voie générale pour prévenir leurs effets secondaires multiples (104). Au niveau de l'ovaire, leur utilisation bloque la maturation folliculaire et l'ovulation, et ce,

indirectement par la suppression de la sécrétion de gonadotrophines (102). Certains auteurs ont associé l'utilisation de la contraception œstroprogestative avec la survenue tardive de la ménopause tandis que d'autres ne retrouvent pas cette association (105). Les effets directs du traitement œstrogénique sur l'ovaire, comme l'inhibition de la formation des follicules primordiaux, de la croissance folliculaire sont de plus en plus reconnus. Cependant, les mécanismes sous-jacents quant à eux, restent encore peu connus (106). Les effets dépendent aussi du moment de l'exposition aux œstrogènes. En effet, chez les rongeurs, une exposition néonatale aboutit à une inhibition de la formation des follicules primordiaux, à une augmentation des follicules multi-ovocytaires, et finalement à une baisse du nombre des follicules primordiaux (106). Une exposition plus tardive aux œstrogènes aboutit à des perturbations de la dynamique folliculaire comme l'arrêt de la croissance folliculaire, et à la formation de kystes (106).

1.7.2 Les androgènes

Les androgènes sont également utilisés en thérapeutique chez la femme bien que de façon limitée par rapport aux œstrogènes. Leurs actions chez les femmes sont diversifiées et dépendent de la localisation de leurs récepteurs. Ces derniers sont localisés au niveau du bulbe pilo-sébacé, des muscles squelettiques, du cortex cérébral, du sein, de l'utérus et de l'ovaire (7). Le nombre de ces récepteurs varie suivant plusieurs paramètres ou facteurs, notamment le tissu concerné, le type cellulaire et au sein d'une cellule, selon l'âge de la femme. Dans la plupart des tissus cibles chez la femme, la testostérone, le chef de file des androgènes, est transformée en sa forme active qui est la DHT.

Les androgènes voient leur utilisation thérapeutique chez la femme s'élargir de plus en plus. En effet, la déhydroépiandrosterone (DHEA) est utilisée en clinique pour améliorer la fertilité chez les femmes qui présentent une RO diminuée comme publié dans l'étude de Gleicher et celle de Sunkara (36, 107). Dans ces deux études, bien qu'ayant peu de cas et peu de contrôles, les auteurs ont trouvé que le taux de fausses couches était réduit chez les femmes qui avaient reçu une supplémentation en DHEA. Elles rapportent également une augmentation du taux de grossesses et de naissances vivantes. Lors de la fécondation *in vitro* (FIV),

la supplémentation en androgènes permet de diminuer la quantité de gonadotrophines normalement utilisée. Cependant, l'excès des androgènes est délétère pour la reproduction féminine comme en cas du syndrome SOPK tel que développé dans la section suivante. Outre les effets centraux (au niveau du cerveau) des androgènes, leurs effets directs (périphériques) sur l'ovaire sont aussi rapportés. Les effets périphériques consistent en la perturbation de la sélection du follicule à ovuler, et en la prévention de l'apoptose ainsi qu'en la perturbation de la croissance folliculaire (108). Comme pour les œstrogènes, les mécanismes qui sous-tendent ces observations demeurent peu élucidés, et méritent d'être étudiés.

1.8 Pathologies ovariennes retentissant sur la folliculogénèse et impliquant la voie PI3K/Akt : cas du SOPK

En dehors de l'IOP, la perturbation de la voie PI3K/Akt résulte également en plusieurs autres pathologies bénignes, mais qui ont un impact sur la fertilité féminine comme l'endométriose, la myomatose utérine et le SOPK. Étant donné que notre étude est centrée sur l'ovaire, nous allons nous focaliser à développer essentiellement cette dernière pathologie en ressortant l'importance de la voie PI3K/Akt. Le SOPK représente la pathologie endocrinienne la plus fréquente chez la femme en âge de procréer. Il est caractérisé par un nombre élevé des follicules préantraux, un arrêt de la maturation folliculaire ainsi que des troubles de sélection du follicule dominant. Ces troubles résultent ainsi en une dys- ou anovulation chronique (60). Sur le plan hormonal, il y a une hyperandrogénie à la suite d'un excès de stimulation de la thèque par la LH. L'augmentation de la LH est consécutive à une augmentation de la sécrétion pulsatile de la GnRH. Dans le SOPK, il y a également un hyperinsulinisme secondaire. Cet excès d'insuline agit sur l'ovaire puisque les cellules de la granulosa et de la thèque possèdent des récepteurs à l'insuline (60). Les androgènes agissent sur la croissance cellulaire et possèdent une activité anti-apoptotique. Ces actions sont médiées par l'activation de la voie PI3K/Akt et celle de MAPK. Il est, en outre, reconnu que la voie PI3K/Akt accroît les effets anti-GnRH de l'IGF-I. L'élévation de l'insuline au niveau folliculaire active l'expression de PTEN dans les cellules de la granulosa, et résulte en une inactivation d'Akt (109). De plus, les résultats de certaines études suggèrent que l'ovulation induite par la metformine, un antidiabétique oral utilisé en cas de SOPK, se produit grâce à la phosphorylation d'Akt via les récepteurs de l'insuline (110).

Ces différentes données indiquent que le SOPK et la voie PI3K/Akt sont liés, et que les mécanismes à la base de ce lien sont complexes. Ce qui démontre l'importance de bien étudier Akt au sein de l'ovaire comme nous allons l'aborder dans cette thèse.

1.9 Problématique, hypothèses et objectifs de la recherche

L'ovaire, comme d'autres organes qui font partie de la sphère gynécologique, est très dynamique et sa régulation exige des mécanismes très complexes. Cette complexité concerne aussi bien la protection de la RO, la dynamique folliculaire, l'ovulation que le VO. Ces différents processus biologiques exigent l'implication des voies moléculaires de signalisation. La voie PI3K/Akt en occupe une place centrale, et est très critique en raison de son implication dans les processus de prolifération, croissance et apoptose cellulaires qui sous-tendent les divers processus biologiques ovariens susmentionnés. L'étude de cette voie de signalisation revêt de ce fait une importance capitale et une meilleure compréhension de cette voie de signalisation à travers les isoformes de Akt permettra de concevoir de nouvelles thérapies pertinentes aux pathologies découlant de la perturbation de ces processus.

Les pathologies ovariennes ayant un lien avec la voie PI3K/Akt sont parmi les causes fréquentes de l'infertilité féminine. Cette dernière représente un problème de santé publique important étant donné sa prévalence qui varie autour de 16 % dans les pays industrialisés (111, 112). Parmi ces pathologies, le VO prématuré ou la diminution de la RO constituent des problèmes à investiguer. En effet, au cours de ces dernières années, la prévalence de la diminution de la RO comme facteur d'infertilité n'a cessé d'augmenter avec l'augmentation du nombre de femmes qui cherchent à avoir leur premier enfant au-delà de 35 ans. Conséquemment, en Amérique du Nord, jusqu'à 20 % de femmes ont leur première grossesse au-delà de 35 ans (113). Différents traitements sont utilisés pour contrer l'infertilité féminine. Au cours des dernières années, de plus en plus d'études ont été réalisées sur l'utilisation de traitements qui ont un impact sur la RO. Par exemple, l'utilisation de le DHEA est croissante. La réserve ovarienne ne peut jamais augmenter. Le traitement au DHEA a pour effet d'augmenter le développement d'ovocytes à partir des ovocytes primaires qui constituent la RO. Il y a aussi des traitements qui ont un lien avec Akt comme l'utilisation d'œstrogènes et d'androgènes,

mais dont les mécanismes restent à élucider (36, 114). Concernant le VO, l'accent est actuellement mis sur le développement de thérapies (115). Le développement de thérapies appelle avant tout à l'élucidation des mécanismes de survenue de la pathologie. Par ailleurs, du point de vue physiologique, beaucoup de choses restent à comprendre sur le plan mécanistique concernant le rôle de certains types cellulaires dans le follicule. En effet, en dépit du rôle central des cellules de la granulosa au sein du follicule et sur son destin, la régulation moléculaire et la caractérisation de différentes voies de signalisation dans ces cellules ne sont pas clairement connues (9).

Malgré l'abondance de connaissances qui montrent l'implication d'Akt dans l'ovaire comme abordé dans les différentes sections précédentes, la plupart de ces connaissances demeurent d'ordre général. Comme Akt a trois isoformes qui sont reconnues pour avoir des rôles spécifiques et même parfois opposés, l'étude des trois isoformes d'Akt pourra permettre de comprendre de manière plus spécifique le rôle d'Akt dans la physiologie de l'ovaire. Des travaux réalisés dans notre laboratoire et aussi par d'autres équipes ont montré la spécificité d'action et la redondance de fonction des isoformes d'Akt. Ces travaux concernent l'implantation embryonnaire *in vivo*, la décidualisation *in vitro*, le trouble du métabolisme glucidique et l'évolution du cancer de l'ovaire (69, 80, 81). La plupart des médicaments qui visent la stimulation d'Akt et qui sont utilisés pour la conception chez les femmes infertiles sont limités en usage *in vitro* par manque de sélectivité de leur action sur les isoformes d'Akt. Ces médicaments possèdent ainsi beaucoup d'effets secondaires. Cependant, leurs effets sur la stimulation de la croissance folliculaire et l'induction d'ovulation *in vitro* en FIV sont démontrés, notamment pour pallier l'infertilité chez les femmes atteintes d'IOP désireuses de concevoir (116, 117).

Eu égard à tout ce qui précède et malgré cette implication d'Akt dans l'ovaire, il n'existe cependant pas des travaux à notre connaissance qui investiguent les rôles des isoformes d'Akt en rapport avec les processus normaux, le VO ou la RO. Il nous a paru ainsi opportun de mener cette étude dans le but de comprendre le lien entre ces différents processus et les isoformes d'Akt. Les résultats de cette étude pourront ouvrir la voie à des perspectives thérapeutiques plus spécifiques, et d'espérer réduire l'effet secondaire de traitements affectant Akt et réduire l'impact grandissant des conséquences de différentes pathologies.

1.10 Choix du modèle expérimental, correspondances avec la femme et éléments spécifiques du cycle œstral

a) Choix du modèle expérimental et correspondances avec la femme

L'étude approfondie sur les ovaires du point de vue morphologique et de la signalisation cellulaire nécessite la disponibilité des matériels biologiques. Le recours à des modèles expérimentaux, notamment animaux, rend possibles de telles études. Parmi ceux-ci, les rongeurs sont couramment utilisés (voir la structure des organes génitaux interne de la souris à la figure 1.1). Dans la réalisation de notre thèse, nous avons eu recours aux souris comme modèle. En effet, nous avons utilisé des souris de type sauvage et Akt3 KO dans nos différentes expérimentations. L'étude du VO induit a été réalisée grâce à une double approche *in vivo* et *in vitro*. Ceci nous a permis d'avoir une bonne perspective des phénomènes tout en étant complémentaires quant aux lacunes de chacune d'elles. En plus, pour l'étude des effets des androgènes sur les isoformes d'Akt, nous avons utilisé un modèle moins complexe des cellules de la granulosa que nous avons isolées à partir des ovaires des souris de type sauvage.

Bien que ce modèle revête quelques limitations, notamment le fait de posséder une certaine variabilité, beaucoup d'auteurs s'accordent quant à son utilisation. Cette dernière concerne la physiologie et la pathologie ovariennes, notamment dans les aspects abordés dans cette thèse comme la RO, la dynamique folliculaire et le VO (119). Une telle utilisation se justifie pour plusieurs raisons, à savoir :

- Un grand recul d'utilisation des souris sur plusieurs décennies, et qui couvre des aspects aussi variés de la pathologie ovarienne.
- Les souris expriment un bon mimétisme avec la femme en modèle spontané, et surtout en modèle du VO induit par le VCD. Ce mimétisme concerne plusieurs aspects aussi bien morphologiques, moléculaires qu'hormonaux, nonobstant certaines spécificités liées à l'espèce.
- La flexibilité de générer des modèles spécifiques, notamment par le KO des gènes en plus de la reproductivité élevée.

En vue de faciliter la compréhension de nos résultats, et les différentes approches utilisées ainsi que leur application ou extrapolation à l'espèce humaine, nous avons trouvé utile de rappeler quelques similitudes et différences chez les souris par rapport à la femme. Nous allons aborder ces aspects sur trois points de vue, notamment sur le plan du cycle d'activité ovarienne, sur le plan hormonal et du déroulement des événements reproductifs ainsi que de la durée de vie.

- **Sur le plan du cycle d'activité ovarienne :** ce cycle d'activité se révèle chez la femme par les menstruations alors que chez la souris, il se manifeste par un comportement d'œstrus en vue de l'accouplement. Il n'existe pas de menstruation chez la souris. Ainsi, chez la femme, on parle du cycle menstruel alors que chez la souris du cycle estrien ou œstral. L'œstrus et les menstruations marquent les débuts des cycles, respectivement estrien chez la souris et menstruel chez la femme. Dans les deux espèces, normalement les cycles se succèdent toute l'année sauf en cas de gestation. L'ovulation a lieu au début du cycle estrien alors que pour le cycle menstruel, elle a lieu en son plein milieu (120). En ce qui concerne la durée du cycle, chez la souris, elle est de 4-5 jours alors que chez la femme, elle est en moyenne de 28 jours. Chez la souris, la phase folliculaire dure environ 2 à 3 jours alors que chez la femme, elle dure en moyenne 14 jours. La phase lutéale qui succède à l'ovulation dure chez la souris entre 1-2 jour, alors que chez la femme, elle est de 14 jours (120). Chez la femme, au niveau ovarien, le cycle est divisé en deux phases, soit la phase folliculaire avant l'ovulation, et la phase lutéale après celle-ci. Chez la souris, il y a 4 phases dans le cycle, notamment le proestrus (P) avant l'ovulation et l'œstrus (E) au soir duquel se produit l'ovulation, suivie du metestrus (M) et de diestrus (D) (118). Cette succession de plusieurs phases dans un temps court chez la souris rend parfois complexes les études au niveau ovarien et hormonal. Enfin, la souris est une espèce poly-ovulante alors que la femme est mono-ovulante. Aussi, du fait du temps court du cycle estrien, et de la régression lente des corps jaunes même s'ils ne sont plus fonctionnels, plusieurs populations de corps jaunes et de follicules matures coexistent dans l'ovaire des souris (120). Les aspects anatomiques macroscopiques et microscopiques des ovaires abordés précédemment sont similaires dans les deux espèces. Ces similitudes

concernent également la microscopie et la dynamique fonctionnelle des follicules, seulement les durées sont différentes (120).

- Sur le plan hormonal :** en vue de circonscrire notre propos, nous allons aborder cet aspect essentiellement sur le plan ovarien. Dans la phase folliculaire chez la femme, il y a sécrétion prédominante de E₂ et en phase lutéale, de la progestérone (120). Chez la souris, durant la phase P du cycle, les follicules antraux qui croissent sous l'influence de la FSH, secrètent les œstrogènes, notamment l'E₂. Cette production croissante d'E₂ va atteindre son pic, et provoquer la décharge ainsi que le pic de LH au niveau hypophysaire, induisant ainsi l'ovulation. L'ovulation correspond à l'apparition de l'œstrus. Avec la constitution du corps jaune, la sécrétion de la progestérone va devenir prédominante durant le M et le D comme le montre la figure 1.8 ci-dessous. Elle illustre par ailleurs les différentes variations hormonales durant le cycle œstral au niveau sérique (121).

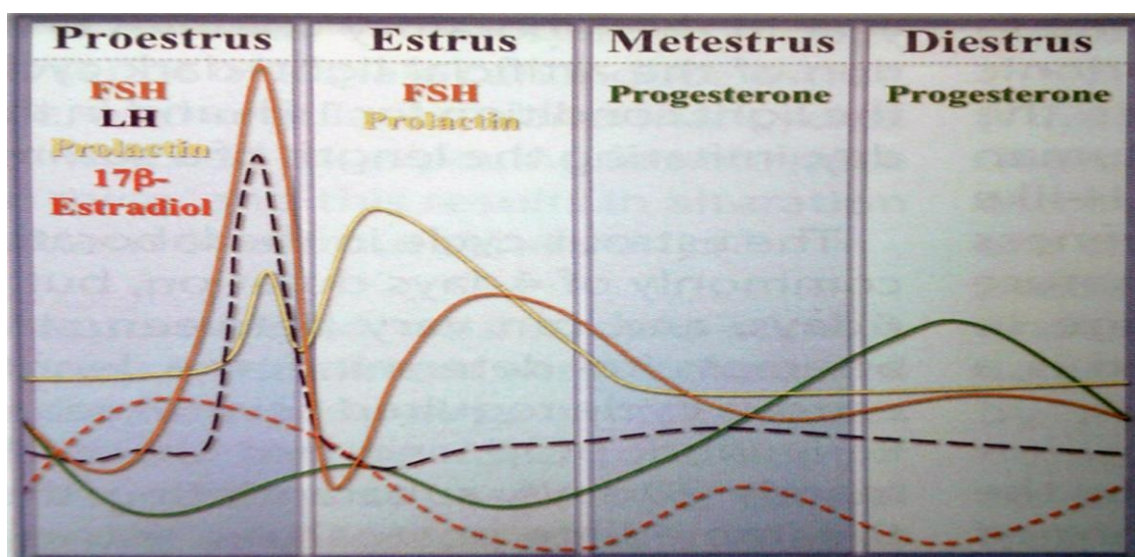


Figure 1.8 Profil hormonal sérique durant les différentes phases du cycle œstral chez la souris.

(Tirée de *The Guide to Investigation of Mouse pregnancy*.)

- Sur le plan du déroulement chronologique des événements reproductifs :** ici nous voulons relever certains aspects de la vie reproductive des souris comparativement à ce qui se passe chez la femme. Chez la souris, la maturité sexuelle est atteinte

notamment avec les premières ovulations visibles autour de 40 jours après la naissance (121), alors que chez la femme la puberté s'établit autour de 12-13 ans, et les premières ovulations vont s'établir quelques années plus tard (122). La ménopause, qui correspond à la cessation de l'activité ovarienne à la suite de l'épuisement des follicules et des ovulations, survient chez la femme autour de 50 ans. Si chez la femme, en postménopause, les taux circulants d'œstrogènes deviennent indétectables; chez les souris, bien que les ovulations cessent, l'ovaire garderait encore une certaine activité dans la production de l'E2 (119). Les irrégularités du cycle œstral chez la souris, notamment l'allongement de la durée du M, apparaissent autour de 9-12 mois d'âge. Cette étape qui correspond à peu près à la périménopause chez la femme a lieu aux environs de 40-45 voire 50 ans (119). C'est à l'âge de 16-18 mois que les souris exhibent l'état d'anoestrus persistant qui correspond à la postménopause de la femme (119).

b) Quelques éléments spécifiques du cycle œstral chez la souris

Avant de clore ce point relatif à notre modèle, nous avons trouvé utile de relever quelques éléments propres au cours du cycle œstral chez la souris en plus de ceux épinglés précédemment.

- Concernant la dynamique folliculaire, les follicules primordiaux apparaissent 1 à 2 jours après la naissance. Les follicules primaires sont présents 3 jours en postnatal. Au septième jour de vie, les follicules secondaires apparaissent. La majorité de follicules sont primordiaux comme chez la femme, et à la naissance leur nombre est estimé à 8000. Ce nombre décline à 2500 déjà au septième jour de vie à la suite de l'atrésie (121). Il faut approximativement 16 jours pour qu'un follicule atteigne le stade pré-ovulatoire. Après l'ovulation, les corps jaunes chez la souris persistent jusqu'à 4 cycles après sa régression fonctionnelle.
- Concernant le cycle d'activité ovarienne, les souris sont très réactives aux différents stimuli externes, notamment le stress social associé à la compétition. Ce dernier apparaît souvent dans les hébergements des souris en surpopulation dans les cages, et conduit à des irrégularités des cycles œstraux comme l'augmentation de la durée de

la phase D du cycle. Un autre facteur qui influence le cycle œstral est la luminosité environnementale (121). En effet, une exposition lumineuse continue induit une absence d'ovulation, une formation des kystes ovariens et par conséquent, un allongement du cycle œstral.

Notre travail s'est d'abord intéressé à **caractériser les isoformes d'Akt dans l'ovaire au travers du cycle œstral**, un processus biologique dynamique et complexe sur le plan endocrinologique et de la morphologie cellulaire. Nous nous sommes attelés à étudier, dans les quatre phases du cycle œstral chez la souris C57 BL/6J, la compartimentalisation, l'expression et l'activation de chaque isoforme d'Akt, ainsi que leurs variations spécifiques dans ce contexte physiologique. Cette caractérisation est très importante étant donné que peu d'informations existent sur la régulation des isoformes d'Akt au travers du cycle œstral. Cette information aura des implications qui permettront de cibler l'isoforme d'Akt à étudier en fonction du type cellulaire ou des structures ovariennes ainsi que des effets potentiels des hormones qui prédominent dans chaque phase du cycle œstral.

Par la suite, nous avons focalisé notre intérêt sur **la régulation des isoformes d'Akt par les stéroïdes ovariens** en les étudiant dans un modèle moins complexe que sont les cellules de la granulosa. Ces cellules président ensemble avec l'ovocyte au destin folliculaire, mais plusieurs auteurs reconnaissent que les voies de signalisation dans ces cellules ont été peu étudiées (9). Elles possèdent des récepteurs pour différentes hormones et molécules qui régulent leur destinée, et celle de l'ovocyte. Il a été montré que certaines isoformes d'Akt étaient impliquées dans des pathologies hyperandrogéniques comme le SOPK ou la maturation des follicules est bloquée par l'excès d'androgènes et les follicules immatures s'accumulent, sans follicule dominant. Il en est de même pour l'utilisation de la DHEA pour l'amélioration clinique de la fertilité chez les femmes qui présentent une RO diminuée. En considérant ces observations, il nous est paru utile d'étudier l'impact du traitement androgénique sur les isoformes d'Akt étant donné que les mécanismes de ces traitements ne sont pas clairement élucidés. D'autre part, les œstrogènes abondamment utilisés dans la contraception orale comme décrit précédemment ne peuvent pas rester en dehors de notre champ d'études. Pour toutes ces raisons nous nous sommes penchés sur l'étude de la régulation des isoformes d'Akt au sein d'un

modèle de culture des cellules de la granulosa isolées à partir des ovaires des souris C57 BL/6J de type sauvage.

Ensuite, nous avons conduit des expériences pour explorer **les possibles rôles d'Akt3 sur la RO, la dynamique folliculaire et l'ovulation**. Le choix de l'étude d'Akt3 au sein de l'ovaire par rapport aux autres isoformes d'Akt s'explique par plusieurs raisons. D'abord, cette isoforme est la moins étudiée concernant la physiologie ovarienne. En effet, des données existent sur les effets de l'élimination des autres isoformes d'Akt dans l'ovaire, notamment celle d'Akt1 (118). L'élimination d'Akt1 résulte, entre autres, en une diminution des follicules primordiaux. En revanche, ces données étaient manquantes pour Akt3. Ensuite, le développement de l'élimination d'Akt3 n'exige pas un KO conditionnel, que le modèle était disponible et les souris déficientes en Akt3 sont viables. De plus, des données récentes révèlent que l'inhibition d'Akt3 résulte en une augmentation de la croissance du cancer ovarien (81). Cette observation révèle qu'Akt3 pourrait jouer un rôle dans la physiologie ovarienne. Étant donné l'implication reconnue d'Akt d'une manière générale dans divers processus ovariens, et que très peu d'études abordent les rôles d'Akt3, nous avons étudié l'effet du KO spécifique d'Akt3 sur ces différents processus.

Finalement, notre attention s'est orientée sur **l'étude des isoformes d'Akt dans le VO ou l'épuisement de la RO**. Une telle étude nécessiterait le développement d'un modèle de KO conditionnel et spécifique aux ovaires qui génère de simples, doubles et triples KO des isoformes d'Akt. Le développement d'un tel modèle nécessiterait un temps matériel considérable qui dépasserait le cadre de notre doctorat. C'est ainsi que nous avons préféré analyser l'expression de ces isoformes dans un modèle de VO induit en utilisant le VCD, grâce à une double approche *in vitro* et *in vivo*.

Les hypothèses principales étudiées dans notre thèse sont les suivantes :

- 1) Les isoformes d'Akt sont différemment régulées dans l'ovaire au travers du cycle œstral.
- 2) Les stéroïdes ovariens ainsi que le VCD régulent Akt de manière isoforme- spécifique.

- 3) Il existe une spécificité dans l'implication des isoformes d'Akt dans le processus du VO malgré les redondances possibles.
- 4) Akt3 pourrait jouer un rôle possible dans divers processus biologiques ovariens, particulièrement dans la préservation de la RO, la dynamique folliculaire et l'ovulation.
- 5) Akt joue un rôle crucial dans la protection de la RO et, de ce fait, pourrait être un élément de régulation dans la prévention de son épuisement précoce.

Au total, nous avons pu caractériser l'implication des isoformes d'Akt dans divers processus physiologiques ovariens et déterminer les mécanismes de leur régulation par les androgènes, les œstrogènes et le VCD. Nous avons également dévoilé des rôles particuliers d'Akt3 dans la régulation de la RO, la dynamique folliculaire, l'ovulation et du volume ovarien. Nos résultats jettent des bases pour des études plus approfondies cliniques afin d'utiliser ces résultats pour mieux cibler les thérapies pouvant impliquer les isoformes d'Akt. Ils pourront servir au développement des thérapies pour les femmes à risque du VO précoce et désireuses de maternités.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET METHODES

2.1 Animaux et procédures d'étude

Les souris C57BL/6J de type sauvage ou *wild type* (WT) âgées de 60 jours ont été achetées chez Charles River Laboratories. Tandis que les souris Akt3^{-/-}, de même souche et âge que les souris de type sauvage, ont été obtenues, à l'origine, du Dr M. Birnbaum (University of Pennsylvania). Les souris ont été hébergées et croisées pour obtenir des générations subséquentes dans l'animalerie de l'Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR). Les souris étaient gardées dans des conditions standard d'élevage. Elles étaient nourries avec les nourritures commerciales et l'eau *ad libitum*. L'hébergement respectait un cycle de 14 h d'obscurité et 10 h de lumière. Toutes les procédures ont été approuvées par le comité d'éthique et de bons soins aux animaux de l'UQTR. Les souris femelles étaient gardées, et à l'âge de 45 jours et 100 jours, elles étaient euthanasiées selon la phase du cycle œstral désirée suite au résultat du frottis vaginal. L'euthanasie était réalisée par dislocation cervicale après anesthésie à l'isoflurane (Santa Cruz Animal Health). Immédiatement après l'euthanasie, les ovaires étaient récupérés, puis fixés avec le paraformaldéhyde (PFA) 4 % dans du Phosphate Buffer Saline (PBS) pour 16-18 heures ou durant toute la nuit à 4 °C. Ensuite, les ovaires étaient déshydratés par des incubations dans des bains de concentration progressive d'alcool (70 %-95 %-100 % et de NeoClear®). Chaque incubation avait une durée de 20 minutes. Par la suite, les ovaires étaient enrobés dans la paraffine pour l'histologie. Pour les autres analyses, notamment le western blot (WB) et la réaction en chaîne de la polymérase (PCR), les ovaires étaient récupérés et traités directement comme décrit ci-dessous dans les sections concernées.

Les souris de type sauvage utilisées dans le projet d'induction du VO étaient âgées de 21 jours à leur arrivée à l'animalerie, et gardées pendant une semaine pour accommodation avant le début du traitement. Deux types d'expérimentation ont été réalisés. Le premier type, *in vitro* comprenait 20 souris réparties en deux groupes de 10 souris chacun, un groupe contrôle et

un groupe traitement. Le deuxième type a été conduit *in vivo*, et comprenait la même répartition des souris.

En ce qui concerne les expériences relatives à la culture des cellules de la granulosa ovarienne, les souris utilisées étaient également de type sauvage, immatures, et âgées de 21-23 jours. Elles étaient issues des croisements dans l'animalerie de l'UQTR de souris génitrices qui provenaient de Charles River, ou elles étaient achetées directement du même laboratoire.

2.2 Isolation et culture des cellules de la granulosa ovarienne

L'isolation de cellules de la granulosa a été faite en se référant aux publications antérieures, notamment celle de Tian *et al.* (9). Brièvement, les ovaires étaient recueillis sur la glace dans un milieu froid constitué de L-15 supplémenté avec 1 mg/ml de BSA (bovine serum albumin), 100 mg/ml de streptomycine et 100 UI/ml de pénicilline. Ensuite, ils étaient débarrassés de la graisse sous un stéréo microscope (de marque Zeiss, Stemi 305) et nettoyés avant la dissection mécanique réalisée en utilisant des aiguilles G25. Les ovaires étaient ainsi sectionnés, les follicules étaient perforés, et les cellules de la granulosa étaient séparées les unes des autres. La manipulation était faite en respectant les mesures d'asepsie. Les cellules de la granulosa étaient alors recueillies dans des tubes de 15 ml, centrifugées à 1200 rpm pendant 5 minutes à l'aide d'une centrifugeuse de marque Sorvall ST 40R (Thermo Scientific, Canada). Les cellules de la granulosa étaient par la suite suspendues dans le milieu de McCoy's 5 α . Ce dernier était supplémenté de 5 % FBS (Fetal Bovin Serum), de 100 mg/ml de streptomycine, de 100 UI/ml de pénicilline, gentamicine, et de 10^{-7} M d'androstènedione. Les cellules viables étaient comptées à la suite de la coloration au bleu de trypan, et à l'aide d'un hémacytomètre. Les cellules de la granulosa étaient cultivées dans des plaques de 6 puits (900.000 cellules/puits) avec des volumes appropriés du milieu de culture McCoy's 5 α supplémenté comme décrit ci-dessus. Les plaques étaient par la suite placées dans des incubateurs sous une atmosphère humide, à 37 °C et 5 % de CO₂ pendant 24 heures afin de permettre leur adhérence avant de débiter les différents traitements.

2.3 Induction du vieillissement ovarien par le 4-vinylcyclohexène diépoxyde

2.3.1 Expérimentation *in vitro*

À l'âge de 28 jours, les souris de type sauvage ont été assignées de façon aléatoire à l'un ou l'autre groupe expérimental. Après acclimatation d'une semaine à l'animalerie, les souris ont été directement euthanasiées, et les ovaires étaient récupérés de façon aseptique sous la hotte et maintenus en culture dans des plaques de 6 puits sur le Millicel®. Le milieu de culture était fait du α -MEM supplémenté avec 5 ng/ml de transferrine, 5 ng/ml de sélénium, 10 % de FBS, 100 mg/ml de streptomycine et 100 UI/ml de pénicilline. La culture a été réalisée dans des incubateurs dans une atmosphère humide à 37 °C et 5 % de CO₂ pendant quatre jours. Dans le groupe traitement, 60 μ M de VCD était ajouté au milieu de culture, alors que dans le groupe contrôle seul le milieu de culture était maintenu. Le milieu de culture et le traitement étaient renouvelés au deuxième jour de culture. À l'issue de ces 4 jours de traitement, les ovaires étaient récupérés pour les différentes analyses.

2.3.2 Expérimentation *in vivo*

Quant à l'expérimentation *in vivo*, 20 souris également âgées de 28 jours ont été réparties en deux groupes de 10, un groupe traitement qui recevait le VCD, et un groupe contrôle qui recevait le diluant (huile de sésame). Le traitement consistait en l'administration intrapéritonéale du VCD (160 mg/kg/j) dilué dans l'huile de sésame pendant 15 jours, alors que le groupe contrôle ne recevait que l'huile de sésame (20 μ l/g/j). Les souris étaient pesées tous les jours avant l'injection afin de réajuster la quantité des produits à administrer. À la suite des injections, les souris étaient surveillées et pesées régulièrement. Quarante-deux jours après la dernière injection, elles ont été euthanasiées comme décrit ci-dessus. Puis, les ovaires étaient récupérés pour procéder aux différentes analyses, notamment l'immunohistochimie (IHC), la coloration à l'hématoxyline-éosine (HE), le WB et la PCR.

2.4 Traitements avec les stéroïdes ovariens réalisés sur les cellules de la granulosa

Après 24 heures de culture des cellules de la granulosa comme décrit plus haut, le milieu de culture était renouvelé, et le traitement était appliqué pour 48 heures. Ce traitement était fait du $17\beta\text{-E}_2$ (2 mg/ml) versus le contrôle (où il n'y avait pas de traitement) dans le premier groupe expérimental. Dans le second groupe, le traitement était fait avec la $5\alpha\text{-DHT}$ (50 μM) versus le contrôle. Dans chaque groupe d'études, et pour chaque expérimentation, un minimum de 3 souris pour le sous-groupe traitement et de 3 également pour le sous-groupe contrôle ont été inclus. À l'issue du traitement, les cellules étaient collectées pour les différentes analyses réalisées.

2.5 Frottis vaginal pour détermination des phases du cycle œstral

La détermination des phases du cycle œstral a été réalisée grâce à des frottis vaginaux journaliers. En bref, après soulèvement de la queue des souris, un embout de pipette 20 μl était placé au début de l'ouverture vaginale, et avec du PBS 1X, un lavage était réalisé. Le liquide du lavage vaginal était ensuite déposé sur une lame, séché puis coloré avec le Bleu de Méthylène, et examiné sous microscope de marque Olympus IX70. Ces frottis ont été classifiés dans une de 4 phases du cycle œstral comme publié précédemment (118), et montré dans la figure supplémentaire 1 en annexe. On reconnaît le P lorsque le frottis contient des cellules épithéliales allongées et nucléées, l'E lorsqu'il y a prédominance des larges cellules épithéliales cornifiées; le M en cas de coexistence de cellules épithéliales nucléées, aplaties et des leucocytes, et le D en cas de frottis qui contenait essentiellement des leucocytes.

2.6 Histologie ovarienne, compte de follicules, de corps jaunes et calcul du volume ovarien

2.6.1 Compte de follicules ovariens et de corps jaunes

Les ovaires enrobés dans la paraffine ont été sectionnés longitudinalement à une épaisseur de 5 μm . Afin d'éviter de compter doublement des follicules, chaque cinquième section a été colorée avec l'HE. Pour chaque ovaire, un total de cinq sections a été pris en compte, et pour

chaque souris, la moyenne de deux ovaires était retenue. Pour chaque groupe de traitement ou de génotype, un nombre minimal de 3 souris est inclus dans les analyses statistiques. Les images ont été acquises avec le microscope de marque OPTIKA B-290TB. Le compte de follicules et de corps jaunes a été réalisé sous le grossissement 400 X. Les follicules de différents stades ainsi que les corps jaunes ont été comptés pour en déterminer le nombre. Un follicule était considéré comme primordial s'il contenait une seule assise de cellules aplaties, ou avait moins de 8 cellules cubiques qui entourent l'ovocyte; primaire lorsque cette seule couche qui entoure l'ovocyte contenait uniquement des cellules cubiques, ou en contenait plus de 8 cellules; secondaire lorsqu'il possédait plusieurs couches de cellules cubiques, et n'avait pas de cavité antrale évidente. Les follicules étaient considérés antraux débutants et antraux, lorsqu'il y avait respectivement un début de présence d'une cavité antrale ou une cavité antrale bien constituée. Seuls les follicules qui possédaient un ovocyte bien visible, et en bon état morphologique ont été pris en compte. Dans la présente étude, la RO était définie par la somme des follicules primordiaux et primaires.

2.6.2 Calcul du volume ovarien

Nous avons calculé le volume ovarien sur des sections d'ovaires enrobés dans la paraffine, de 5 µm d'épaisseur et après coloration à l'HE. Chaque cinquième section était ainsi colorée, et pour chaque ovaire, un total de cinq sections était pris en compte. Pour chaque souris, la moyenne de deux ovaires était retenue. Pour chaque génotype, un nombre minimal de 3 souris âgées de 100 jours est inclus dans les analyses statistiques. Les images ont été acquises comme décrit ci-dessus sous grossissement 40 X. Nous nous sommes appuyés sur les publications antérieures pour la détermination du volume ovarien (123, 124). Brièvement, nous avons d'abord calculé la surface de chaque section d'ovaire à l'aide du logiciel image J. En effet, en circonscrivant chacune de section et à l'aide d'une référence de valeur connue, la surface est ainsi calculée. Ensuite, le volume ovarien était déterminé selon la formule suivante :

Volume ovarien (millimètres cubes) = somme de sections (millimètres carrés) x 0,005 mm x 5. Dans cette formule, 0,005 représente l'épaisseur de chaque section et 5, le nombre de sections prises en compte par ovaire. Pour diminuer le nombre de décimales et assurer une commodité de présentation, nous avons ensuite multiplié les résultats obtenus par un facteur 10.

2.7 Immunohistochimie et immunocytochimie

L'IHC a été réalisée sur des sections de 5 µm des tissus ovariens enrobés dans la paraffine, et montées sur des lames chargées positivement. Les tissus ont été déparaffinés et réhydratés avec des bains successifs de NeoClear®, d'alcool et finalement d'eau distillée. Ensuite, le démasquage des sites antigéniques a été réalisé en incubant les lames dans une solution de citrate de sodium (100 mM sodium citrate, pH = 6,5 % Tween 20) à 95-98 °C, pendant 30 minutes. Les lames ont bénéficié d'un lavage avec de l'eau distillée, puis le blocage des peroxydases a été réalisé dans un bain avec le peroxyde d'hydrogène 3 % (H₂O₂) pendant 10 minutes. Les lames ont été lavées avec de l'eau distillée puis avec du TBST 1X (Tris Buffer solution tween) après le blocage des peroxydases. Le blocage des sites antigéniques non spécifiques a été réalisé en incubant les lames dans une solution de 5 % du sérum de chèvre dans du TBST 1X pendant 1 heure à la température de la pièce. Par la suite, les lames ont été incubées avec les différents anticorps primaires dans la solution de 5 % du sérum de chèvre dans du TBST 1X pendant toute la nuit à 4 °C. Les lames ont été lavées avec du TBST 1X, puis incubées avec du Signal Stain® Boost Detection (# 8125, cell signaling). Par la suite, les lames ont été, de nouveau, lavées avec du TBST 1X, puis incubées avec du Signal Stain® DAB (#11725, cell signaling) pour la révélation. Les lames ont par la suite été lavées avec de l'eau distillée puis contre-colorées avec l'hématoxyline, et couvertes par des lamelles à l'aide d'un milieu de montage (Immu-Mount, # 9 990 402 de Thermo scientific). L'acquisition des images a été réalisée comme décrit plus haut. Les anticorps primaires anti-Akt1 (# 75692; dilution : 1/150), Akt2 (# 17609-1-AP; dilution : 1/200), Akt3(# 21641-1-AP; dilution : 1/100), Akt total (# 4691; dilution : 1/150) utilisés provenaient respectivement de Cell Signaling pour Akt1, Akt total et de Proteintech (Rosemont, IL, USA) pour Akt2 et 3.

Pour l'immunocytochimie (ICC), les cellules de la granulosa ovarienne étaient cultivées dans des plaques de 12 puits sur des lamelles circulaires. À l'issue de 48 heures de traitement comme décrit ci-dessus, le milieu de culture a été retiré, et les cellules ont été lavées une fois avec du PBS froid. Les cellules étaient par la suite fixées avec du PFA 4 %, puis lavées avec du PBS, et perméabilisées avec du 0,1 % TritonX-100/PBS. Les peroxydases ont été bloquées avec du peroxyde d'hydrogène 3 % après un lavage avec du PBS. Pour diminuer le marquage non

spécifique, les cellules ont été incubées dans une solution de 5 % du sérum de chèvre dans du PBS. Ensuite, une incubation a été réalisée avec les différents anticorps (les mêmes que ceux utilisés en IHC) à 4 °C toute la nuit (anti-Akt1 : dilution de 1/150; anti-Akt2 : dilution de 1/150; anti-Akt3 : dilution de 1/100). Après lavage avec du PBS, les cellules ont été incubées à la température de la pièce pendant 30 minutes avec la même solution d'anticorps secondaire que celle utilisée en IHC. Comme dans le cas d'IHC, les cellules ont été lavées (ici, avec du PBS) puis incubées avec du Signal Stain® DAB, et la contre-coloration a été réalisée. Les lamelles ont été montées sur des lames, et nous avons procédé à l'acquisition des images comme décrit précédemment.

2.8 Immunofluorescence

L'immunofluorescence a été utilisée pour l'identification des cellules de la granulosa afin de valider notre modèle de culture cellulaire. C'est également après 48 heures de culture dans des plaques de 12 puits comme décrit ci-dessus, et sur des lamelles circulaires que les cellules de la granulosa ont été fixées. La fixation était faite le jour de l'analyse, avec du PFA 4 % pendant 10 minutes à la température de la pièce. Ensuite, les cellules étaient perméabilisées avec du 0,1 % Triton X-100 dans le PBS. Après l'incubation avec l'anticorps primaire (anti-FSH-R, # 22665-1-AP de Proteintech; dilution : 1/200) toute la nuit à 4 °C, les cellules sur les lamelles ont été lavées 3 fois avec du PBS. Puis, elles ont été incubées avec l'anticorps secondaire conjugué avec Alexa Fluor 555 (Thermo Fischer, dilution : 1/800) pendant 90 minutes à l'abri de la lumière, et à la température de la pièce. Ensuite, les lames ont été lavées avec du PBS. La contre-coloration des cellules a été réalisée avec du Hoechst 33342 (Invitrogen H3570) pendant 5 minutes à la température de la pièce et à l'abri de la lumière. Puis, nous avons réalisé le montage des lamelles sur lames en utilisant le même milieu de montage qu'en cas d'IHC. La visualisation et l'acquisition des images ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal de marque Leica TCS SP8 (Leica Microsystems).

2.9 Extraction de protéines et Western blot

Immédiatement après l'euthanasie, les ovaires ont été récupérés, débarrassés de maximum possible de la graisse qui les entoure, et lavés avec du PBS. Par la suite, ils ont été cisailés dans le PBS, puis lysés avec un tampon fait de RIPA (pH = 7,4, 150 nM NaCl, 0,1 % SDS, 0,5 % sodium deoxycholate, 1 % NP-40 dans le PBS). Le tampon de lyse contenait également un cocktail inhibiteur de protéases et de phosphatases (CompletedTM and PhosSTOP de Roche Applied Science). Pour terminer la lyse des cellules, les tissus ont subi une sonication de 10 secondes. Les tissus sont par la suite centrifugés (13000 x g pendant 20 min à 4 °C) pour en débarrasser des matériels insolubles. Les surnageants ont été récupérés. Le dosage de protéine y a été réalisé en utilisant le kit Bio-Rad DC protein assay et, le matériel a été conservé à -20 °C jusqu'à l'analyse. Pour la réalisation des WB, des quantités égales de protéines (20 µg) de chaque traitement ou phase du cycle œstral ont été séparées sur un gel SDS-PAGE. Les protéines ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose à l'aide d'un système de transfert semi-liquide (Bio-Rad, Hercules, CA). Les membranes ont par la suite été bloquées avec une solution de 5 % lait écrémé dans du PBS contenant 0,05 % Tween-20 pendant une heure à la température de la pièce. Les membranes ont par la suite été incubées avec des anticorps primaires respectifs à 4 °C pendant toute la nuit. Après cette incubation, les membranes ont bénéficié de 3 lavages avec du PBS-0,05 % Tween-20. Les membranes ont été ensuite incubées pendant 45 minutes à la température ambiante avec l'anticorps secondaire lié au HRP (Horseradish peroxydase) dans la même solution de blocage. Les membranes étaient ensuite lavées 3 fois avec du PBS-0,05 % Tween-20, et une fois avec du PBS. La révélation a été faite par la détection de l'activité peroxydase grâce à un kit spécifique SuperSignal West FemtoTM substrate (Thermo Scientific, Rockfort, IL) en suivant les instructions du fabricant. La visualisation du signal a été faite à l'aide du Bioluminescence Imaging System (UVP, CA, USA). La bêta-actine a été utilisée comme contrôle de charge. Les anticorps primaires suivants étaient utilisés : anti-Akt1 (# 75692, dilution : 1/1000), Akt3 (# 14982, dilution : 1/1000), Akt total (# 4691, dilution : 1/1000), pAkt1 (S 473, # 9018, dilution : 1/1000), pAkt2 (S 474, # 8599, dilution : 1/1000), Foxo3a (# 12829, dilution : 1/1000), pFoxo3a (# 9466, dilution : 1/1000), GSK3β (# 12456, dilution : 1/1000), pGSK3β (# 5558, dilution : 1/1000), mTOR (# 2983, dilution : 1/1000), pmTOR (# 5536, dilution : 1/1000), pBad (# 9292, dilution : 1/1000), pBad (# 4366, dilution : 1/1000) et caspase-3 clivée (# 9661, dilution : 1/1000) qui étaient achetés chez Cell Signaling

(Danvers, MA). Tandis que celui dirigé contre Akt2 (# Ab-131 162, dilution : 1/1000) provenait de Abcam (Cambridge, UK). L'anticorps secondaire anti-rabbit conjugué au Horseradish peroxydase (# 7074, dilution : 1/40 000) était fourni par Cell Signaling (Danvers, MA), et l'anticorps anti-bêta-actine conjugué avec la peroxydase (A-3854) provenait de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

En ce qui concerne les cultures cellulaires, à l'issue du traitement, les cellules ont été collectées, et lysées en utilisant le même tampon de lyse que ci-haut. Ensuite, 3 cycles de congélation-décongélation ont été réalisés pour mieux briser les cellules. La solution a été centrifugée (13 000 X g, 20 minutes, à 4 °C) et le surnageant, collecté. La suite de la procédure a été réalisée comme décrit pour les ovaires entiers. Toutes les expérimentations ont été répétées au moins trois fois.

2.10 Extraction de l'ARN et RT-qPCR

Pour la mesure de la transcription, les ovaires récoltés étaient conservés directement dans le RNA later (# R0901, Sigma Aldrich) à - 80 °C jusqu'à l'extraction de l'ARN. L'extraction de l'ARN a été faite à l'aide du Ribozol™ RNA (N580, VWR Life Science). L'ARN total a été isolé en utilisant le Kit Direct Zol™ RNA mini prep de Zymo research (R-2050, USA) en suivant les instructions du fabricant. Un total de 400 ng d'ARN dans un mélange de 20 µl de réaction a été utilisé pour synthétiser l'ADNc en utilisant le kit qScript cDNA Supermix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD). Nous nous sommes conformés également aux instructions du manuel du fabricant. Les conditions de la réaction réalisée à l'aide du thermocycleur C1000 Touch (Bio-Rad, Canada) étaient : 25 °C pendant 5 minutes, 42 °C pendant 30 minutes, 85 °C pendant 5 minutes, et enfin la température était maintenue à 4 °C.

L'ADNc était ensuite amplifié en utilisant les amorces spécifiques pour chaque gène cible. L'expression de l'ARNm de chaque isoforme d'Akt (Akt1, Akt2, Akt3) pour notre étude a été mesurée. Les amorces suivantes ont été utilisées : 5'-TCGTGTGGCAGGATGTGTAT-3' (forward) et 5'-ACCTGGTGTCAGTCTCAGAGG-3'(reverse) pour Akt1, 5'-ATACCAGGCACCCCTTCCT-3'(forward) et 5'-CACAAAGCATAGGCGGTCA-

3'(reverse) pour Akt2, 5'-GTGGACCACTGTTATAGAGAGAACAT-3'(forward) et 5'-TTGGATAGCTTCCGTCCACT-3'(reverse) pour Akt3, 5'-CTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3'(forward) et 5'-ACCAGAGGCATACAGGGACA-3'(reverse) pour β -Actine. Nous avons utilisé la β -Actine comme contrôle interne pour normaliser l'expression de nos gènes d'intérêt. Chaque mélange (avec un volume final de 25 μ l) de réaction pour la qPCR a été réalisé en utilisant le kit Perfecta SYBRGreen Supermix Low Rox (Quanta Biosciences, Beverly, MA, USA) selon les instructions du fabricant. La quantification a été réalisée à l'aide de l'appareil Mx3000P system (Agilent Technologies, Mississauga, Ontario, Canada). Une courbe standard a été générée pour chaque gène d'intérêt afin de déterminer le rendement de la réaction. Nous avons utilisé la méthode de Pfaffl pour mesurer l'expression relative de chaque gène. Chaque RT-qPCR a été réalisée en Duplicata, et dans au moins trois expériences indépendantes pour chaque gène.

2.11 Analyses statistiques

Toutes les expérimentations qualitatives ont été répétées au moins 3 fois de manière indépendante. Dans chaque groupe expérimental, concernant les données quantitatives, plus de 3 souris étaient incluses. Les données quantitatives sont exprimées comme moyenne \pm écart type, à moins que cela ne soit autrement indiqué. La comparaison entre les groupes a été réalisée en utilisant le test t de Student ou Anova selon le cas, et la valeur de P inférieure à 0,05 était considérée comme statistiquement significative. *, P < 0,05; **, P < 0,01; ***, P < 0,001. Tous les tests statistiques ont été réalisés en utilisant le logiciel GraphPad PRISM, version 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

2.12 Considérations éthiques

Les différentes études réalisées dans la présente thèse ont reçu l'approbation du comité éthique et de bons soins aux animaux de l'UQTR avant le démarrage des expérimentations. L'euthanasie des souris a été réalisée par dislocation cervicale après anesthésie à l'isoflurane suivant les recommandations en vigueur du comité de bons soins aux animaux.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Expression des isoformes d'Akt dans les différents compartiments et structures ovariens

Comme décrit précédemment, l'ovaire est un organe complexe qui possède différents structures et compartiments. Dans la présente thèse, nous avons voulu dans un premier temps analyser l'expression des isoformes d'Akt dans ces différents compartiments. Pour y parvenir, nous avons réalisé des IHC avec des anticorps spécifiques pour les différentes isoformes d'Akt sur des ovaires des souris de type sauvage âgées de 100 jours, et donc sexuellement mûres. Les isoformes d'Akt ont montré des niveaux d'expressions différents dans les compartiments ovariens. En effet, au niveau du stroma, nous avons détecté la présence d'Akt1 et Akt2, tandis qu'Akt3 apparaissait nul. En revanche, les trois isoformes d'Akt sont exprimées dans les follicules ovariens de toutes les catégories (des primordiaux aux antraux) (Figure 3.1A, i, ii et iii). Au sein du follicule, l'expression des isoformes d'Akt variait suivant le type cellulaire. Akt1 et 2 montraient une expression moindre et éparse au niveau de la thèque, alors qu'Akt3 y était quasi nul. Dans les cellules de la granulosa et dans l'ovocyte, Akt1 et Akt2 étaient détectés tout au long du cycle œstral (Figure 3.1B, Figure 3.2A et B). Cependant, Akt3 était présent dans les cellules de la granulosa de follicules de toutes les catégories sauf en D où il est absent dans les petits follicules (primordiaux, primaires et secondaires) (Figure 3.2C). Les trois isoformes d'Akt sont aussi exprimées dans les corps jaunes bien qu'Akt3 est très faible. Enfin, ces résultats montrent qu'Akt3 est l'isoforme la moins exprimée dans l'ovaire. Les contrôles négatifs (Ig G) des anticorps sont représentés dans la figure supplémentaire 2 en annexe.

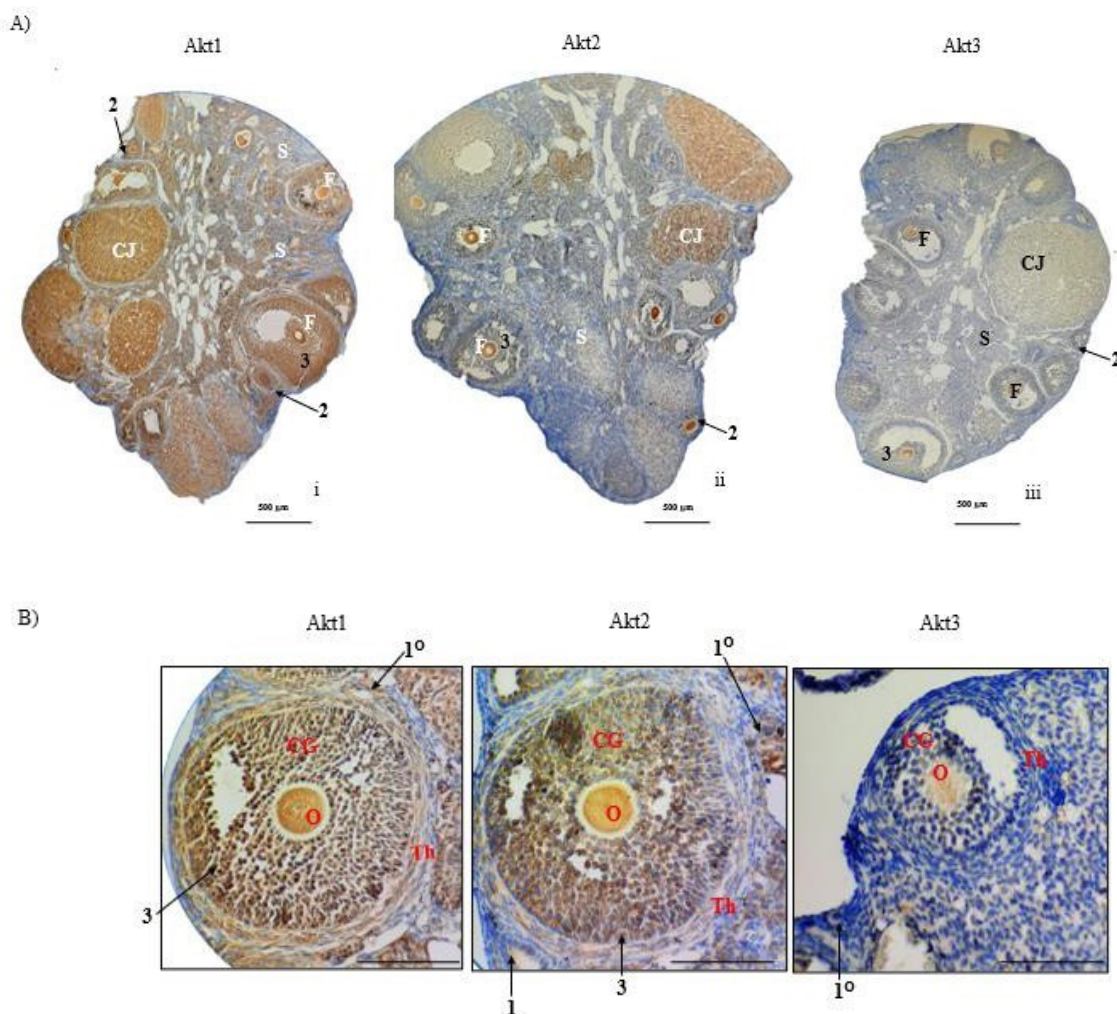


Figure 3.1 Les isoformes d'Akt s'expriment différemment dans les structures et compartiments ovariens.

Les IHC ont été réalisées sur les coupes des ovaires des souris C 57 BL/6J de type sauvage âgées de 100 jours (n = 3).

A) Expression dans l'ovaire entier : les 3 isoformes d'Akt sont exprimées dans les follicules de tous les stades et dans les corps jaunes. L'expression d'Akt1 et 2 est faible et éparse dans le stroma, tandis que celle d'Akt3 y est quasi nulle (i, ii et iii).

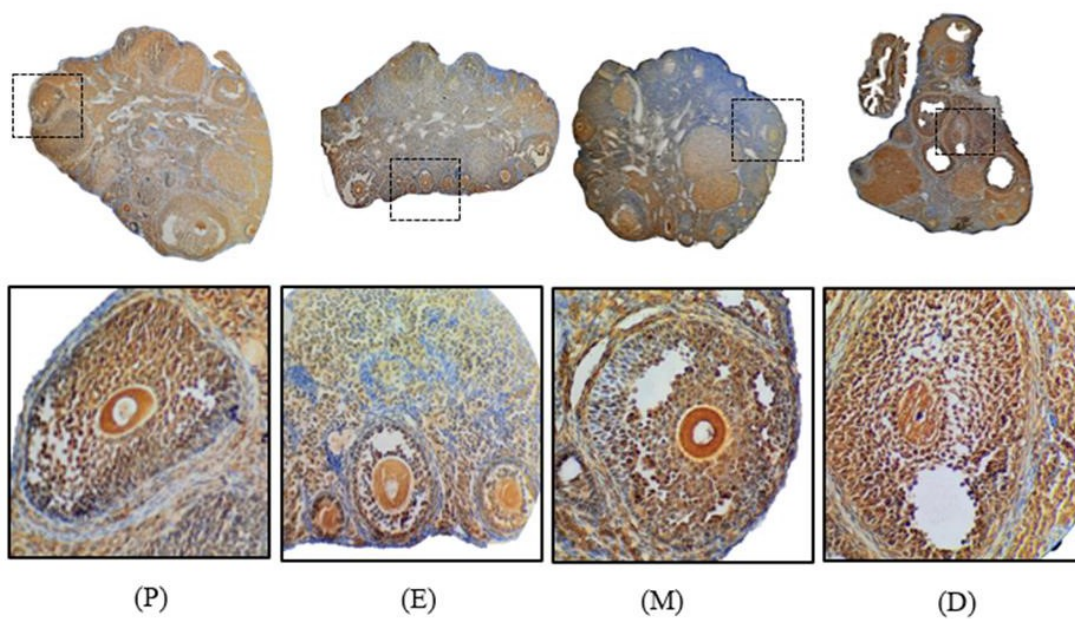
B) Expression au sein du follicule : les trois isoformes sont présentes dans les cellules de la granulosa et l'ovocyte. Akt3 apparait être faiblement exprimé comparativement aux deux autres isoformes. Akt1 et 2 sont présents au niveau de la thèque alors qu'Akt3 y est absent. Les ovaires représentatifs sont en D pour la figure 3.1A; et en P pour la figure 3.1B. F : follicule, CJ : corps jaune, S : stroma, CG : cellules de la granulosa, O : ovocyte et Th : thèque. 1° : follicule primordial, 1 : follicule primaire, 2 : follicule secondaire et 3 : follicule antral. Barre = 250 μm.

3.2 Localisation subcellulaire, intensité et activation des isoformes d'Akt au cours du cycle œstral

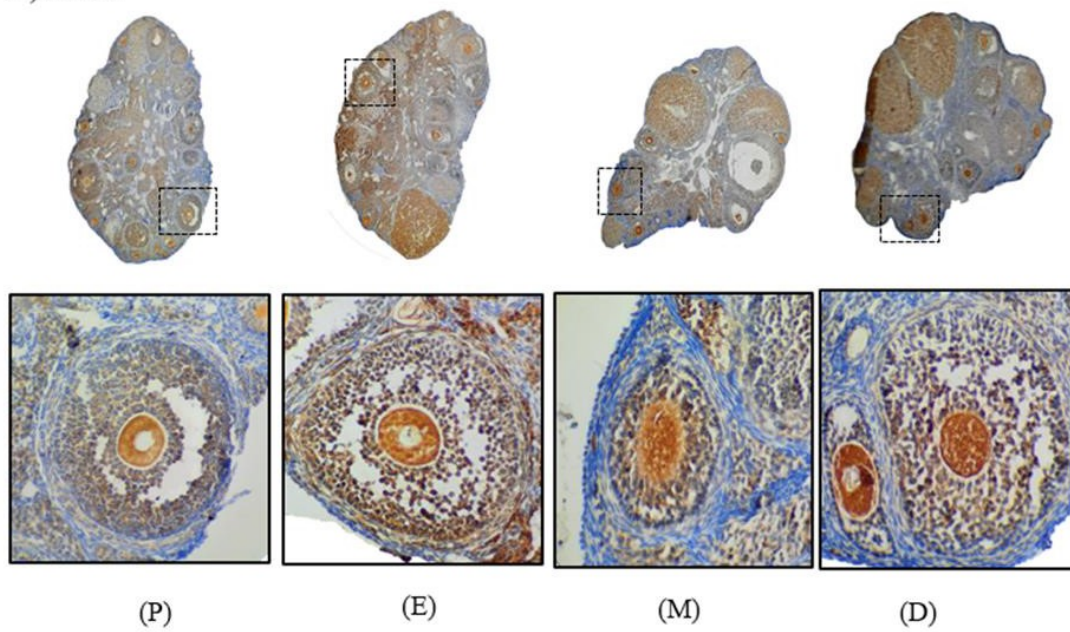
Il est généralement admis que les isoformes d'Akt occupent différentes localisations subcellulaires selon les types et status cellulaires (125). Afin de mieux comprendre le rôle d'Akt et de ses différentes isoformes, il est donc judicieux d'analyser leurs localisations subcellulaires dans les différentes phases du cycle œstral. Pour ce faire, nous avons réalisé des IHC dans les différentes phases du cycle œstral sur des ovaires des souris de type sauvage âgées de 100 jours. Par exemple, l'analyse des follicules antraux débutants et antraux a montré que la localisation et l'intensité des isoformes d'Akt variaient de manière isoforme spécifique au sein des cellules de la granulosa tout au long du cycle œstral. En ce qui concerne Akt1, nos résultats montrent qu'il est localisé dans le noyau (flèche rouge) et le cytoplasme (cercle rouge) tout le long du cycle œstral (Figure 3.2D, i et Figure 3.2A). Pour Akt2, nos résultats montrent une localisation cytoplasmique basale (cercle noir) et quelque peu membranaire (flèche noire) en P, cytoplasmique et périnucléaire (carré rouge) dans les autres phases du cycle œstral (Figure 3.2B et Figure 3.2D, ii, iii). Concernant Akt3, nos résultats montrent une localisation cytoplasmique en E et P bien qu'une localisation nucléaire ait été observée dans quelques cellules spécialement dans les follicules antraux. En M, Akt3 avait une localisation cytoplasmique (Figure 3.2C et Figure 3.2D, iv, v). Dans l'ovocyte, la localisation était essentiellement cytoplasmique pour toutes les isoformes d'Akt au travers du cycle œstral. Dans les cellules de la thèque de ces follicules, Akt1 avait le même patron d'expression que dans les cellules de la granulosa, et ce, tout au long du cycle œstral (Figure 3.2D, i). Dans le cas d'Akt2, il y avait le même patron d'expression que les cellules de la granulosa dans trois phases du cycle œstral excepté en P où son expression était très faible (Figure 3.2D, ii, iii). Concernant le niveau d'intensité d'expression, essentiellement dans les cellules de la granulosa de follicules antraux débutants et antraux, les résultats ne montrent pas de grandes variations des isoformes d'Akt. Cependant, Akt1 avait une expression un peu plus forte en P alors qu'elle diminuait en E, M; et amorçait sa remontée en D (Figure 3.2A). Akt2 avait une expression un peu plus élevée en E, et qui diminuait dans les autres phases du cycle, surtout en P où elle gardait une expression cytoplasmique basale, et un peu membranaire (Figure 3.2B). L'expression d'Akt3 était légèrement plus forte en P et E. Par la suite, le marquage diminuait en M et s'annulait en D dans les petits follicules (primordial, primaire et secondaire) (Figure 3.2D, vi et Figure 3.2C).

Afin de déterminer si des changements dans l'activité des protéines Akt s'opéraient au cours du cycle œstral, nous avons réalisé une analyse biochimique sur les ovaires entiers. En effet, nous avons étudié l'expression protéique d'Akt1, 2 et 3; et nous avons déterminé leur activité (phosphorylation) tout au long du cycle. Ainsi, nous avons réalisé des WB sur les protéines totales extraites des ovaires des souris de type sauvage âgées de 100 jours durant les différentes phases du cycle œstral. Une analyse densitométrique a été réalisée pour quantifier l'expression et la phosphorylation de chaque isoforme d'Akt en utilisant le logiciel image J. Nous avons utilisé la bêta-actine comme contrôle de charge. La différence d'expression était statistiquement significative seulement pour Akt2 et Akt3 ($p = 0,0012$ et $0,0021$ respectivement) (Figure 3.2.E.1). En effet, nos résultats ont montré qu'Akt2 avait une forte expression en P et E. Puis, il diminuait de manière significative en M, et amorçait son augmentation en D. Akt1 et 3 avaient un niveau d'expression plus élevé en E. Akt3 diminuait de manière significative en M et D, puis il remontait également de manière significative en P. Akt1 montrait une tendance à diminuer en M, D; il amorçait l'augmentation en P. La différence observée n'était pas significative. La phosphorylation des isoformes d'Akt est directement liée à leur niveau d'activation, soit à leur activité de protéines kinases. Ainsi, la protéine phosphorylée de chacune d'elles reflète, de ce fait, le niveau de leur activité kinase respective. Dans la présente étude, en utilisant les anticorps spécifiques actuellement disponibles dirigés contre les formes phosphorylées d'Akt (Akt1 et 2), nous avons analysé leur niveau de phosphorylation durant le cycle œstral. Nos résultats ont montré qu'Akt1 était activé en P, avait atteint le pic en E et ensuite décroissait en M et D. Cependant, pAkt2 montrait son niveau le plus élevé en E et D tandis que ce niveau était bas dans les autres phases du cycle œstral. Bien que ces différences n'étaient pas statistiquement significatives, ces résultats suggèrent qu'il existe une modulation dans l'activité d'Akt1 et Akt2 au cours du cycle œstral (Figure 3.2.E.2). Le fait que les différences observées ne soient pas significatives pourrait s'expliquer par le fait que nous avons utilisé l'ovaire entier qui contient d'autres compartiments tissulaires en dehors des follicules. Par ailleurs, en analysant les patrons d'expression protéique des isoformes d'Akt en comparaison à ceux de leur phosphorylation, nous avons observé qu'Akt1 montrait le même patron dans toutes les phases du cycle œstral entre son expression et son activation. Tandis que pour Akt2, il y avait concordance seulement dans trois phases (E, M et D).

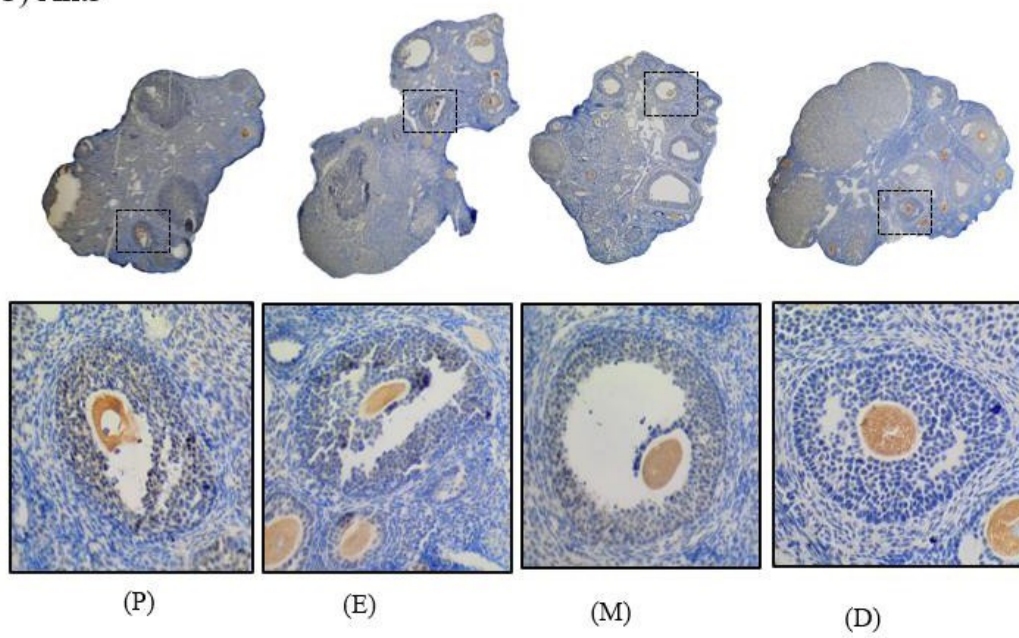
A) Akt1



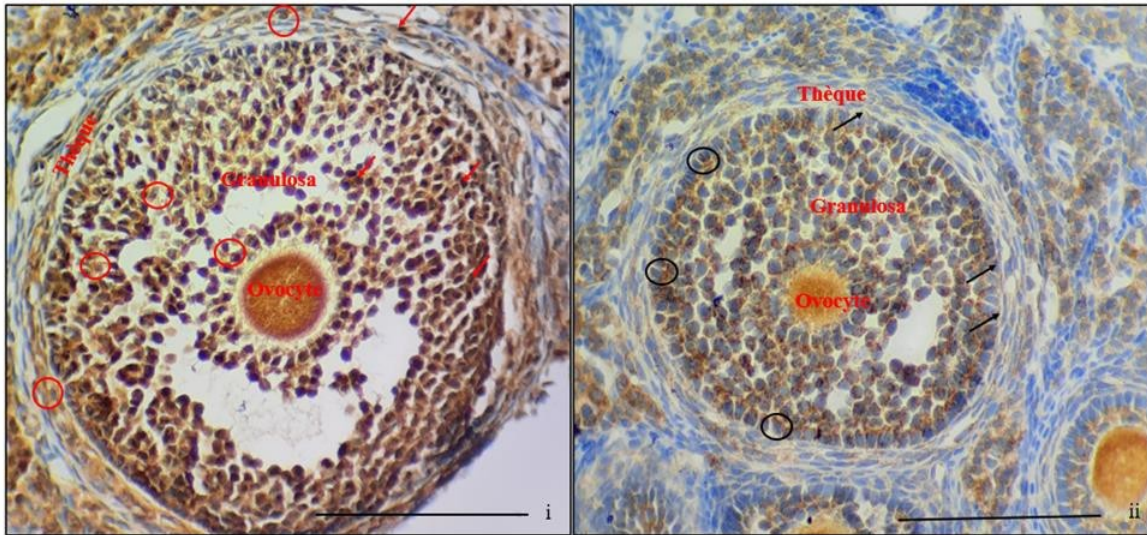
B) Akt2



C) Akt3

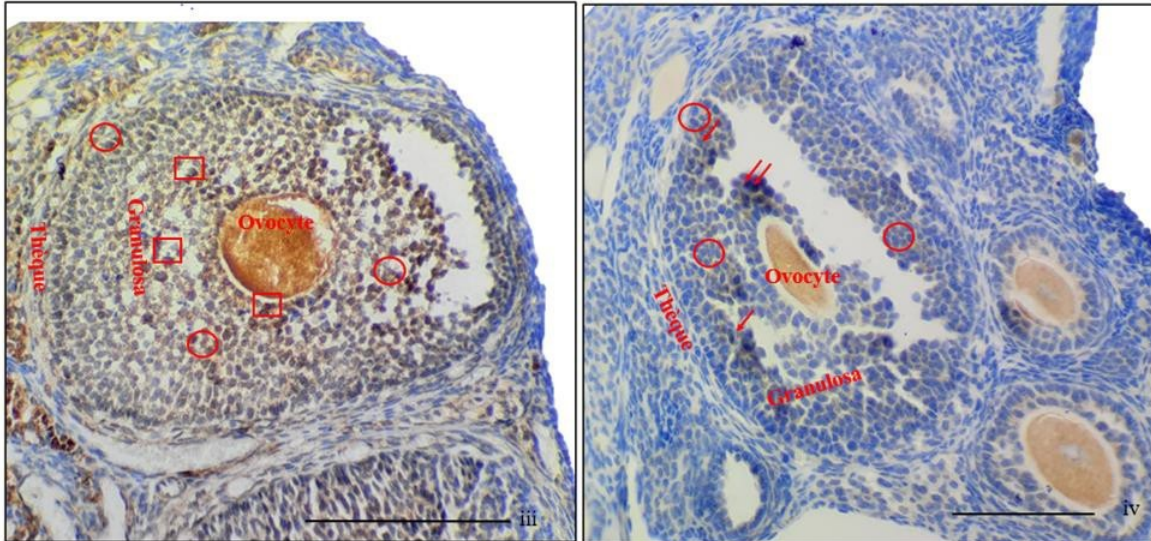


D) Localisation subcellulaire des isoformes d'Akt



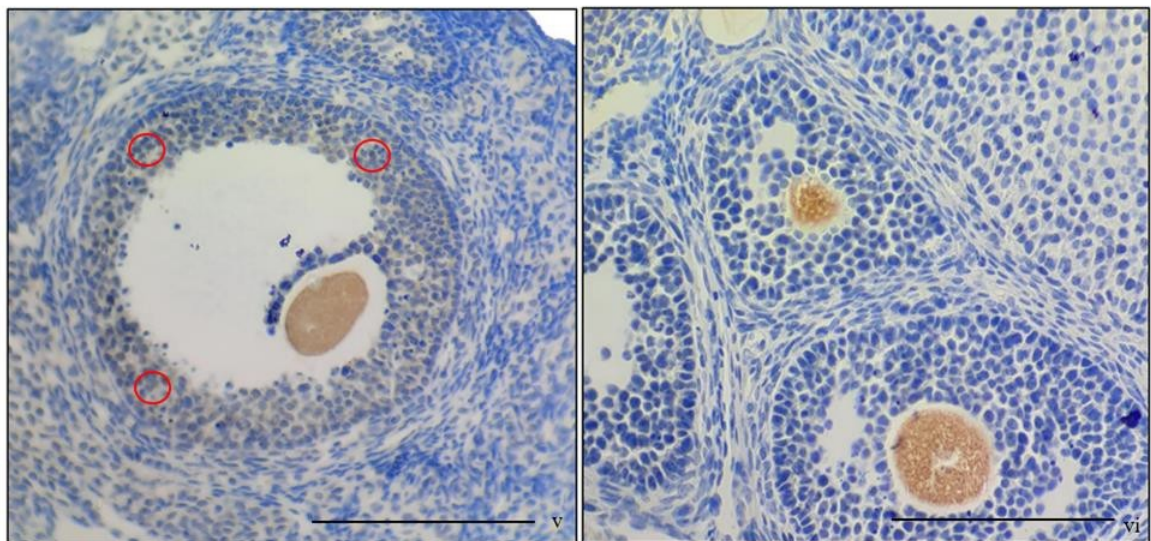
Akt1 tout au long du cycle œstral

Akt2 en P



Akt2 en E, M et D

Akt3 en E, P



Akt3 en M

Akt3 en D

E) Expression protéique et activation des isoformes d'Akt

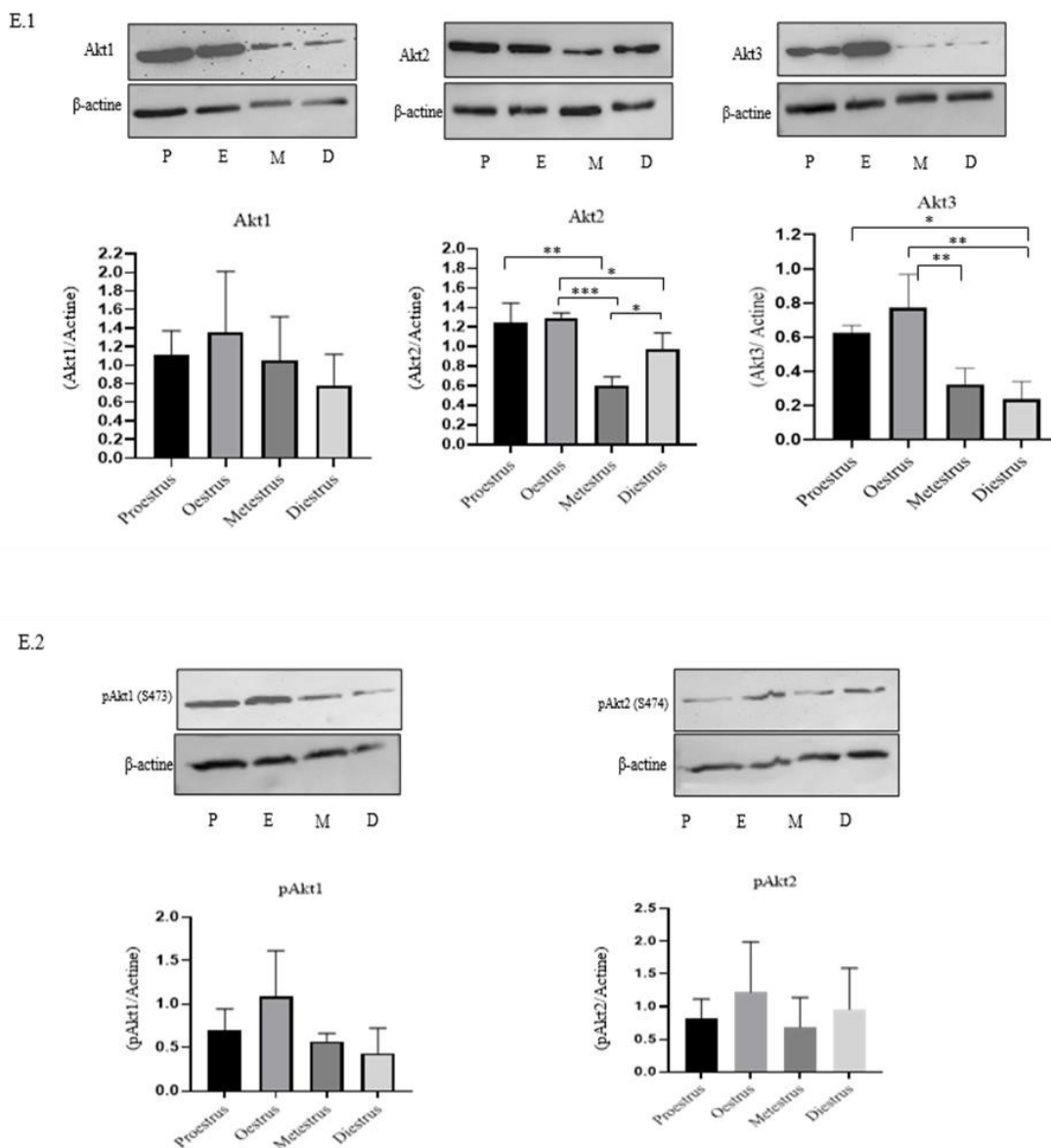


Figure 3.2 Localisation subcellulaire, intensité et activation des isoformes d'Akt au travers du cycle œstral chez les souris C 57 BL/6J de type sauvage âgées de 100 jours.

L'expression des isoformes d'Akt a été analysée par IHC ($n = 3$ pour chaque phase du cycle). La localisation et l'intensité d'expression varient de manière isoforme-spécifique au sein des cellules de la granulosa. A) Akt1 montre une localisation nucléaire et cytoplasmique tout le long du cycle. Son intensité est forte en P et D, diminue en E et M. B) AKT2 montre une localisation essentiellement basale cytoplasmique et membranaire en P, pendant que dans les autres phases du cycle sa localisation est cytoplasmique, périnucléaire et quelque peu nucléaire. Son intensité en E est faible. C) Akt3 exprime une localisation cytoplasmique en P, E et M, et en plus quelques cellules montrent une localisation nucléaire

en E et P. Son intensité est forte en E, et nulle en D. D) Fort grossissement montrant la localisation subcellulaire des isoformes d'Akt. Cercle rouge : localisation cytoplasmique; flèche rouge : localisation nucléaire; carré rouge : localisation périnucléaire; flèche noire : localisation membranaire; cercle noir : localisation basale cytoplasmique. Barre = 250 μm . E) Les protéines de l'ovaire entier étaient extraites, et les WB réalisés en utilisant les anticorps : (E.1) anti-isoformes d'Akt, (E.2) anti-phospho-Akt1 (S 473) et anti-phospho-Akt2 (S 474). La bêta-actine est utilisée comme contrôle de charge. Les densitométries de protéines sont représentées comme moyenne \pm écart type. Pour la comparaison dans les différentes phases, le test d'ANOVA One-way suivi du test de Tukey's (quand cela était nécessaire) était utilisé. L'astérisque représente la significativité de la différence entre deux groupes (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

3.3 Validation du *Knock out* d'Akt3 dans notre modèle

Bien que les souris Akt3^{-/-} existent depuis plusieurs années, le rôle d'Akt3 dans l'ovaire n'a pas été clairement et profondément étudié. L'utilisation de ces souris Akt3^{-/-} nous a permis d'analyser directement le rôle d'Akt3 dans l'ovaire en étudiant l'impact de son élimination sur la RO, la dynamique folliculaire et l'ovulation. Différentes études ont démontré que les souris déficientes en Akt3 sont viables et peuvent se reproduire. Ces études ont montré que ces souris présentaient essentiellement une réduction de la taille du cerveau (76, 126). Avant de réaliser notre étude, nous avons d'abord validé l'élimination d'Akt3 chez les souris que nous avons utilisées en étudiant l'expression de la protéine dans leurs ovaires. Comme le montrent les résultats des WB (Figure 3.3), la détection d'Akt3 était nulle chez les souris déficientes. Cette confirmation a permis la validation de notre modèle.

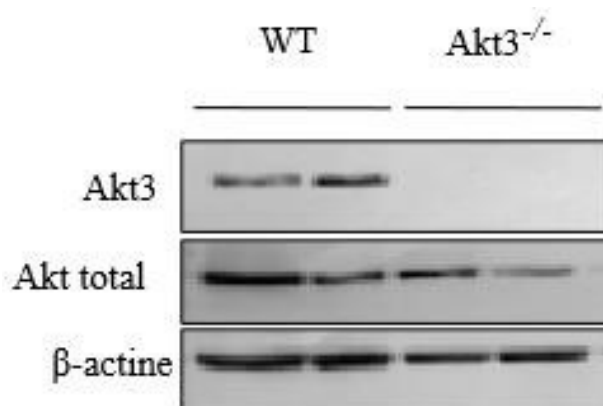
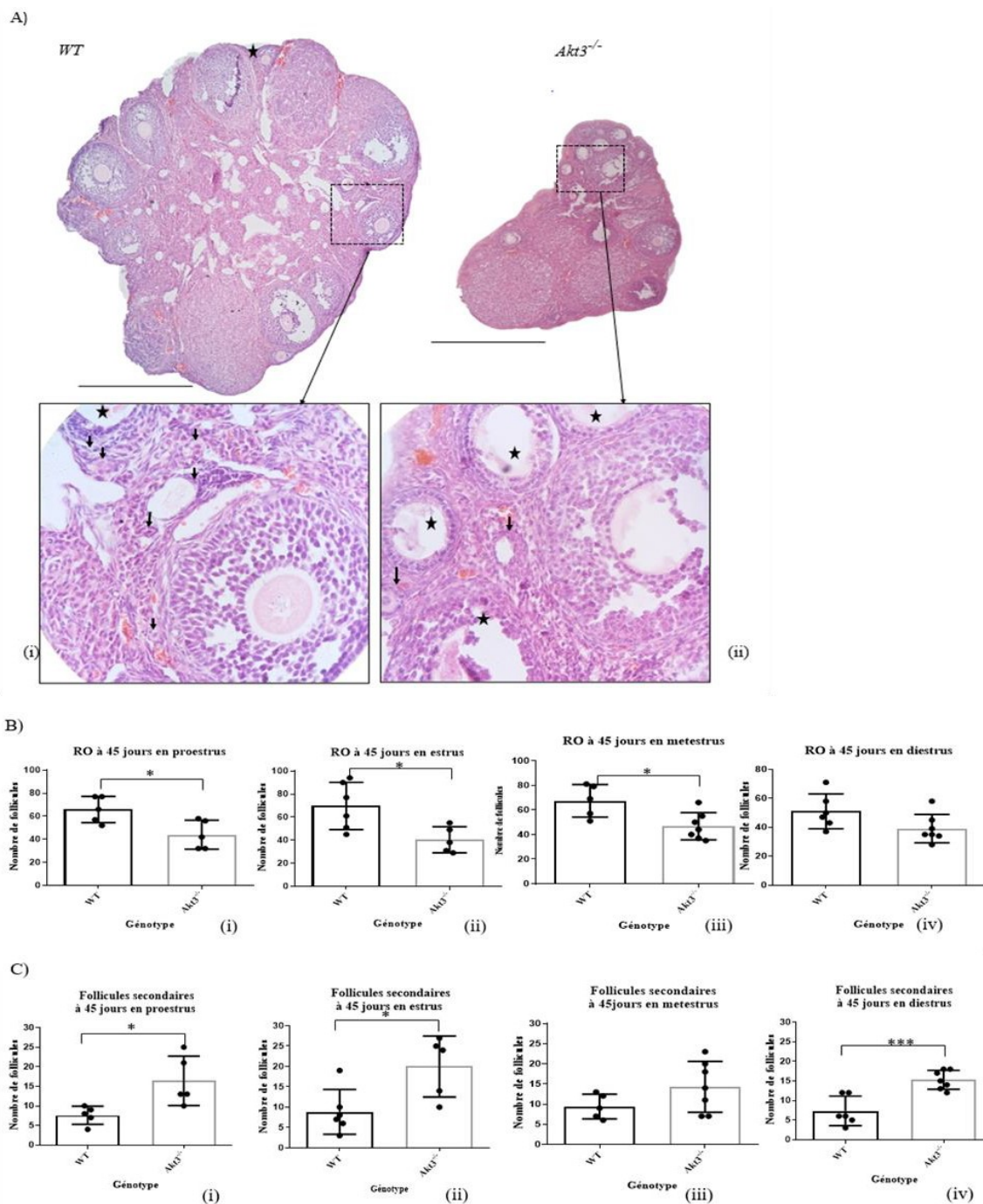


Figure 3.3 Validation de l'élimination d'Akt3.

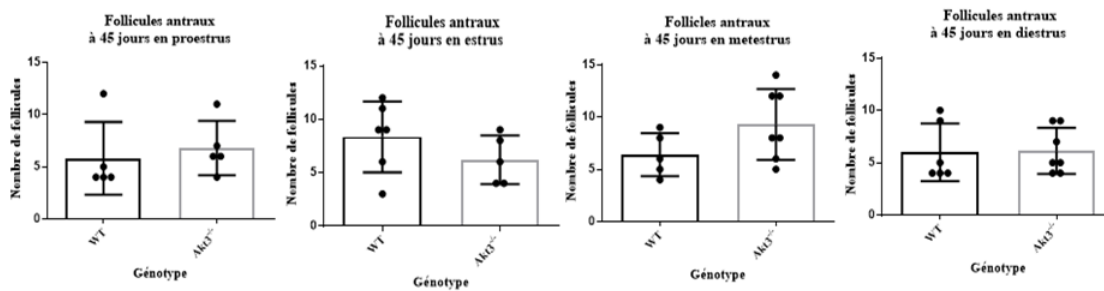
WB de protéines totales des ovaires de souris de type sauvage (ou WT) et déficientes en Akt3 pour la détection d'Akt3. Les résultats confirment que les souris Akt3^{-/-} n'expriment pas Akt3. Akt total a été utilisé pour la confirmation de l'expression des autres isoformes d'Akt. La β -actine a été utilisée comme contrôle de charge.

3.4 La déficience en Akt3 impacte la réserve ovarienne et la dynamique folliculaire

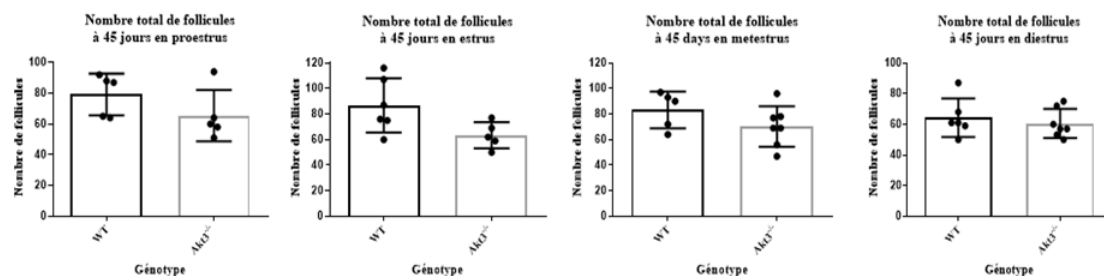
Comme mentionné ci-dessus, le rôle d'Akt3 dans l'ovaire n'a pas encore été clairement et profondément étudié. Certains chercheurs ont montré précédemment que la délétion d'Akt1 résultait en une diminution du nombre de follicules primordiaux (118). Nous avons profité de l'avantage d'avoir en main des souris déficientes en Akt3, pour analyser l'effet de l'absence d'Akt3 sur l'ovaire au cours du cycle œstral. Nous avons utilisé des souris qui étaient en début de la maturité sexuelle (âgées de 45 jours), et des souris âgées de 100 jours. Nous avons réalisé des comptes de follicules selon leurs catégories respectives après coloration à l'HE. Comme le montre la figure 3.4 chez les souris âgées de 45 jours, la déficience en Akt3 était significativement accompagnée d'une diminution des follicules de la RO (en P, E et M avec respectivement $p = 0,02$; $0,0193$ et $0,0145$) (Figure 3.4A et Figure 3.4B, i, ii, iii). Nous avons observé une tendance en ce sens dans l'autre phase du cycle (D), bien que le seuil de significativité n'ait pas été atteint (Figure 3.4B, iv). Contrairement à la RO, cette déficience en Akt3 résultait en une augmentation significative du nombre de follicules secondaires en P, E et D ($p = 0,019$; $0,0191$ et $0,0008$ respectivement) (Figure 3.4A et Figure 3.4C, i, ii, iv). Bien que non significatif, une tendance à l'augmentation de follicules secondaires était également observée en M ($p = 0,14$) (Figure 3.4C, iii). Pour les follicules antraux et le nombre total de follicules (soit la somme totale qui inclut toutes les catégories de follicules), aucune différence n'était statistiquement significative (Figure 3.4D et E). Chez les souris âgées de 100 jours, les différences n'étaient pas significatives pour les différentes catégories de follicules. Cependant, les mêmes tendances étaient observées en ce qui concerne la RO et les follicules secondaires comme à 45 jours (Figure 3.4F, G, H et I). Pris ensemble, nos résultats sur la RO et la dynamique folliculaire suggèrent un effet bien spécifique d'Akt3 lié à l'âge. Puisque nos résultats montrent que l'absence d'Akt3 entraîne un épuisement de la RO, Akt3 jouerait donc un rôle dans le maintien de la RO. Celui-ci passerait par le contrôle de la sortie des follicules du pool de la RO vers un stade supérieur chez les souris âgées de 45 jours.



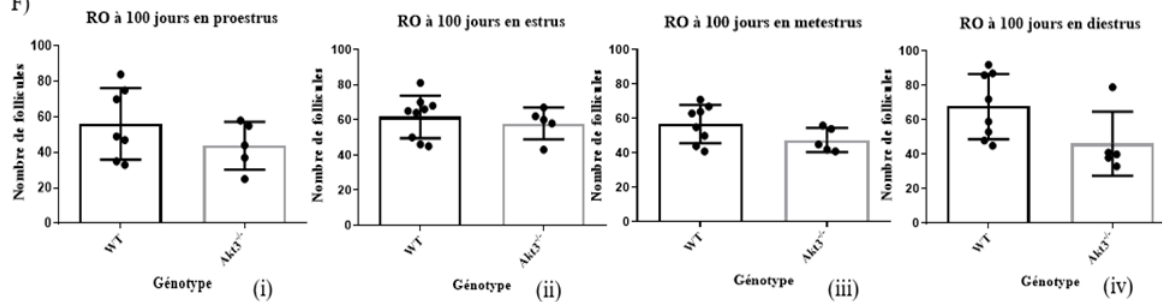
D)



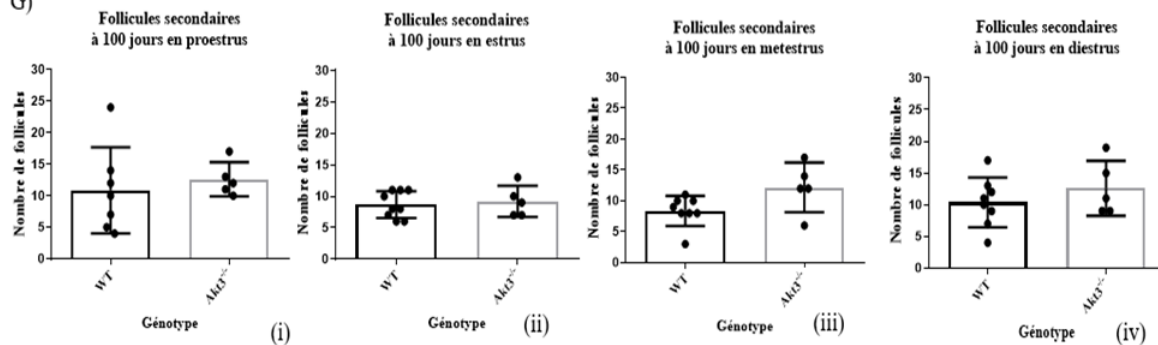
E)



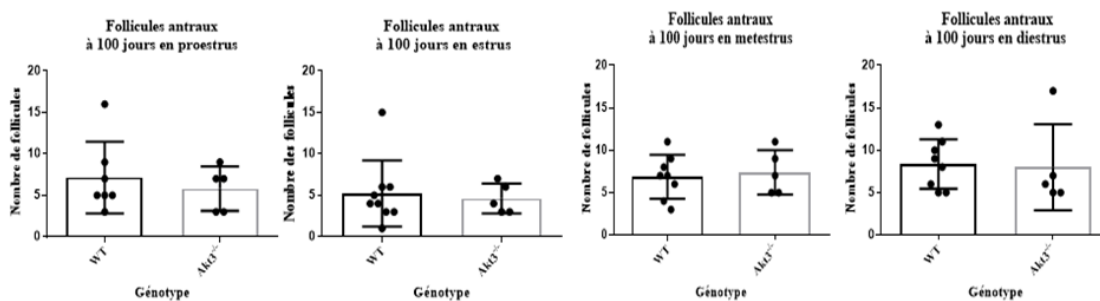
F)



G)



H)



I)

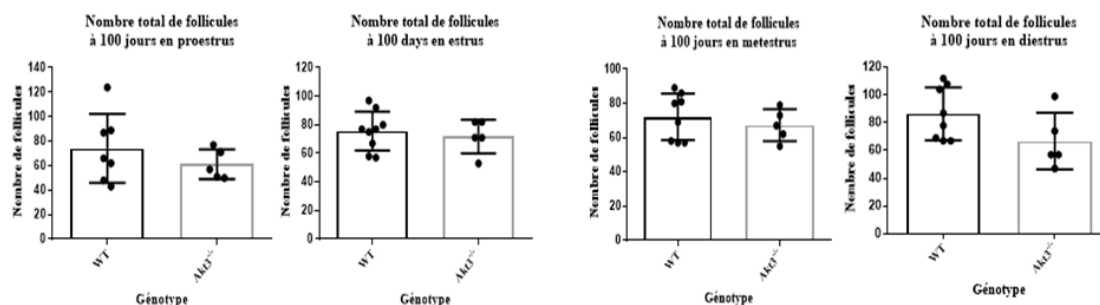


Figure 3.4 La déficience en Akt3 impacte la réserve ovarienne et la dynamique folliculaire.

Les ovaires des souris WT et Akt3^{-/-} enrobés dans la paraffine ont été sectionnés en des coupes de 5 μm , et chaque 5^e section a été colorée avec l'HE pour la visualisation des follicules. Pour chaque ovaire, un total de 5 sections a été utilisé pour faire le compte des follicules. Pour chaque souris, la moyenne des deux ovaires était retenue. Dans chaque phase du cycle et dans chaque groupe (n = 5-9) chez les souris âgées de 45 jours et 100 jours, les follicules de la RO (primordiaux et primaires), les follicules secondaires, les follicules antraux et le nombre total de follicules ont été analysés.

(A) Ovaires représentatifs qui montrent les follicules de la RO (flèche noire) et les follicules secondaires (étoile noire) chez les souris âgées de 45 jours. (B) Décompte de follicules de la RO à 45 jours; (C) décompte des follicules secondaires à 45 jours; (D) décompte des follicules antraux à 45 jours; (E) nombre total des follicules à 45 jours; (F) décompte de follicules de la RO à 100 jours; (G) décompte des follicules secondaires à 100 jours; (H) décompte des follicules antraux à 100 jours; (I) nombre total des follicules à 100 jours. Les données représentent les moyennes \pm écart types. Pour la comparaison entre les deux génotypes, le test t de Student était utilisé. Barre = 500 μm . L'astérisque représente la différence significative entre les deux groupes (*, P < 0,05; ***, P < 0,001).

3.5 L'élimination d'Akt3 est accompagnée de la diminution des corps jaunes et du volume ovarien

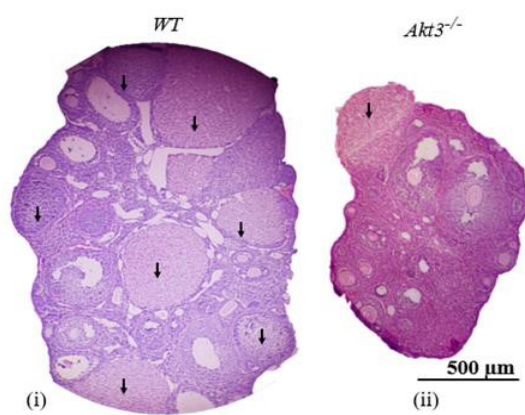
a) La diminution des corps jaunes

En vue de déterminer l'effet de l'élimination d'Akt3 sur l'ovulation et la formation du corps jaune, nous avons également réalisé la coloration à l'HE sur des coupes d'ovaires de souris âgées de 100 jours. Puis, nous avons compté le nombre des corps jaunes. Par la suite, nous avons comparé leur nombre avec le nombre de corps jaunes observés chez les souris de type sauvage. La figure 3.5 montre que le nombre des corps jaunes était significativement diminué chez les souris Akt3^{-/-} par rapport aux souris de type sauvage en M et D ($p = 0,01$ pour les deux phases) (Figure 3.5A et B). Dans les deux autres phases du cycle, la différence n'était pas significative (Figure 3.5C). Ce résultat suggère un possible rôle pour Akt3 dans l'ovulation et la formation du corps jaune. En effet, Akt3 promouvrait l'ovulation et la formation de corps jaunes. Dans le même ordre d'idée, nous avons aussi constaté la même tendance bien que non significative dans le nombre des souriceaux dans les portées. En effet, les souris Akt3^{-/-} avaient un nombre moyen faible de souriceaux comparativement aux souris de type sauvage (Figure 3.5D).

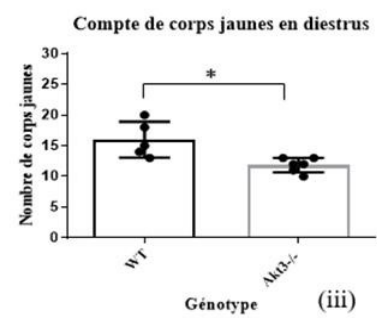
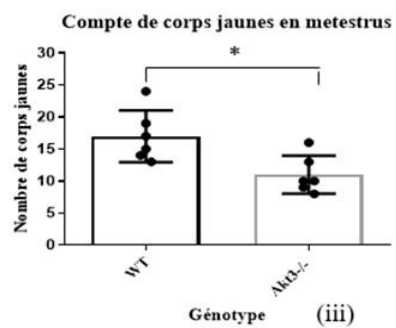
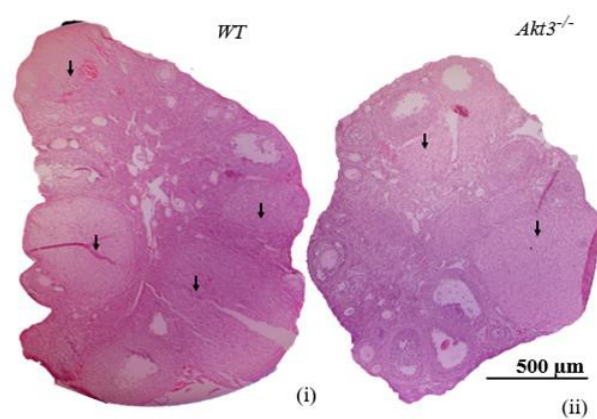
b) La diminution du volume ovarien

Nous avons constaté, comme le montrent les figures 3.4A et 3.5D, une grande différence de grosseur entre les ovaires des souris de type sauvage et les souris déficientes en Akt3. Les ovaires des souris Akt3^{-/-} paraissaient petits. Ce constat nous a poussés à analyser le volume ovarien. Ainsi, à partir des coupes d'ovaires de souris âgées de 100 jours, et après coloration à l'HE, comme expliqué dans la section matériel et méthodes, nous avons calculé le volume ovarien dans les deux groupes. Puis, nous avons réalisé les comparaisons dans les différentes phases du cycle œstral. Les résultats montrent que le volume ovarien était significativement diminué chez les souris Akt3^{-/-} par rapport aux souris de type sauvage dans toutes les phases du cycle ($p = 0,045$; $0,049$; $0,003$ et $0,022$ respectivement en P, E, M et D) (Figure 3.5E). Ce résultat suggère qu'Akt3 joue un rôle dans la régulation du volume ovarien.

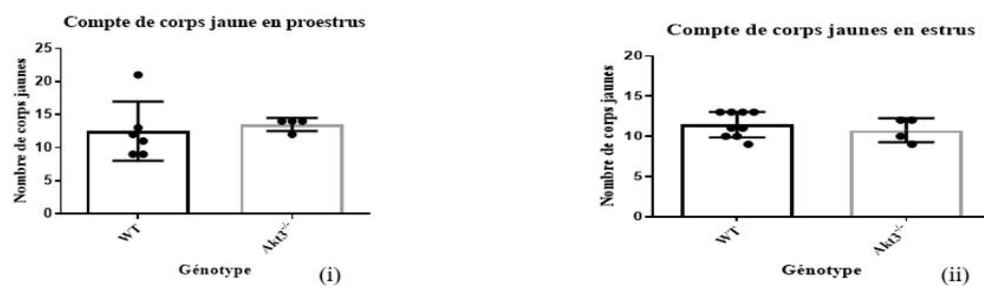
A) Metestrus



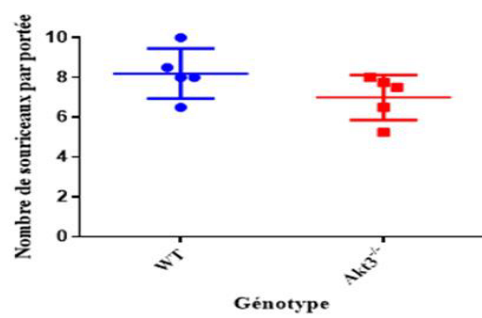
B) Diestrus



C)



D)



E)

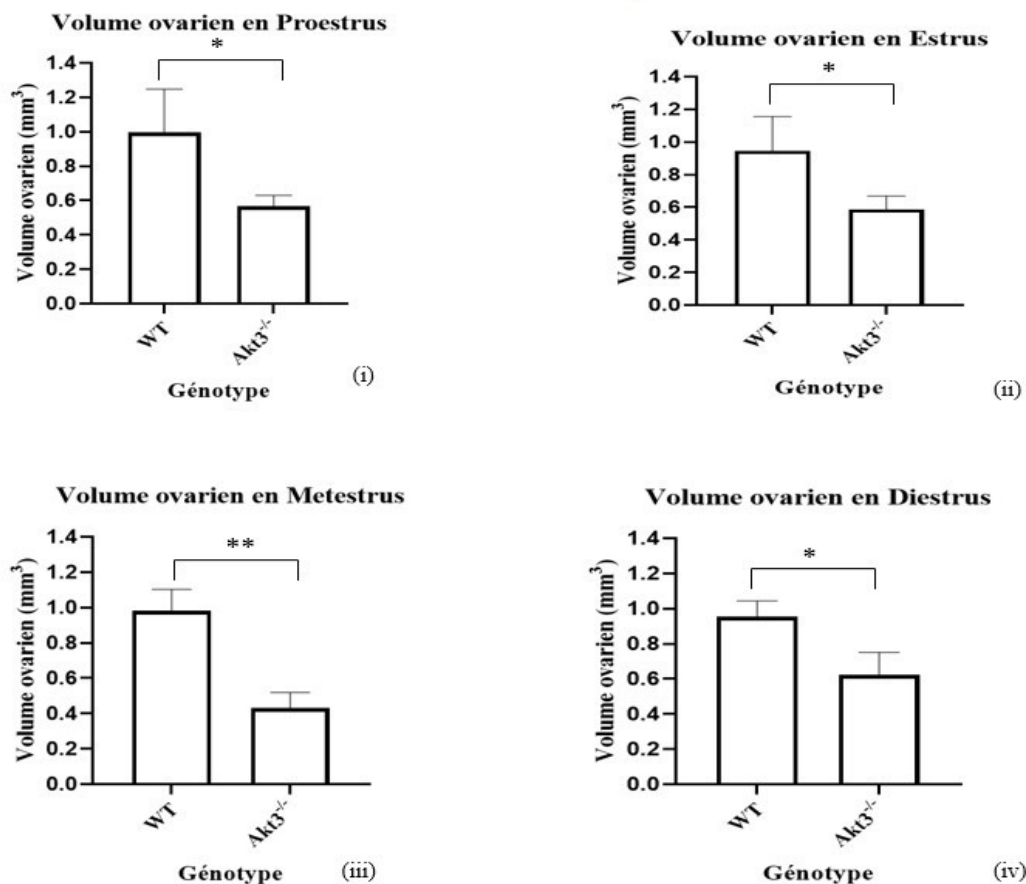


Figure 3.5 Effet de l'élimination d'Akt3 sur le corps jaune, la fertilité et le volume ovarien.

(A-C) Décompte de corps jaunes dans les quatre phases du cycle œstral : les ovaires de souris WT et Akt3^{-/-} enrobés dans la paraffine ont été sectionnés en des coupes de 5 μ m, et chaque 5^e section a été colorée avec l'HE pour la visualisation des corps jaunes. Pour chaque ovaire, un total de 5 sections a été utilisé pour faire le compte de corps jaunes. Pour chaque souris, la moyenne des deux ovaires était prise en compte dans chaque phase du cycle œstral et dans chaque groupe (n = 5-6) chez les souris âgées de 100 jours. (D) Analyse de la fertilité des souris WT et Akt3^{-/-} : des souris femelles Akt3^{-/-} ont été hébergées individuellement puis accouplées à l'âge de 60 jours avec des mâles de type sauvage dont la fertilité est prouvée. Des femelles de type sauvage ont été utilisées comme témoins (n = 5 dans chaque groupe). Le nombre de souriceaux par portée a été enregistré pour chaque souris. Pour chaque souris, un minimum de 4 portées a été considéré. (E) Comparaison du volume ovarien dans les quatre phases du cycle œstral entre les souris WT et Akt3^{-/-}. i) volume ovarien en P; ii) volume ovarien en E; iii) volume ovarien en M) iv) volume ovarien en D. Les données représentent les moyennes \pm écart types. Pour la comparaison entre les deux génotypes, le test t de Student a été utilisé. (*, P < 0,05; **, P < 0.01). Les flèches montrent les corps jaunes.

3.6 Validation du modèle de cellules de la granulosa

Dans l'ovaire, les cellules de la granulosa contiennent des récepteurs de différentes hormones dont ceux des stéroïdes ovariens et de la FSH. Ainsi, elles représentent un moyen moins complexe pour étudier la régulation de l'expression des isoformes d'Akt par les androgènes et les œstrogènes. Afin de mieux cerner le rôle des différentes isoformes d'Akt dans les cellules de la granulosa, nous avons isolé ces cellules et déterminé qu'elles étaient bien des cellules de la granulosa. L'expression des récepteurs de la FSH (FSH-R) dans l'ovaire est caractéristique des cellules de la granulosa, et de ce fait, ils peuvent être utilisés comme marqueurs pour confirmer leur identification. Ainsi, nous avons analysé l'expression de la FSH-R par immunofluorescence dans nos cellules pour confirmer leur nature et leur pureté en utilisant l'anticorps spécifique. Comme le montre la figure 3.6A, la grande majorité de nos cellules sont positives à cet anticorps. Ce résultat confirme la nature de nos cellules et un bon degré de pureté de notre culture. De façon additionnelle, le WB réalisé à 24 h et 48 h après culture montre la stabilité de l'expression de FSH-R comme le montre la figure 3.6B.

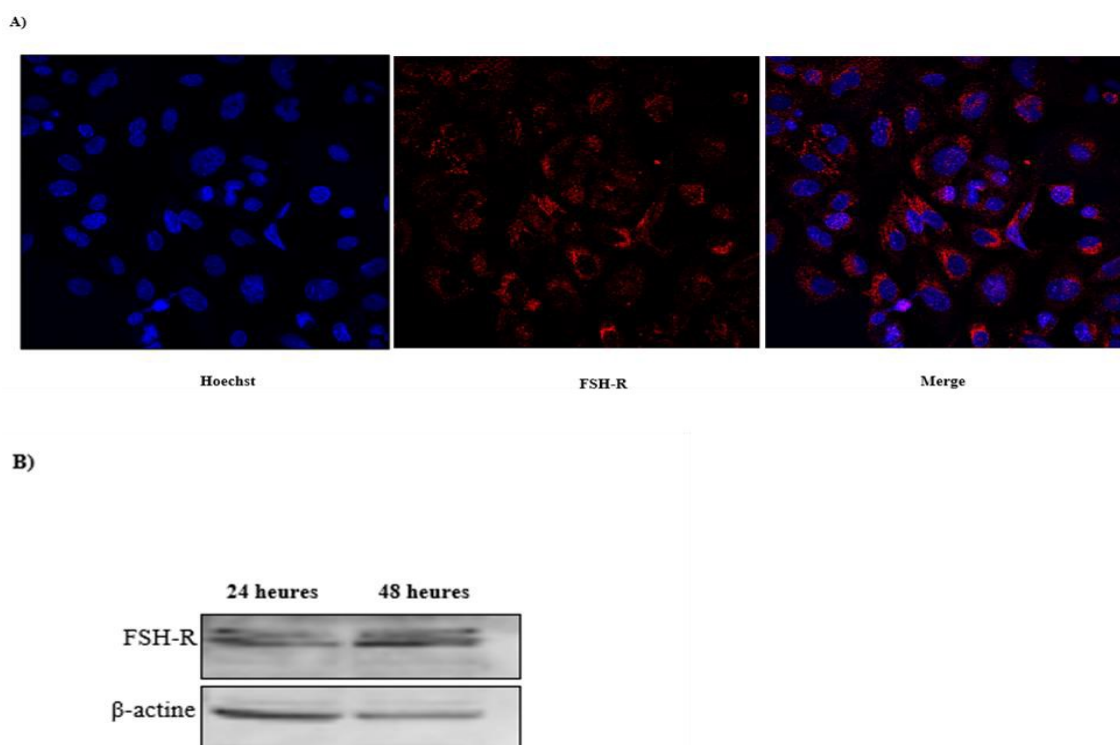


Figure 3.6 Validation du modèle des cellules de la granulosa ovarienne.

Les cellules de la granulosa ont été cultivées pendant différents temps et la quasi-totalité des cellules expriment le FSH-R. Cette expression confirme la nature des cellules. (A) Détection du FSH-R par immunofluorescence avec l'aide d'un anticorps anti-FSH-R après 48 heures de culture. (B) Analyse des protéines totales des cellules de la granulosa après 48 heures de culture par WB en utilisant un anticorps contre le FSH-R. La β -actine a été utilisée comme contrôle de charge.

3.7 Expression et localisation des isoformes d'Akt dans les cellules de la granulosa

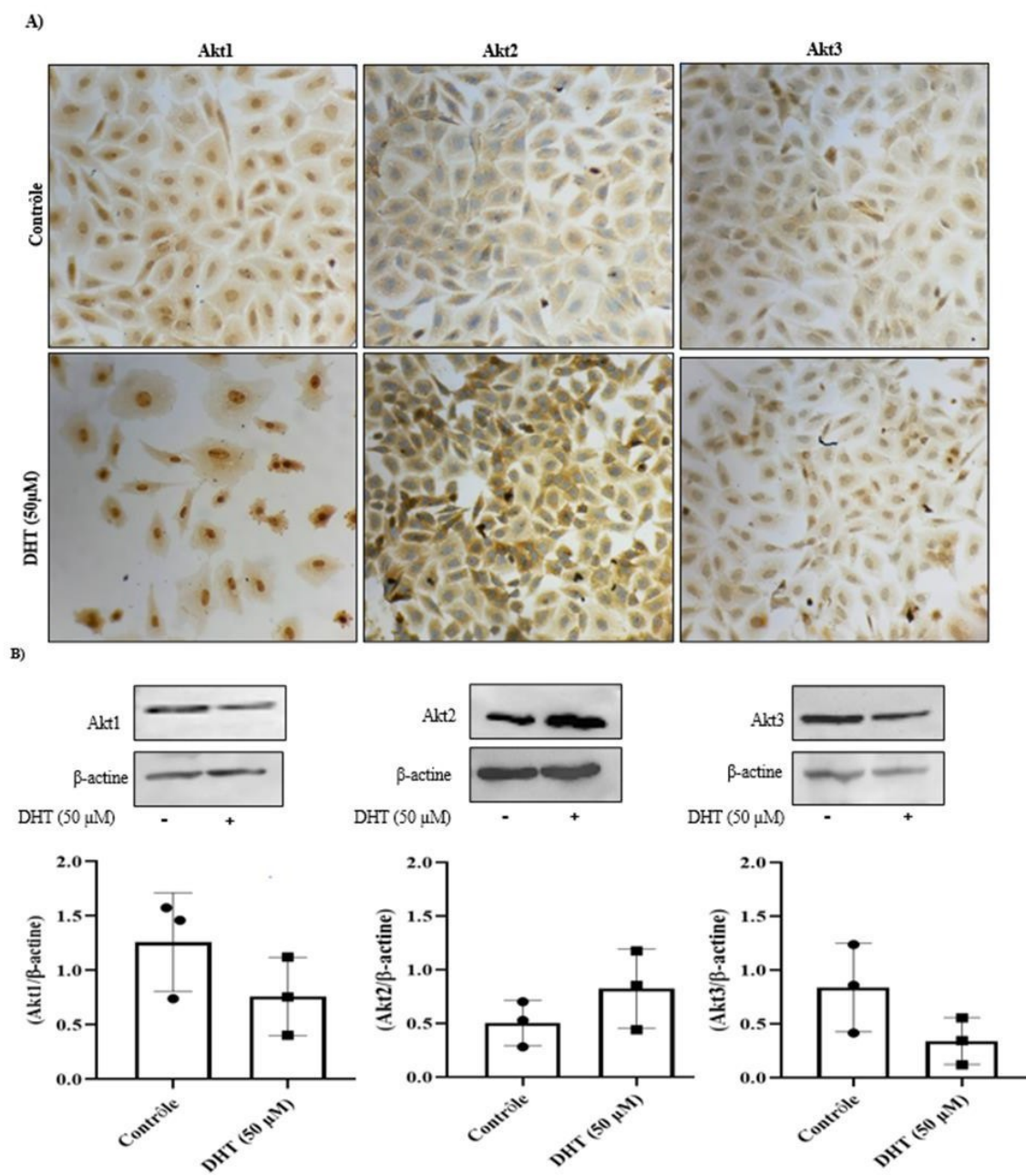
Akt est une des protéines abondamment exprimées dans les cellules, et se retrouve parmi les protéines ubiquitaires. Plusieurs études établissent la spécificité de ses isoformes en fonction des organes et des cellules comme démontré précédemment et dans la présente étude (65, 74). Les cellules de la granulosa représentent un des éléments importants dans la gestion du destin folliculaire. Malgré leur importance, les voies de signalisation cellulaire qui y participent en leur sein sont peu caractérisées. Dans un premier temps, nous avons estimé opportun de caractériser la localisation et l'expression des différentes isoformes d'Akt dans les cellules de la granulosa avant de procéder à différents traitements. Pour ce faire, nous avons utilisé l'ICC. Les résultats de la présente étude montrent, comme nous l'avons observé dans l'étude *in vivo*, que les trois isoformes d'Akt sont différemment localisées au sein des cellules de la granulosa même si elles possèdent certaines similarités (Figure 3.7A et C, dans les groupes contrôles). En effet, Akt1 a montré une nette double localisation nucléaire et cytoplasmique bien que l'intensité nucléaire semble prédominante. Pour ce qui est d'Akt2, il est localisé dans le cytoplasme des cellules. Akt3 quant à lui présente aussi une localisation cytoplasmique, et en très petite quantité, une localisation nucléaire. Ces ICC confirment la faible intensité d'expression d'Akt3 dans ces cellules.

3.8 Régulation de l'expression et de la localisation des isoformes d'Akt par les stéroïdes ovariens

Dans le but d'étudier les effets des stéroïdes ovariens, spécialement des androgènes et des œstrogènes, nous avons traité pendant 48 heures les cellules de la granulosa avec la 5α -DHT comme androgène d'une part. D'autre part, nous avons utilisé le 17β -E₂ comme œstrogène pour le traitement. À l'issue des traitements, nous avons réalisé des ICC ainsi que des WB pour étudier

l'effet des traitements sur la régulation de l'expression de chaque isoforme. Les résultats obtenus par WB (Figures 3.7B et 3.7D) montrent que ces deux stéroïdes n'affectent pas de façon significative l'expression des isoformes d'Akt.

Cependant, les résultats des ICC tendent à montrer que leurs effets sur certaines isoformes d'Akt sont opposés. Par exemple, lors du traitement avec la DHT, l'intensité d'expression d'Akt1 paraissait diminuée, alors que celle d'Akt2 paraissait augmentée. Le traitement avec la DHT semble n'avoir aucun effet spécifique sur la localisation des isoformes d'Akt (Figure 3.7A). Ces tendances concernant la régulation de l'expression des isoformes d'Akt par la DHT ont été également observées dans les WB, mais les différences ne sont pas significatives. Dans le WB, la DHT a aussi tendance à diminuer l'expression d'Akt3. Contrairement à l'action de la DHT, lors du traitement avec l'E₂, l'intensité d'expression paraissait augmentée pour Akt1, et diminuée pour Akt2 sur les ICC. Pour Akt3, l'action d'E₂ était moins évidente. Cette modification d'intensité des isoformes d'Akt avec l'E₂ ne semblait pas affecter la localisation d'Akt1 et d'Akt2. En ce qui concerne Akt3, sa localisation nucléaire semblait augmentée (Figure 3.7C). Les résultats des WB concernant l'E₂ montrent la même tendance pour Akt1, et les différences ne sont pas significatives comme pour le cas de la DHT.



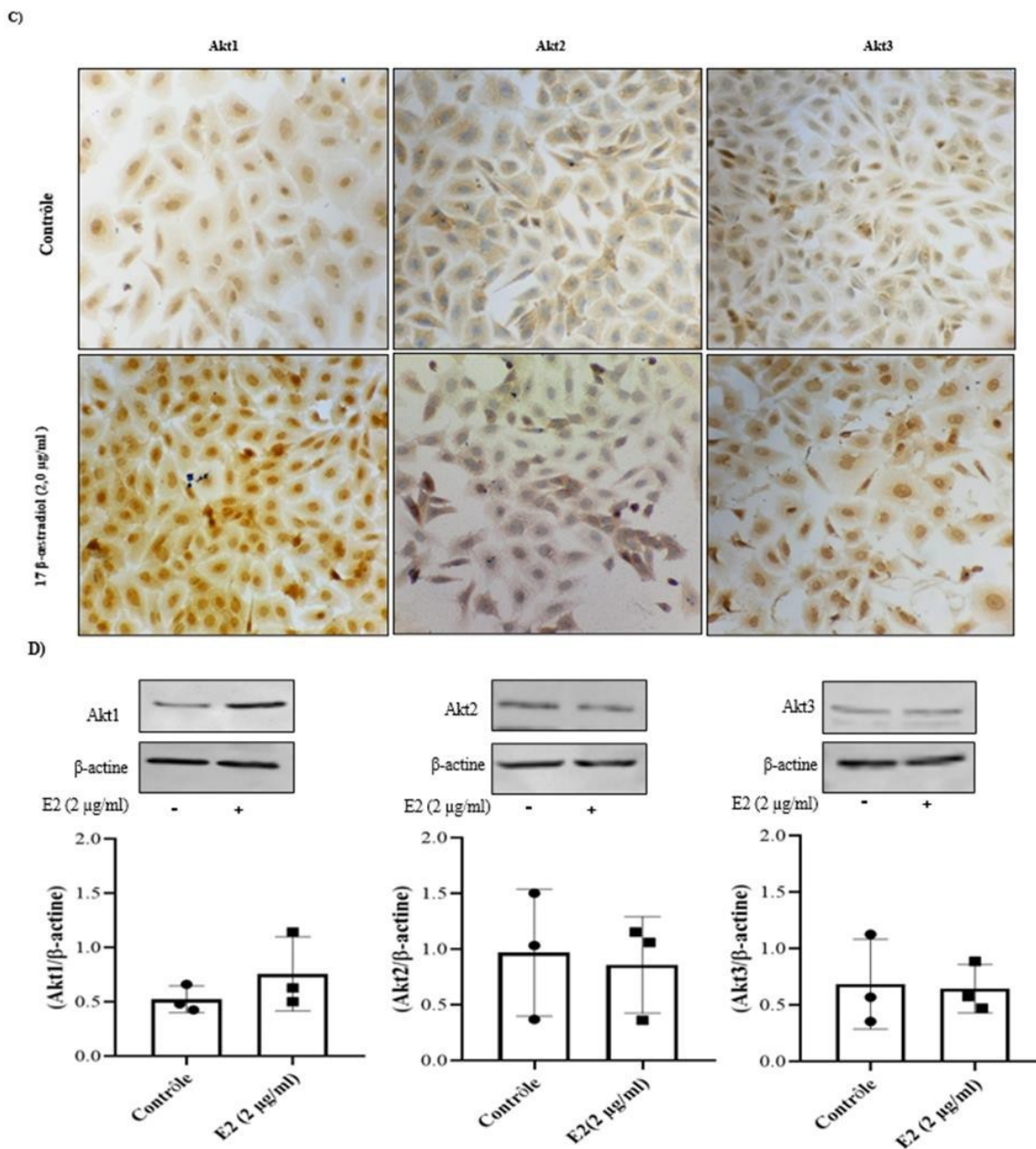


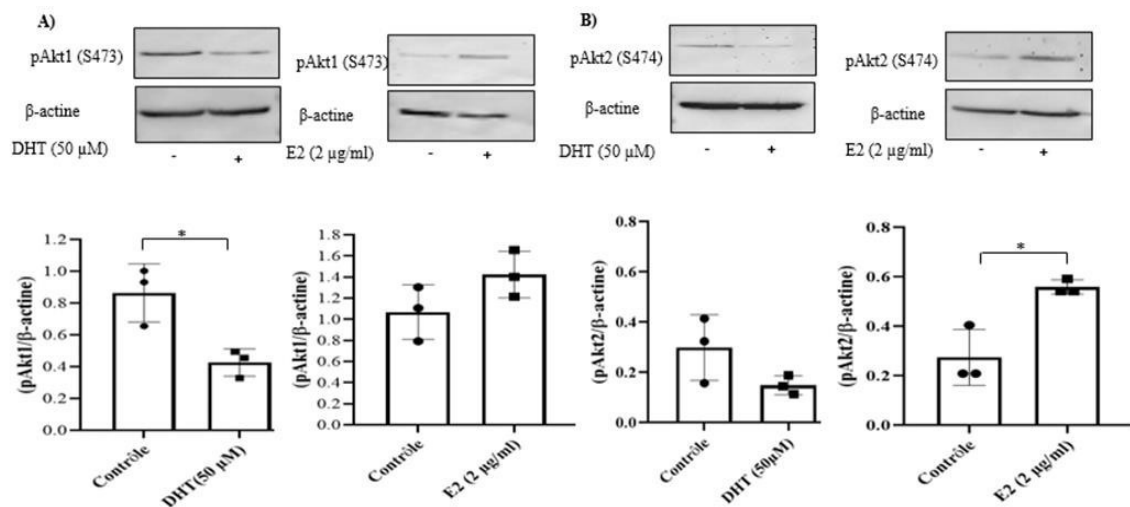
Figure 3.7 Régulation de l'expression et localisation des isoformes d'Akt par les stéroïdes ovariens.

Les cellules de la granulosa ovarienne ont été cultivées et traitées pendant 48 heures dans deux expériences indépendantes, soit avec la DHT (50 μM), soit avec l'E₂ (2 μg/ml). (B et D) : les WB réalisés sur les protéines totales qui ont été isolées à l'issue de différents traitements. (A et C) : l'ICC qui a été réalisée sur des cellules de la granulosa à l'issue de différents traitements. La même quantité de protéine a été déposée dans chaque puits. Les densitométries représentent les moyennes ± écart types, et la β-actine a servi de contrôle de charge. Pour la comparaison entre les groupes de contrôles et les groupes de traitements, le test t de Student a été utilisé. Chacune de ces expériences a été répétée au moins trois fois.

3.9 Impact du traitement stéroïde sur la phosphorylation des isoformes et des cibles d'Akt

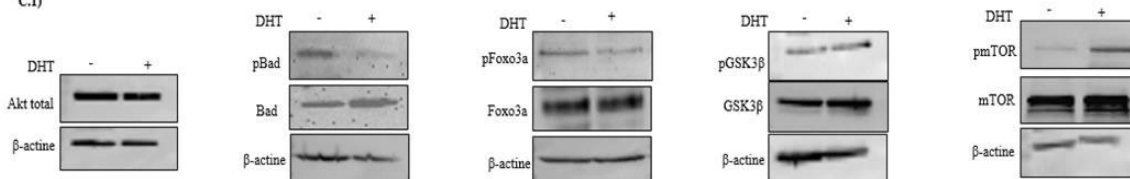
Dans le but de voir l'impact du traitement des stéroïdes ovariens sur l'activité des isoformes d'Akt, nous avons réalisé également des WB en étudiant leur phosphorylation. Pour cette étude, nous avons utilisé deux anticorps spécifiques actuellement disponibles dirigés contre pAkt1 (S 473) et pAkt2 (S 474). Nous avons analysé aussi la phosphorylation de quelques cibles d'Akt que nous avons mentionné précédemment, notamment Bad, Foxo3a, GSK 3 β et mTOR. Les résultats montrent que la phosphorylation d'Akt1 et 2 sont influencées de façon évidente par ces deux traitements de manière inverse. En effet, le traitement avec la DHT diminuait le niveau de leur phosphorylation quoiqu'une différence significative n'était observée que pour pAkt1 ($p = 0,0201$). Le traitement avec l'E₂ augmentait quant à lui sensiblement le niveau de la phosphorylation bien que cela n'ait été significatif que pour pAkt2 ($p = 0,0134$) (Figure 3.8A et 3.8B). La phosphorylation des cibles moléculaires d'Akt impliquées dans la voie anti-apoptotique (Bad et Foxo3a) était diminuée par la DHT quoique la différence n'était significative que pour pBad ($p = 0,0295$) (Figure 3.8C.1 et 2). Cependant, leur phosphorylation était augmentée par l'E₂ bien que la différence ne fût significative que pour pFoxo3a ($p = 0,0130$) (Figure 3.8D.1 et 2). En revanche, la phosphorylation des cibles impliquées dans la croissance et le métabolisme cellulaires (GSK 3 β et mTOR) paraissait augmentée par les deux traitements de façon plus marquée et significative que pour mTOR (Figure 3.8C et 3.8D).

Par ailleurs, nos résultats ont montré que les niveaux de formes non phosphorylées d'Akt total et de ses cibles n'étaient pas influencés par le traitement avec la DHT (Figure 3.8C) ni par celui avec l'E₂ (Figure 3.8D).

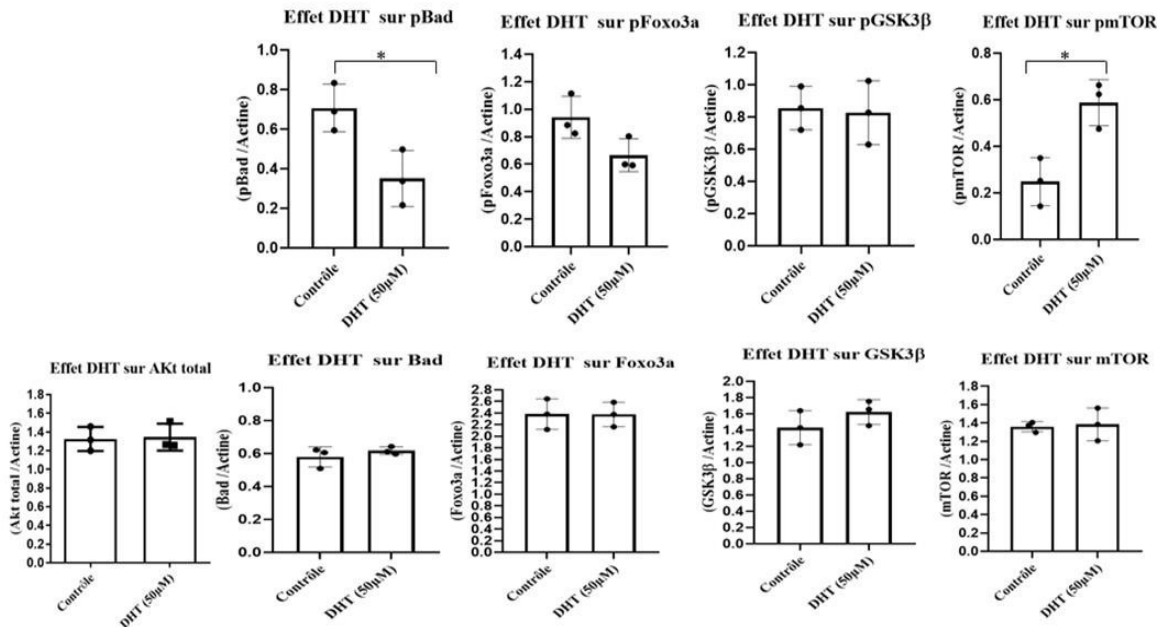


C)

C.1)



C.2)



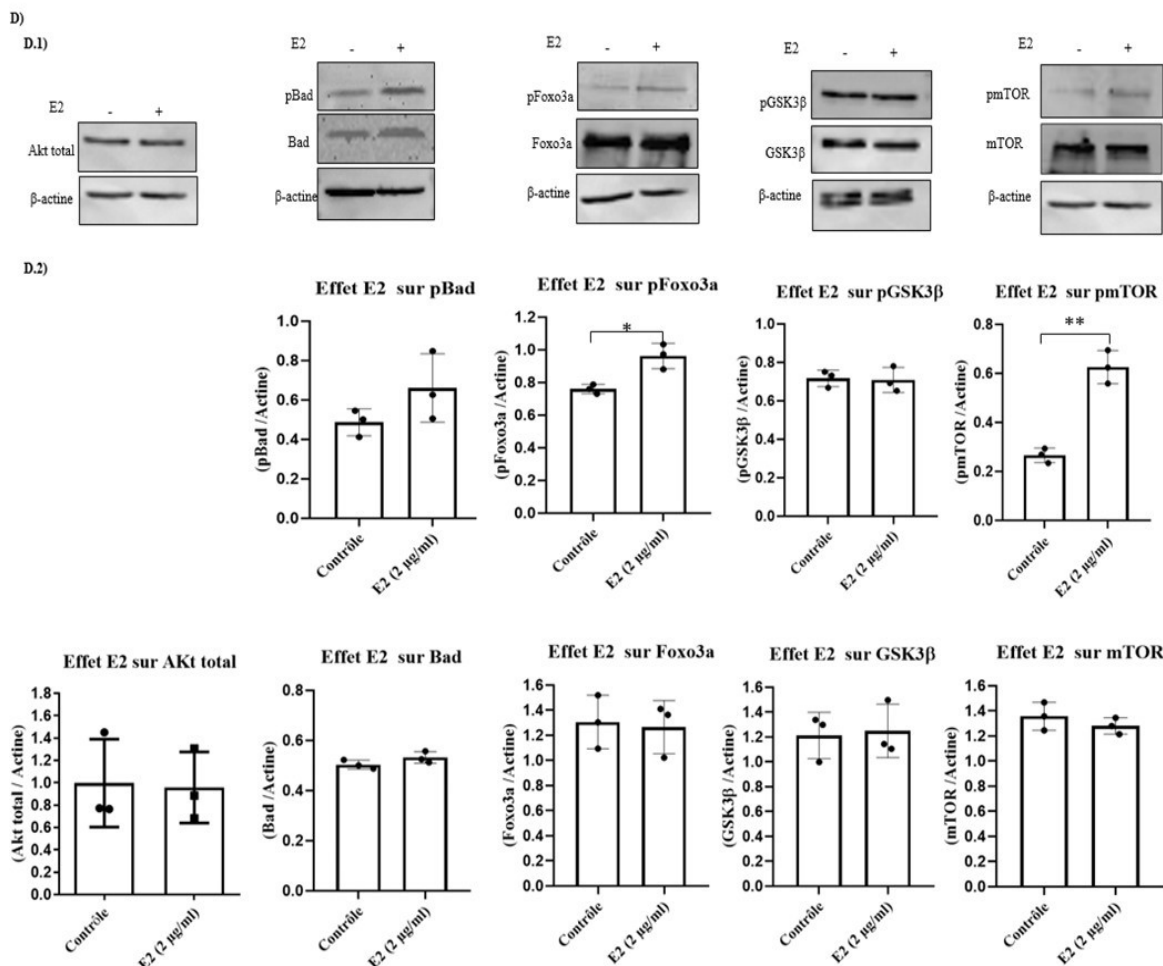


Figure 3.8 Impact du traitement stéroïdien sur Akt total, la phosphorylation de ses isoformes et celle de ses cibles.

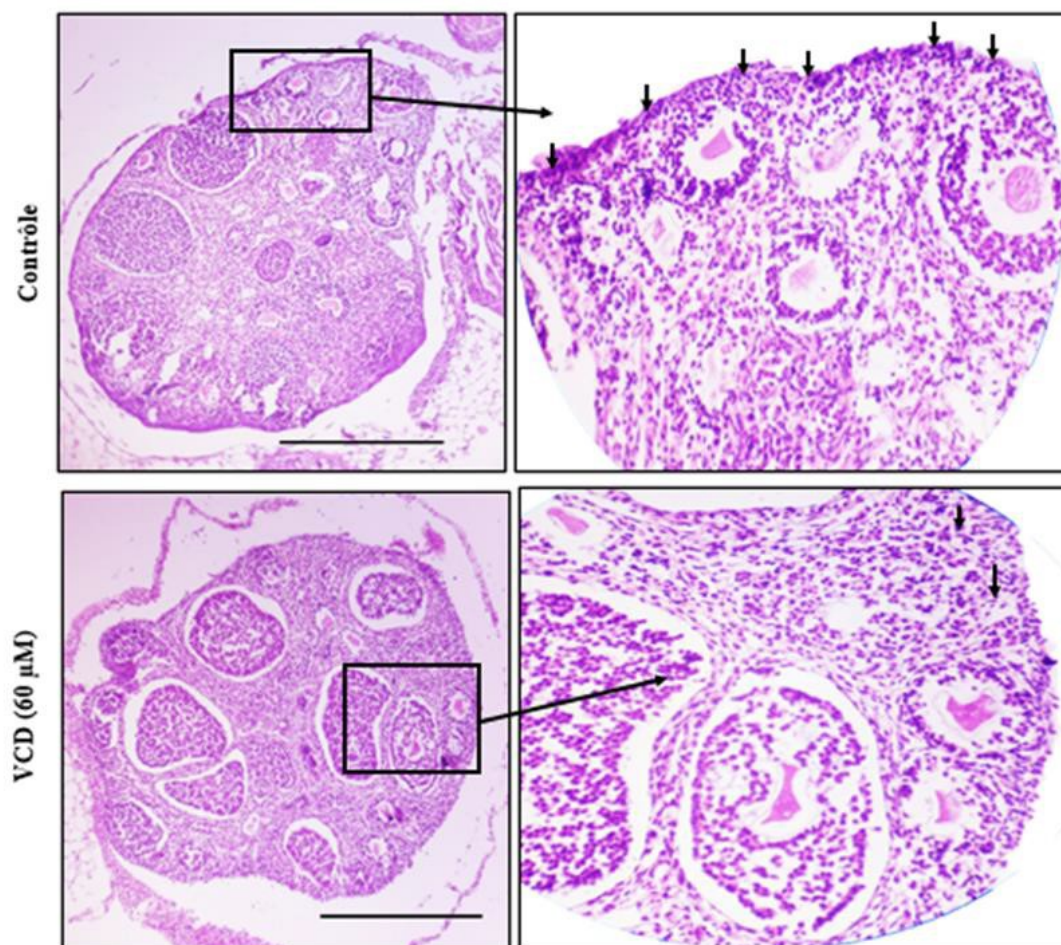
Les cellules de la granulosa ont été cultivées, et traitées pendant 48 heures avec 50 μM de DHT. Dans une autre expérience indépendante, elles ont été traitées avec 2 $\mu\text{g/ml}$ d'E₂. À l'issue des traitements, les protéines totales étaient extraites, et les WB ont été réalisés pour analyser l'expression d'Akt total ainsi que la phosphorylation de ses isoformes et celle de ses cibles en utilisant des anticorps spécifiques : (A) anti-pAkt1 (S 473), (B) anti-pAkt2 (S 474), (C et D) anti-Akt total, anti-pBad, anti-pFoxo3a, anti-pGSK 3 β et anti-pmTOR, ainsi que les anticorps dirigés contre leurs formes non phosphorylées. La densitométrie a été utilisée pour la quantification de la phosphorylation d'Akt1 et d'Akt2. Les données quantitatives sont présentées comme moyennes \pm écart types. Le β -actine a été utilisé comme contrôle de charge. Le test t de Student a été utilisé pour la comparaison entre les groupes de contrôles et les groupes de traitements. Les expériences ont été répétées trois fois. L'astérisque représente la différence significative entre les deux groupes (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$).

3.10 Validation du modèle de vieillissement ovarien induit par le 4-vinylcyclohexène diépoxyde (VCD)

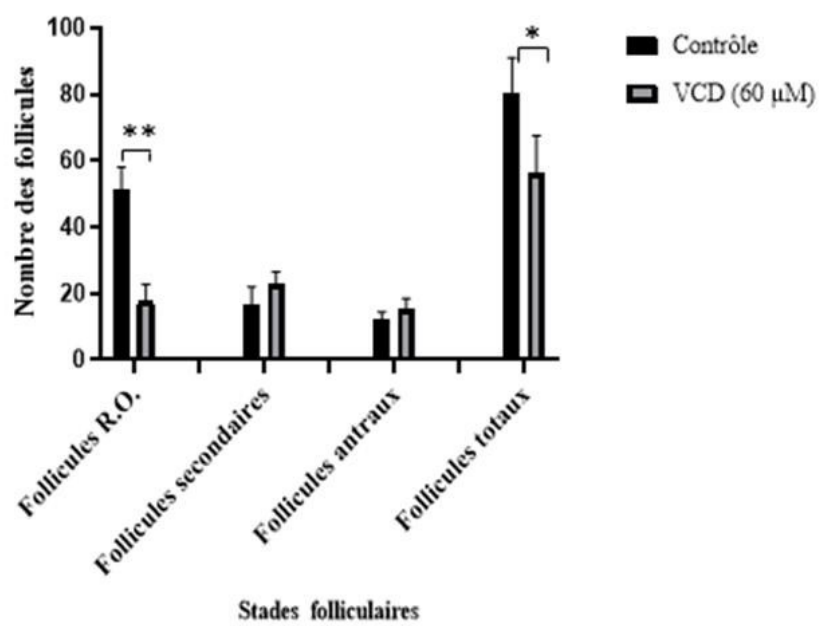
Le VO est défini par la diminution des follicules de la RO, essentiellement les follicules primordiaux et les follicules primaires. Différentes études ont montré que le traitement au VCD représentait un bon modèle pour étudier le VO (119, 127). Dans la présente étude, nous avons induit le VO à l'aide du VCD selon une double approche. Dans le volet *in vitro*, nous avons mis en culture des ovaires, et avons analysé l'effet d'un traitement au VCD sur le vieillissement de ces derniers. Ainsi, nous avons euthanasié les souris C57 BL/6J de type sauvage à l'âge de 28 jours. Ensuite, nous avons récupéré leurs ovaires pour les traiter durant 4 jours avec le VCD (60 μ M) versus contrôle (milieu de culture seul). En vue de valider notre modèle de VO sur des cultures d'ovaires, nous avons réalisé la coloration à l'HE sur des coupes de ces ovaires. Comme le montre l'expérimentation *in vitro* (Figure 3.9.A.1), en comparaison avec les ovaires contrôles, les follicules de la RO étaient rares dans le groupe traitement. Ainsi, la RO et, par conséquent, le nombre total de follicules étaient significativement diminués dans le groupe traitement par rapport au groupe contrôle ($p = 0,0023$ et $P = 0,049$ respectivement) (Figure 3.9.A.2). Les follicules secondaires et antraux n'ont pas été impactés par le traitement avec le VCD. Dans le volet *in vivo*, des souris de même âge ont reçu par injection intrapéritonéale du VCD dilué dans l'huile de sésame (160 mg/kg/j pendant 15 jours) versus contrôle (huile de sésame seul). Quarante-deux jours après la dernière injection, les souris ont été euthanasiées et leurs ovaires, collectés. À la suite du traitement, nous avons observé une diminution des follicules de la RO. Nous avons observé aussi une diminution de toutes les autres catégories de follicules, notamment les follicules secondaires, antraux et par conséquent, le nombre total de follicules ($p = 0,0088$; 0,0336; 0,0175 et 0,0007 respectivement pour les follicules de la RO, secondaires, antraux et le nombre total de follicules) (Figure 3.9.B.1 et 2).

A) *In vitro*

A.1

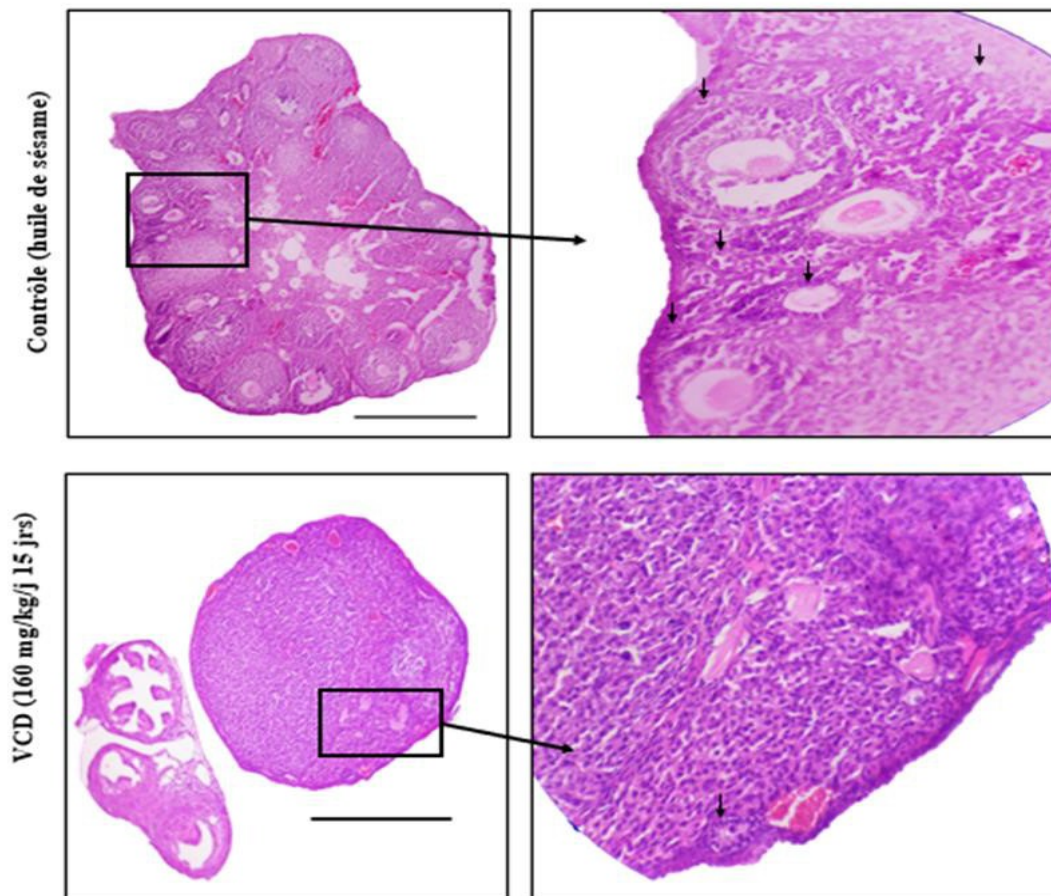


A.2



B) *In vivo*

B.1



B.2

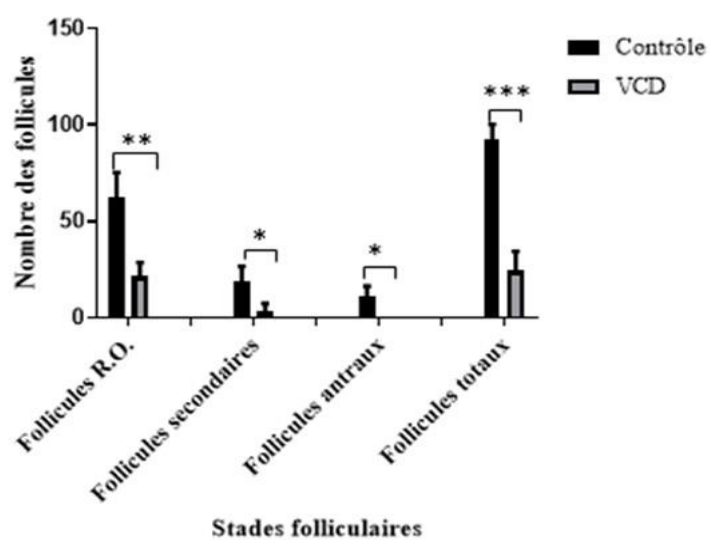


Figure 3.9 Compte de follicules et validation du modèle de vieillissement ovarien induit par le 4-vinylcyclohexène diépoxyde (VCD).

Le VO a été induit par le VCD selon une double approche. *In vitro*, les ovaires des souris âgés de 28 jours ont été récupérés pour être traités durant 4 jours avec le VCD versus contrôle (milieu de culture seul). Dans le volet *in vivo*, les souris de même âge ont reçu par injection intrapéritonéale du VCD dilué dans l'huile de sésame versus contrôle (huile de sésame seul). À l'issue des expériences, les ovaires collectés ont été préparés pour les différentes analyses histologiques (coloration à l'HE), et les follicules ont été comptés comme décrit dans matériel et méthodes. (A.1) Le VCD induit l'effondrement des follicules de la RO et le nombre total de follicules *in vitro*. (B.1) *in vivo*, on note l'effondrement de toutes les catégories de follicules. Le compte de follicules confirme de façon significative ces observations : (A.2) *in vitro* et (B.2) *in vivo*. Les données quantitatives sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart-type. Le test t de Student a été utilisé pour la comparaison entre les groupes de contrôles et les groupes de traitements. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; $n = 3$ dans chaque groupe. Les flèches indiquent les follicules de la RO (primordiaux et primaires). La barre d'échelle = 200 μm .

3.11 Effets du VCD sur l'expression protéique, l'activation des isoformes d'Akt et sur l'expression de la caspase-3 clivée

Nos expériences ont montré que le traitement au VCD était efficace autant *in vivo* que *in vitro* puisque les coupes des deux types d'ovaires montraient une diminution marquée du nombre de follicules primordiaux et primaires.

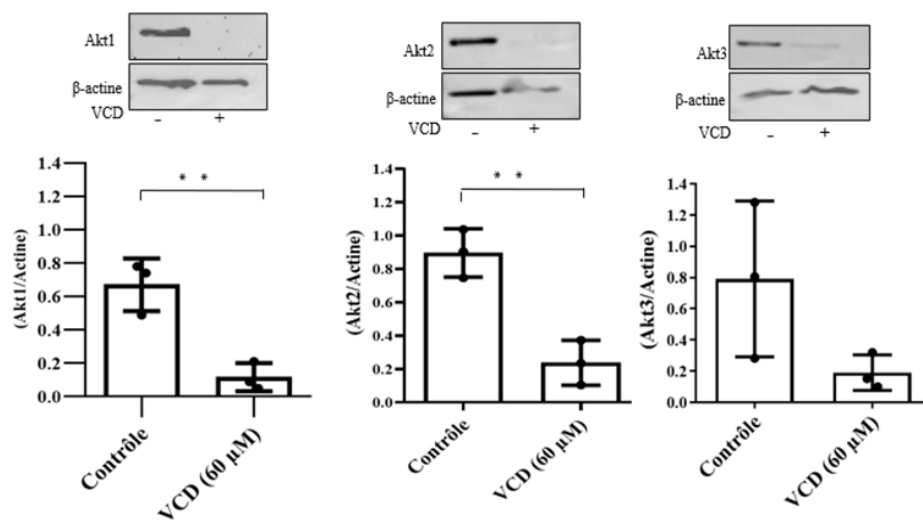
Il est connu qu'Akt est impliqué dans le processus du VO, mais l'implication spécifique de ses isoformes dans ce processus n'a jamais été étudiée. Puisque chaque isoforme d'Akt joue des fonctions spécifiques, mais aussi redondantes nous avons trouvé important d'étudier leur comportement au cours du VO. Nous avons induit le VO et étudié l'expression de chacune des isoformes d'Akt chez les ovaires en culture et *in vivo* chez l'animal. L'analyse des protéines d'ovaires en culture par WB, dans notre étude *in vitro*, montre que la quantité des trois isoformes d'Akt était réduite par l'administration du VCD. Cette différence est significative pour Akt1 et Akt2 (p respectivement = 0,0065 et 0,0045) (Figure 3.10.A.1). Les résultats de l'étude *in vivo* montrent que, comparativement au groupe contrôle, seule la quantité d'Akt1 était réduite dans le groupe traitement. Cependant, la différence observée n'était pas significative. Akt2 et 3 ne semblaient pas affectés dans le groupe traitement par rapport au groupe contrôle (Figure 3.10.B.1). Nous avons ensuite analysé l'activation de ces isoformes en étudiant leur phosphorylation grâce à deux anticorps spécifiques dirigés contre pAkt1 (S 473) et pAkt2

(S 474). Nos résultats montrent qu'*in vitro*, la phosphorylation d'Akt1 et Akt2 était significativement réduite dans le groupe traitement par rapport au groupe contrôle (p respectivement =0,0053 et 0,0011) (Figure 3.10.A.2). Cependant, *in vivo*, comme dans le cas de l'étude de la quantité de protéines non phosphorylées, aucune différence n'a été observée. En plus, aucune tendance n'y est observée (Figure 3.10.B.2). Ces résultats mis ensemble montrent que le VCD affecte aussi bien l'expression protéique que l'activation des isoformes d'Akt *in vitro* mais non *in vivo*. Les résultats *in vivo* et *in vitro* étant différents, ils suggèrent que Akt ne joue pas un rôle prépondérant dans la survenue du VO.

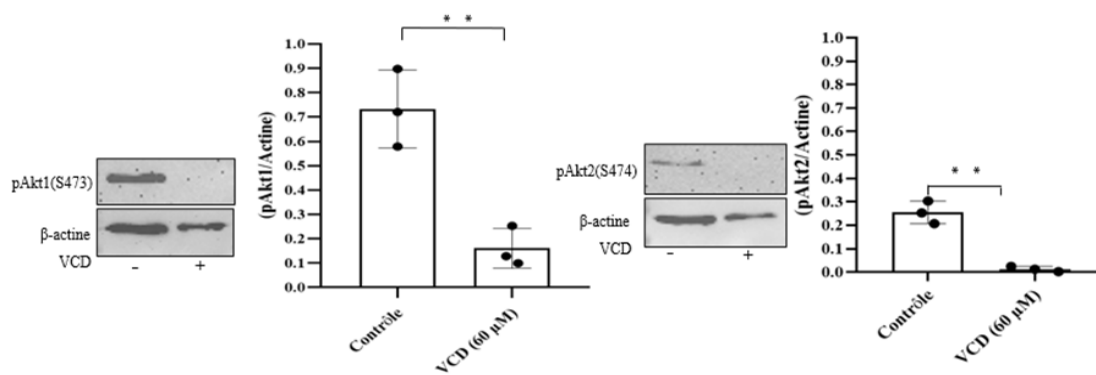
Comme le traitement au VCD est connu pour détruire les follicules primordiaux et primaires, nous avons analysé l'expression de la caspase-3 clivée pour déterminer le type de mort cellulaire que le VCD induisait. *In vitro*, nos résultats montrent une augmentation significative de l'expression de caspase-3 clivée dans le groupe traitement comparativement au groupe contrôle (p = 0,0016) (Figure 3.10.A.3). Ce résultat suggère que le VCD induit la mort par apoptose. *In vivo*, la caspase-3 clivée, n'a pas été détectée dans les deux groupes (Figure 3.10.B.3) nous avons donc été dans l'impossibilité de déterminer le type de mort cellulaire impliqué dans la diminution des follicules dans l'expérience *in vivo*.

A) *In vitro*

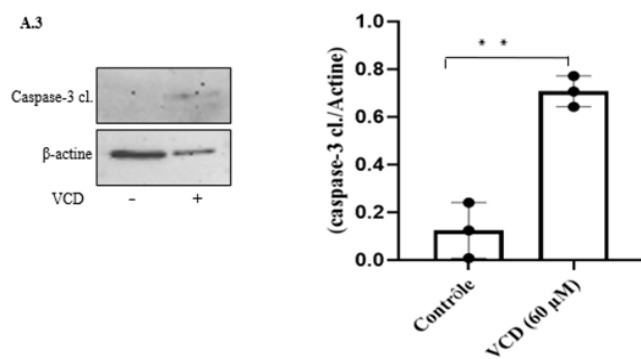
A.1



A.2



A.3



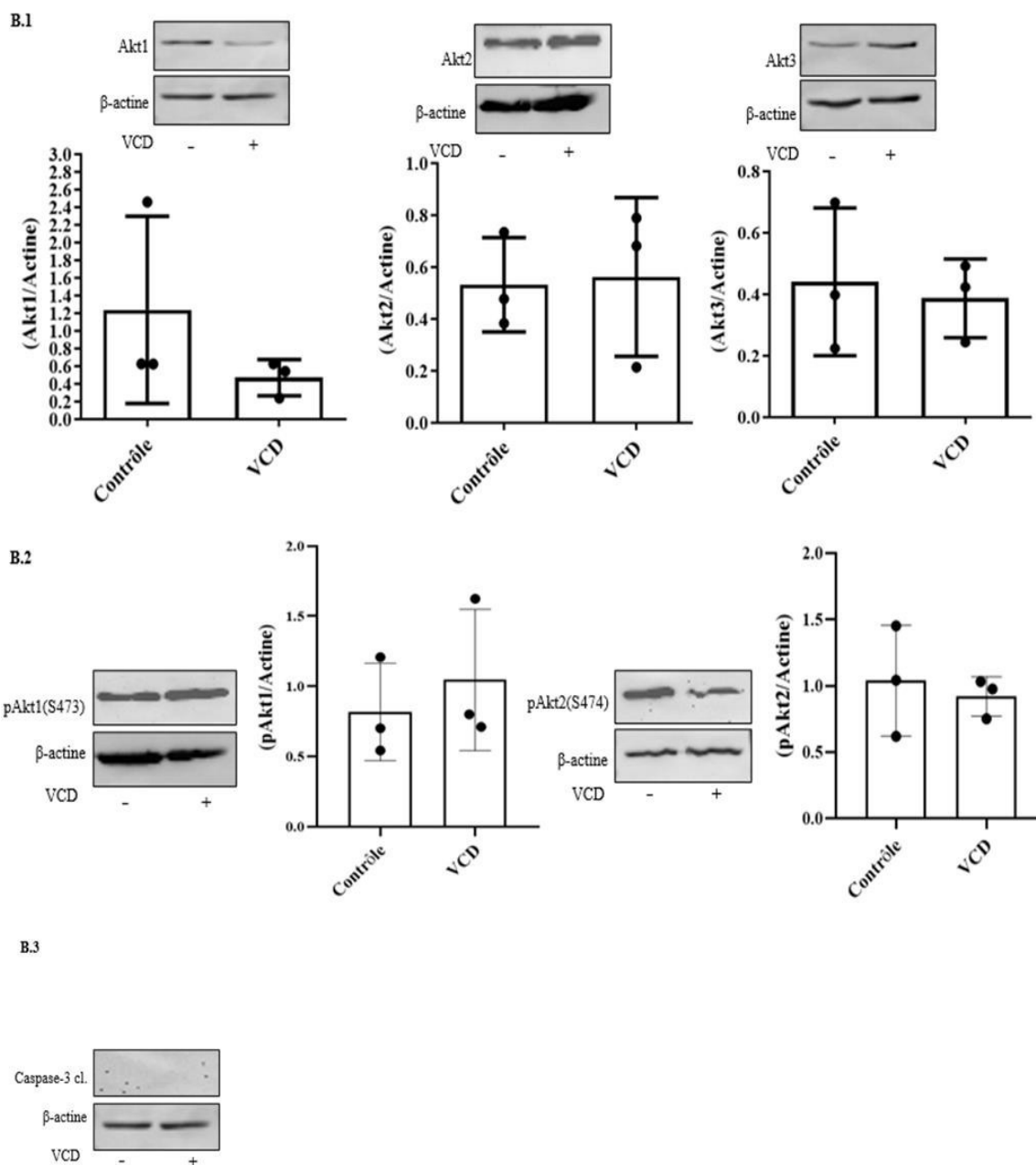
B) *In vivo*

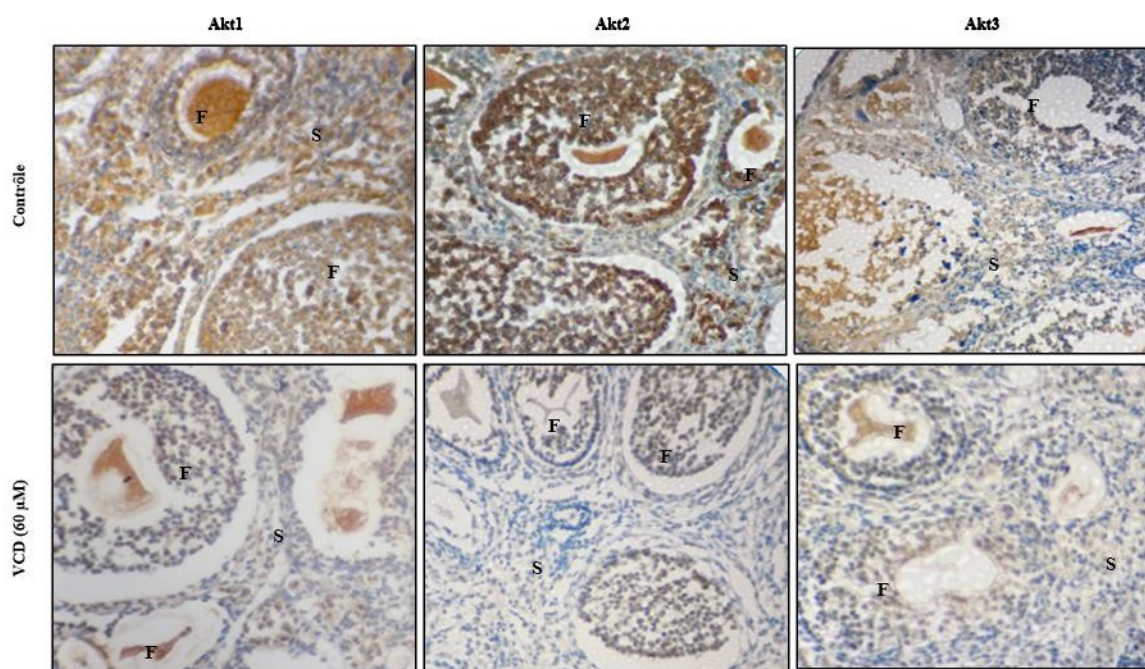
Figure 3.10 Effets du 4-vinylcyclohexène diépoxyde (VCD) sur l'expression protéique, l'activation des isoformes d'Akt et sur l'expression de la caspase-3 clivée.

Le VO a été induit par le VCD selon une double approche. *In vitro*, les souris de type sauvage C57 BL/6J ont été euthanasiées à l'âge de 28 jours. Puis, leurs ovaires étaient récupérés pour être traités durant 4 jours avec le VCD (60 μ M) versus contrôle (milieu de culture seul). Dans le volet *in vivo*, les souris de même âge ont reçu par injection intrapéritonéale du VCD dilué dans l'huile de sésame (160 mg/kg/j pendant 15 jours) versus contrôle (huile de sésame seul). Quarante-deux jours après la dernière injection, les souris ont été euthanasiées, et leurs ovaires ont été collectés. Les protéines totales des ovaires ont été

analysées par WB. (A.1) Niveau d'expression protéique des isoformes d'Akt *in vitro* et (B.1) *in vivo*. (A.2) Niveau d'activation d'Akt1 et Akt2 par l'étude de leur phosphorylation respective *in vitro* et (B.2) *in vivo* en utilisant des anticorps spécifiques. (A.3) Niveau d'expression protéique de la caspase-3 clivée *in vitro* et (B.3) *in vivo*. La bêta-actine a été utilisée comme contrôle de charge. La densitométrie a été utilisée pour la quantification. Les données quantitatives sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart-type. Le test t de Student a été utilisé pour la comparaison entre les groupes. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; $n = 3$ dans chaque groupe.

Fort des résultats qui ont montré la réduction *in vitro* des isoformes d'Akt par les WB à la suite du traitement avec le VCD, nous avons trouvé opportun de voir l'influence de cette régulation sur la localisation de chacune de ces isoformes. En effet, nous avons réalisé des IHC avec des anticorps spécifiques. La réduction de l'expression protéique de toutes les isoformes d'Akt est confirmée *in vitro*. Apparemment, il n'y a pas de sélectivité de l'action du VCD sur les isoformes d'Akt en fonction des compartiments ovariens. Comme dans les WB, les résultats *in vivo* ne montrent pas de différence nette entre le groupe qui a reçu le VCD et le groupe contrôle (Figure 3.11).

A) *In vitro*



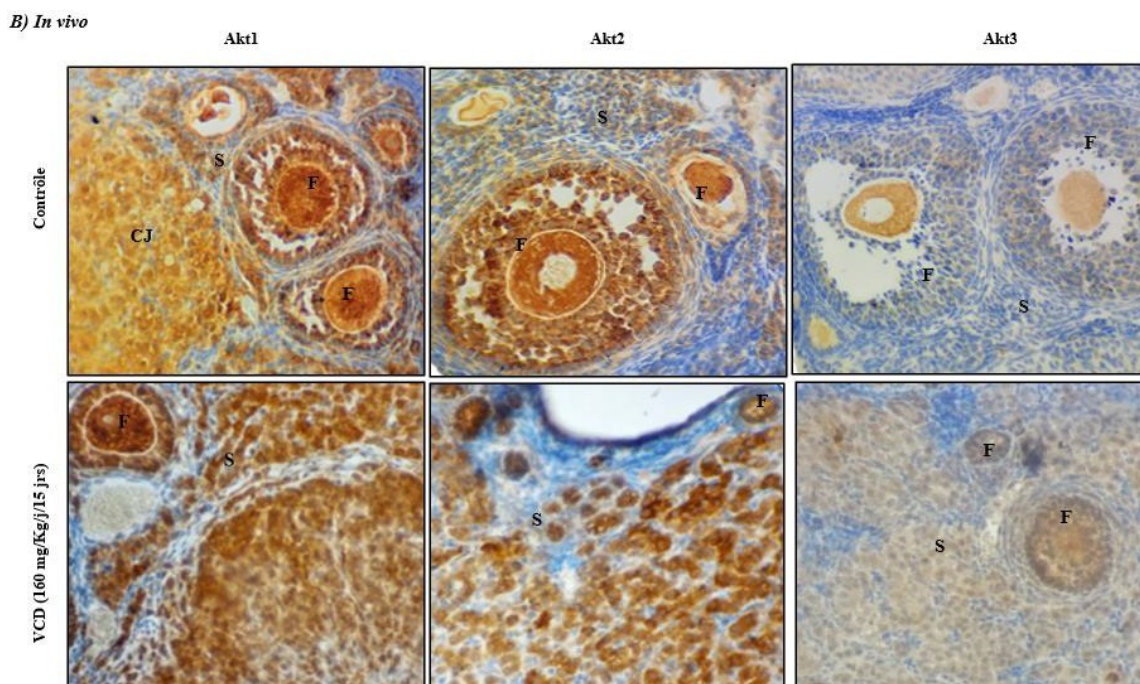


Figure 3.11 Localisation et intensité des isoformes d’Akt à la suite du traitement avec le VCD.

La régulation de la localisation et de l’intensité des isoformes d’Akt ont été analysées dans l’ovaire après administration du VCD chez les souris C57 BL/6J de type sauvage âgées de 28 jours. Les ovaires ont été enrobés dans la paraffine, puis sectionnés en des coupes de 5 μ m pour l’analyse de l’expression des isoformes d’Akt par IHC (n = 3 pour chaque groupe).

(A) *in vitro*, les ovaires ont été cultivés pendant 4 jours de traitement avec 60 μ M de VCD par rapport au groupe contrôle sans traitement : il y a une réduction de l’intensité de toutes les isoformes d’Akt dans le groupe de traitement comparativement au groupe contrôle. Aucun compartiment ovarien n’est spécifiquement visé. (B) *in vivo*, les souris ont reçu en intrapéritonéale pendant 15 jours le VCD versus huile de sésame dans le groupe contrôle, puis les ovaires ont été récupérés 42 jours après le traitement : il n’y a pas de différence nette entre les deux groupes. CJ : corps jaune, F : follicule, S : stroma.

3.12 Régulation de l’expression des ARNm des isoformes d’Akt par le VCD

Nous avons évalué l’expression relative des ARNm des isoformes d’Akt dans nos modèles *in vitro* et *in vivo*. Il en ressort qu’en comparaison au groupe contrôle, *in vitro*, il y avait diminution de l’expression relative des ARNm pour Akt1 et Akt3. Le seuil de significativité n’est atteint que pour Akt1 ($p = 0,0042$) (Figure 3.12.A). Cependant, *in vivo*, comme dans le cas des protéines, aucun résultat n’est significatif (Figure 3.12.B). Mis ensemble, les résultats

obtenus *in vitro*, suggèrent que le VCD régulerait les isoformes d'Akt d'une manière sélective au niveau transcriptionnel et non au niveau protéique.

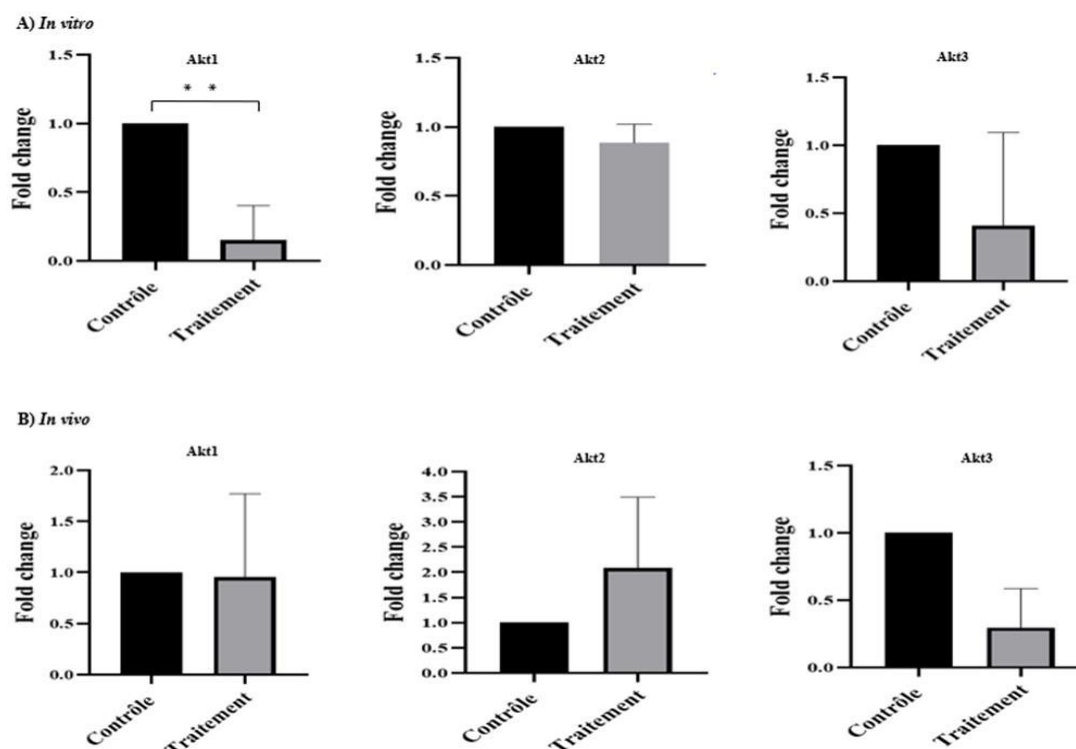


Figure 3.12 Régulation de l'expression des ARNm des isoformes d'Akt par le 4-vinylcyclohexène diépoxyde (VCD).

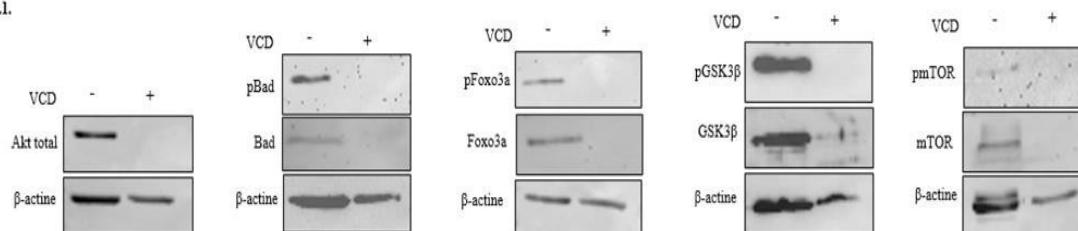
Le VO a été induit par le VCD selon une double approche. *In vitro*, les souris C57 BL/6J de type sauvage ont été euthanasiées à l'âge de 28 jours. Leurs ovaires ont été récupérés pour être traités durant 4 jours avec le VCD bb (60 μ M) versus contrôle (milieu de culture seul). Dans le volet *in vivo*, les souris de même âge ont reçu par injection intrapéritonéale du VCD dilué dans l'huile de sésame (160 mg/kg/j pendant 15 jours) versus contrôle (huile de sésame seul). Quarante-deux jours après la dernière injection, les souris ont été euthanasiées. Les ovaires ont été collectés, et l'ARN a été extrait. (A) Les RT-qPCR pour l'analyse des transcrits des isoformes d'Akt ont été réalisés *in vitro* et (B) *in vivo*. La bêta-actine a été utilisée comme gène de référence, et les échantillons ont été réalisés en duplicata. Les données quantitatives sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart-type. Le test t de Student a été utilisé pour la comparaison entre les groupes. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; $n = 3$ dans chaque groupe.

3.13 Impact du VCD sur l'expression d'Akt total, sur l'expression et la phosphorylation des cibles d'Akt

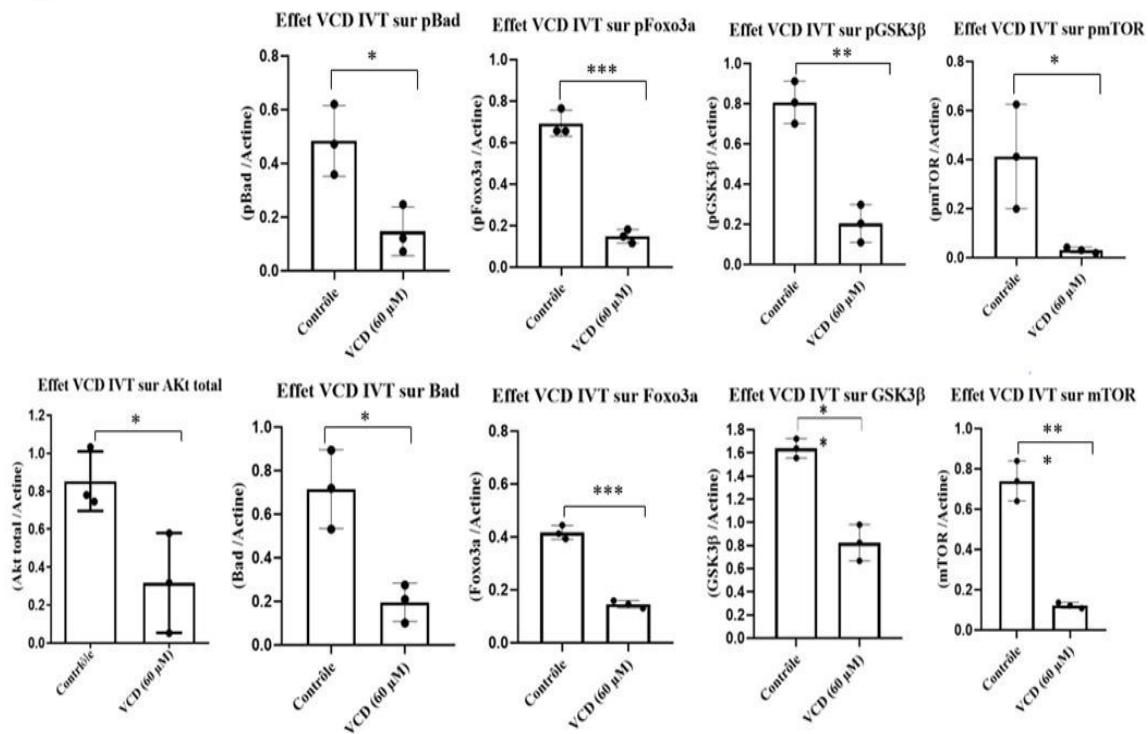
Nous avons investigué également l'impact du traitement avec le VCD sur l'expression d'Akt total et la phosphorylation de certaines cibles moléculaires d'Akt actuellement reconnues comme impliquées dans différents processus biologiques du VO. Ainsi, nous avons réalisé des WB pour étudier Akt total, l'expression protéique et la phosphorylation de certaines de ses cibles, notamment Bad, Foxo3a, GSK3 β et mTOR. Le niveau protéique d'Akt total était fortement réduit par le VCD *in vitro*. En revanche, *in vivo*, ce niveau n'était pas influencé. Le VCD avait induit la réduction drastique significative de l'expression et de la phosphorylation de toutes ses cibles précédemment citées *in vitro* (Figure 3.13A) ($p = 0,01$; 0,0001; 0,0013; 0,0004 respectivement pour Bad, Foxo3a, GSK3 β et mTOR) et ($p = 0,02$; 0,0002; 0,0018; 0,036 respectivement pour Bad, Foxo3a, GSK3 β et mTOR). Comme nous pouvions nous y attendre étant donné les résultats obtenus pour Akt et Caspase 3 clivé, *in vivo*, ces réductions des différents acteurs pro-apoptotiques n'ont pas été observés.

A) *In vitro*

A.1.



A.2.



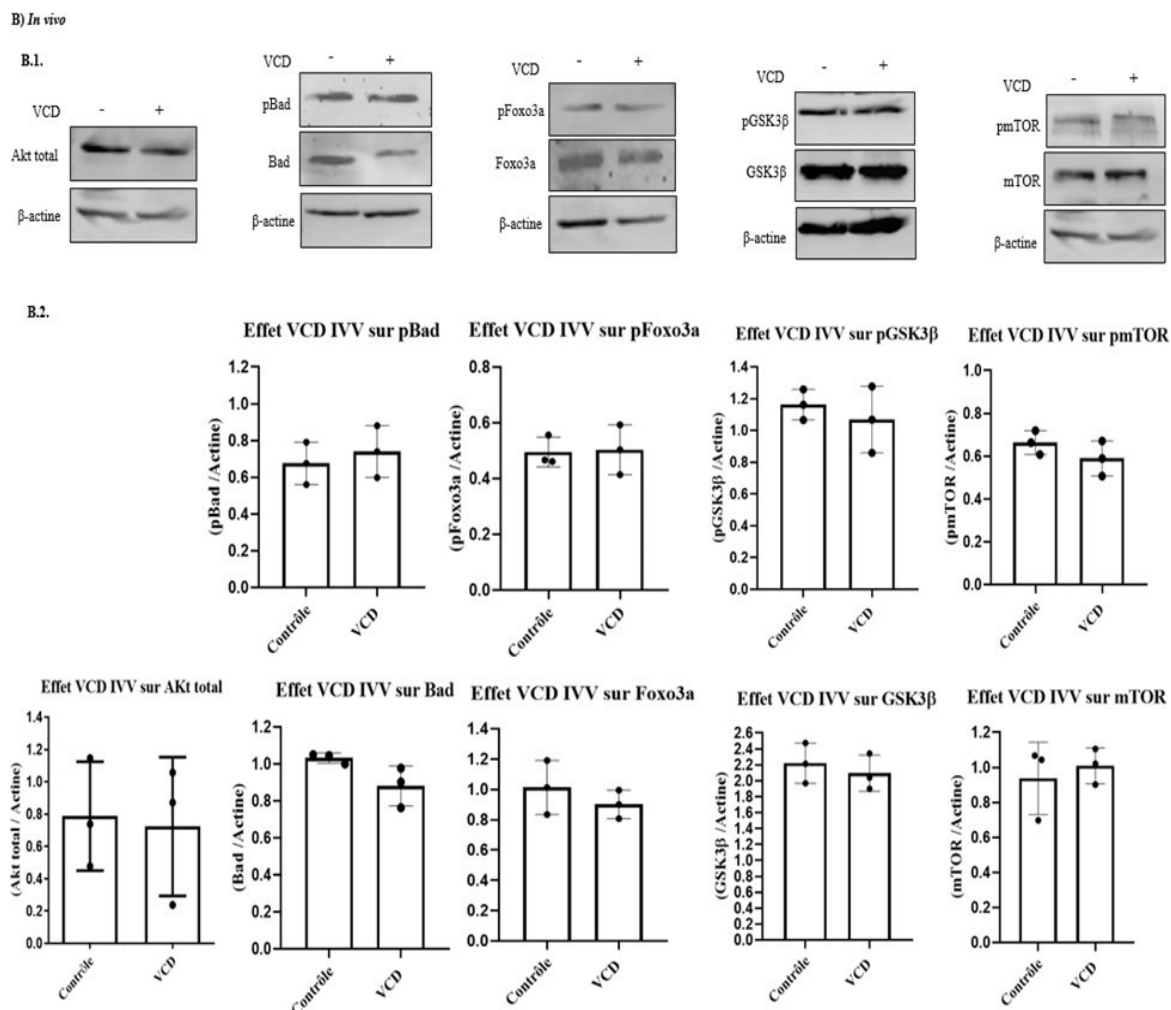


Figure 3.13 Le 4-vinylcyclohexène diépoxyde (VCD) induit la réduction d'expression d'Akt total, de l'expression et de l'inactivation de ses cibles.

À l'issue du traitement, les ovaires ont été récupérés, et la protéine totale a été extraite pour réaliser des WB en utilisant les anticorps spécifiques pour Akt total et la forme phosphorylée et non phosphorylée de chacune de ses cibles étudiées (Bad, Foxo3a, GSK3β et mTOR). La bêta-actine a été utilisée comme contrôle de charge, et chaque expérience a été répétée au moins trois fois. Les résultats montrent que l'expression d'Akt total, l'expression et la phosphorylation de ses cibles sont sensiblement réduites spécialement *in vitro*.

(A) *in vitro*, les ovaires des souris âgées de 28 jours ont été cultivés pendant 4 jours de traitement avec 60 μM de VCD par rapport au groupe contrôle sans traitement. (B) *in vivo*, les ovaires de souris âgées de 28 jours ont été recueillis 42 jours après la dernière dose d'administration intrapéritonéale de VCD (160 mg/kg/j) pendant 15 jours. La densitométrie a été utilisée pour la quantification. Les données quantitatives sont exprimées sous forme de moyenne ± écart-type. Le test t de Student a été utilisé pour la comparaison entre les groupes. *, P < 0,05; **, P < 0,01; ***, P < 0,001; n = 3 dans chaque groupe.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

La voie de signalisation PI3K/Akt est reconnue pour jouer un rôle crucial au sein de l'ovaire dans les divers processus biologiques qui s'y produisent. Elle joue aussi des rôles dans le développement de pathologies comme relevé dans notre introduction (42, 60, 110). Akt représente une des protéines centrales dans cette voie de signalisation cellulaire. La famille Akt est composée de trois isoformes, et les rôles de chacune d'elles n'ont pas encore été totalement élucidés, particulièrement dans l'ovaire. L'étude des trois isoformes d'Akt a constitué la base des travaux qui font l'objet de cette thèse. En effet, dans un premier temps, par l'utilisation de différentes techniques et modèles expérimentaux, nous avons caractérisé la régulation de l'expression, de la localisation et de l'activation des différentes isoformes d'Akt au travers du cycle œstral chez la souris. Dans un deuxième temps, nous avons étudié la régulation de ces isoformes par les stéroïdes ovariens au sein des cellules de la granulosa. Puis, dans un troisième temps, nous avons étudié les rôles spécifiques d'Akt3 dans la RO, la dynamique folliculaire et l'ovulation. Enfin, nous avons analysé l'importance des isoformes d'Akt au cours du VO induit par le VCD.

4.1 Les isoformes d'Akt sont différemment exprimées dans les compartiments et structures ovariens

L'ovaire, avec ses fonctions complexes, possède deux compartiments qui possèdent des fonctions particulières : le parenchyme ovarien, qui contient les follicules et les corps jaunes; et le stroma, considéré généralement comme un tissu de soutien (6). Le parenchyme participe à la sécrétion des hormones et à la libération cyclique de l'ovule mature. Des études antérieures se sont penchées à investiguer l'expression d'Akt dans l'ovaire chez la plupart d'espèces (48, 54, 128, 129). Cependant, ces études ont analysé Akt de façon générale. Dans notre étude, nous avons analysé l'expression des différentes isoformes d'Akt de façon indépendante. L'expression différentielle des isoformes d'Akt dans les différents compartiments ovariens nous

paraît claire. Nos résultats montrent ainsi une compartimentalisation des isoformes d'Akt dans l'ovaire. En effet, nous avons détecté l'expression des 3 isoformes d'Akt au niveau du parenchyme et celle d'Akt1 et 2 au niveau du stroma. Cette compartimentalisation suggère des rôles particuliers ou redondants des isoformes d'Akt selon qu'elles sont exprimées concomitamment ou pas. Au niveau du stroma, nos résultats suggèrent essentiellement des rôles pour les isoformes 1 et 2. En effet, en dehors du rôle de tissu de soutien, le stroma ovarien contient différents types cellulaires comme les fibroblastes et les cellules immunitaires. Les cellules immunitaires jouent divers rôles lors de l'ovulation en dehors de leurs rôles de défense, car une augmentation du nombre de cellules immunitaires s'opère autour de l'ovulation (6). La présence d'Akt1 et 2 dans le stroma leur suggère des rôles au sein de ces cellules, particulièrement dans les processus inflammatoire et protéolytique qui se déroulent lors de l'ovulation. Au niveau des follicules, qui représentent les unités fonctionnelles de l'ovaire, ou des corps jaunes, les trois isoformes d'Akt ont certainement des rôles à jouer. En effet, les follicules (cellules de la granulosa et de la thèque) et les corps jaunes sont des structures qui synthétisent des hormones, soit des stéroïdes ovariens. Ces hormones sont cruciales pour le développement des follicules, des corps jaunes et pour la reproduction féminine. L'implication de ces hormones dans diverses maladies est pleinement établie (130). Les cellules de la thèque produisent principalement les androgènes. Ces derniers sont aromatisés en œstrogènes dans les cellules de la granulosa. Le corps jaune, quant à lui, produit en prépondérance de la progestérone. Les études établissent l'implication d'Akt dans la prolifération des cellules de la granulosa, dans l'augmentation de la taille de l'ovocyte et dans la synthèse des stéroïdes ovariens. Par conséquent, les isoformes d'Akt sont impliquées dans les fonctions dévolues aux structures du parenchyme ovarien (4, 5). En effet, Chen *et al.* ont montré dans une étude *in vitro* avec les cellules de la granulosa bovine que l'activation d'Akt par le brain-derived neurotrophic factor (BDNF) jouait un rôle dans l'initiation de la synthèse de la progestérone, outre ses effets connus sur la prolifération (131). Dans cette même étude, les résultats montrent que l'activation d'Akt n'affecte pas la synthèse d'E₂. Cependant, une autre étude réalisée également *in vitro* par Li *et al.*, mais avec les cellules de la granulosa porcine, a montré que l'activation d'Akt par un flavonoïde abondamment retrouvé dans les fruits, l'isorhamnetine, entraînait une augmentation de la biosynthèse d'E₂ (132). En ce qui concerne les androgènes, Ortega *et al.* (133) ont montré, dans une étude *in vitro* avec les cellules de la thèque des rats, que le resvératrol entraînait la

réduction de la synthèse des androgènes. Cette action de resvératrol passe par l'inhibition d'Akt. Ces résultats montrent l'importance d'Akt dans ses actions au niveau ovarien, et poussent davantage à investiguer les mécanismes associés à ce pléomorphisme d'effets d'Akt. Les trois isoformes d'Akt sont exprimées dans les follicules de toutes les catégories. Au sein du follicule, les trois isoformes d'Akt sont présentes au niveau de la granulosa et dans l'ovocyte. Akt3 est l'isoforme la plus faiblement exprimée dans ces cellules. Seulement Akt1 et 2 sont présentes au niveau de la thèque. Nos résultats suggèrent ainsi l'implication des trois isoformes d'Akt dans la synthèse des œstrogènes, dans le développement folliculaire et la croissance ovocytaire, vu leur présence dans les cellules de la granulosa et l'ovocyte. Quant à la synthèse des androgènes, nos résultats suggèrent l'implication d'Akt1 et 2 seulement. Nos résultats concernant Akt3 sont en accord avec les conclusions de différentes études réalisées antérieurement par d'autres chercheurs (118, 126). En effet, Tschopp *et al.* ont observé que chez la souris, Akt3 était faiblement exprimé dans certains organes, dont l'ovaire (76). En plus de son usuel faible niveau d'expression décrit plus haut, nos résultats montrent qu'Akt3 est absent en D dans les cellules de la granulosa des follicules primordiaux, primaires et secondaires. Cette absence d'Akt3 dans les petits follicules nous semble en lien avec une éventuelle régulation d'Akt3 par la progestérone qui est l'hormone prépondérante en D. En effet, selon certains chercheurs, l'expression des récepteurs à la progestérone (PR), surtout PR A, dans ces catégories de follicules est controversée (134). De ce fait, notre hypothèse est la suivante : comme la progestérone n'agit pas sur les petits follicules, ceci peut conduire à la chute d'expression d'Akt3. En ce qui concerne l'expression d'Akt au niveau du corps jaune, nos résultats ont montré la présence des trois isoformes d'Akt dans cette structure. Chez l'humain également, Akt est présent dans les corps jaunes. En effet, Goto *et al.* ont observé l'expression d'Akt dans les cellules de la granulosa lutéinisées (129). La présence d'Akt dans les corps jaunes ne paraît cependant pas un phénomène ubiquitaire. En effet, une étude réalisée par Meng *et al.* avec le porc montre l'absence d'Akt dans les corps jaunes (128). En comparaison avec nos résultats, cette absence d'expression d'Akt au niveau du corps jaune dans cette étude de Meng *et al.* pousserait à investiguer de façon plus approfondie la spécificité d'expression d'Akt selon les espèces. Pris ensemble, nos résultats appuient également la notion de la variation de l'abondance et de la spécificité d'expression d'Akt selon le type cellulaire comme publié précédemment (76, 78, 79).

Toutefois, bien qu'étant issus des études observationnelles, nos résultats suggèrent un lien entre les isoformes d'Akt et les fonctions dévolues aux différents compartiments et structures ovariens. Pour Akt3, certains rôles émergent comme nous avons montré dans nos résultats, et nous allons le discuter plus loin. Les liens suggérés par nos résultats entre les fonctions des isoformes d'Akt dans ces différents compartiments et structures ovariens doivent être confirmés par des études plus approfondies. Il sera ainsi possible de disséquer les rôles de chaque isoforme dans ces différents processus. Une meilleure compréhension des fonctions des isoformes d'Akt permettrait d'envisager des avenues thérapeutiques intéressantes. Celles-ci concerneront des pathologies qui impliquent la perturbation des différents stéroïdes ovariens comme développés en introduction, par exemple dans les cas du SOPK, d'IOP et d'endométriose. Plus spécifiquement, il devient nécessaire d'étudier les rôles des trois isoformes d'Akt dans les cellules de la granulosa, le corps jaune, et des isoformes 1 et 2 dans la thèque et aussi dans le stroma. En développant de nouveaux modèles d'étude, soit des KO conditionnel ou de *Knock-down* en usant des technologies existantes comme celle de l'ARN interférant, il sera possible de disséquer les rôles spécifiques de chaque isoforme et aussi de mieux comprendre leurs fonctions redondantes ou uniques. Avec de tels modèles qui permettent d'inhiber les isoformes d'Akt de façon contrôlée, il sera possible d'étudier entre autres l'effet de leur activation sur la production de différents stéroïdes. Étant donné certaines différences observées selon les espèces animales utilisées, il faudra répéter les expériences dans différentes espèces avec les mêmes modèles. Ce qui permettra d'étudier la spécificité d'expression et des voies de signalisation cellulaire liées aux espèces pour certaines protéines comme Akt, ou pour leurs isoformes. De tels modèles permettront également l'étude de l'effet compensatoire de chaque isoforme d'Akt en l'absence de ses autres isoformes.

4.2 La localisation, l'intensité et l'activation des isoformes d'Akt varient de manière isoforme-spécifique au cours du cycle œstral

Plusieurs études ont montré que les isoformes d'Akt ont des localisations cellulaires spécifiques. De plus, il est aussi reconnu que cette localisation d'Akt varie en fonction de leur activation pour affecter des cibles bien déterminées (65, 125). En effet, Santi *et al.* ont trouvé, dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses et de cellules non cancéreuses du sein et du col

utérin, qu'Akt1 et 2 étaient principalement localisés de façon diffuse dans le cytoplasme. Akt2 montrait en plus une localisation périnucléaire. Akt3 avait une localisation principalement nucléaire (125). Cependant, dans cette même étude, les chercheurs ont montré que dans les cellules embryonnaires rénales (HEK-293), Akt1 était localisé dans toute la cellule (cytoplasme et noyau), alors qu'Akt2 et 3 étaient principalement nucléaires. Nos résultats sont en accord avec ces observations. Nos résultats révèlent en plus des variations de localisations des isoformes d'Akt au sein d'un même type cellulaire tout au long du cycle œstral, avec parfois des spécificités et des similarités. En effet, dans les cellules de la granulosa par exemple, Akt1 gardait une localisation nucléaire et cytoplasmique tout le long du cycle œstral. Tandis qu'Akt2, qui en P montrait une localisation cytoplasmique basale et quelque peu membranaire, présentait une localisation cytoplasmique et périnucléaire dans les autres phases du cycle. Akt3, quant à lui, démontrait une localisation cytoplasmique dans 3 phases du cycle, et une expression cytoplasmique et nucléaire en E dans certains îlots des cellules. Ces différentes localisations des isoformes d'Akt sont probablement liées aux variations hormonales spécifiques à chaque phase du cycle œstral. En effet, Kayisli *et al.* (135) ont démontré aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* que l'E₂ augmentait la fraction nucléaire de phospho-Akt dans les cellules endométriales humaines. Une observation similaire de l'effet d'E₂ sur la localisation nucléaire d'Akt a été faite *in vivo* sur les cardiomyocytes humains et murins par Camper-Kirby *et al.* (136). Il est connu que les hormones FSH, E₂ et LH sont capables d'induire l'activation d'Akt; ce qui résulte en la translocation nucléaire d'Akt (91, 114, 137). Au regard de ces résultats, dans l'ovaire, la localisation nucléaire d'Akt notamment en P pourrait être liée à son activation par des hormones qui agissent durant cette phase, soit l'E₂, la FSH. En E, le pic de LH pourrait jouer également un rôle sur la localisation d'Akt. Les différences dans la localisation cellulaire des isoformes d'Akt sont certainement importantes quant à leur spécificité fonctionnelle. En effet, comme relevé en introduction, la localisation d'une protéine joue un rôle important dans sa fonction (65). Il est clair que ces changements de localisation, notamment pour Akt2 et 3, leur confèrent des rôles variés au travers du cycle œstral. En ce qui concerne Akt1, sa double localisation à travers tout le cycle œstral indique qu'il joue un rôle dans la signalisation au niveau du cytoplasme et du noyau au cours du cycle œstral. Cependant, en raison des modifications hormonales qui ont lieu au cours du cycle œstral, les fonctions qu'Akt2 joue au niveau du cytoplasme et au niveau du noyau peuvent varier.

Nos études biochimiques ont montré que l'expression des isoformes d'Akt varie au cours du cycle œstral. Akt1 et 3 avaient le même patron de variation d'intensité tout au long du cycle œstral, bien que le résultat ne fût significatif que pour Akt3. En effet, Akt1 et 3 montraient une expression plus élevée en P et E comparativement en M et D. Leur pic d'expression était observé en E. Akt2 montrait une expression forte en P et E, puis celle-ci décroissait en M avant de remonter significativement en D. Plus intéressant encore, les niveaux d'activation d'Akt1 et Akt2 étaient également différents le long du cycle œstral. En effet, Akt1 était plus phosphorylé en P, atteignait le pic en E comparativement en M et D bien que ces différences n'étaient pas significatives. Pour Akt2, son niveau d'activation élevée était observé en E et D; de faibles variations d'activation étaient observées entre les autres phases du cycle œstral. Comme dans le cas de la localisation cellulaire, nos résultats concernant l'expression et l'activation des isoformes d'Akt laissent suggérer que dans chaque phase du cycle, elles jouent des rôles particuliers. Elles régulent ainsi de façon spécifique différents événements cellulaires. Les isoformes d'Akt ne montrent pas toujours la même coordination entre leur expression et activation dans les différentes phases du cycle œstral, notamment pour Akt2. Comme mentionné précédemment, des hormones peuvent activer ou inhiber Akt, et de ce fait, modifier leur niveau d'activation, de localisation et/ou d'expression. Par exemple, en P et E, avec l'action de la FSH et de l'E₂, Akt est phosphorylé, et de ce fait activé. Une fois activé, Akt migre dans le noyau et induit la prolifération des cellules de la granulosa ainsi que la synthèse hormonale (114). En E, l'effet bien connu du pic de LH sur l'activation d'Akt vient s'ajouter à ceux de deux précédentes hormones (137). Ce qui corrobore les résultats sur la localisation nucléaire d'Akt1 en P et E, d'Akt3 ainsi que la localisation périnucléaire d'Akt2 en E. En M et D, avec la décroissance des œstrogènes, le niveau de phosphorylation d'Akt diminue aussi. Malgré cette baisse de phosphorylation, Akt1 et 2 conservent leur patron de localisation. Ce qui peut s'expliquer par le fait que ces baisses de niveau de phosphorylation d'Akt ne sont pas significatives pour induire des modifications détectables. Cependant, ces modifications, quoique faibles, ont probablement de conséquences fonctionnelles. Dans ces deux phases du cycle œstral (M et D), Akt3 a essentiellement une localisation cytoplasmique probablement suite à la baisse de phosphorylation. La différence de coordination entre le niveau d'expression et de phosphorylation d'Akt a également été observée par d'autres auteurs sur différentes lignées cellulaires, dont certaines étaient ovariennes (138). En effet, Wang *et al.* dans leur étude sur

certaines lignées cellulaires ovariennes avaient observé que le niveau d'expression d'Akt2 y était élevé, tandis que celui de sa phosphorylation était faible (138). Ces chercheurs ont suggéré plusieurs mécanismes qui peuvent expliquer cette discordance entre l'expression et l'activation d'une protéine. Par exemple, l'activité des kinases en amont de cette protéine pourrait entraîner son expression à un certain moment dans la cellule et sa phosphorylation pourrait avoir lieu dans un second temps. À la suite de sa phosphorylation, de sa translocation pour jouer son rôle au niveau de substrats spécifiques, les phosphatases procèdent à la déphosphorylation de la protéine. En ce qui concerne les isoformes d'Akt, la spécificité de la fonction peut, en effet, être en partie sous le contrôle des phosphatases. Puisque la déphosphorylation d'Akt2 et 3 apparaît être réalisée par PHLPP1, tandis que celle d'Akt1 et 3, par PHLPP2. Pour ce qui est de la spécificité de substrats, certaines protéines comme AS160 et myosine 5a sont préférentiellement régulées par Akt2 dans les adipocytes (139). Ces mécanismes doivent être étudiés afin de comprendre le lien entre la présence de différentes hormones (androgènes, œstrogènes et progestérone) et l'activité des isoformes d'Akt. La compréhension de ce lien pourra mettre en lumière des actions sélectives des différentes hormones dans les phases du cycle œstral. D'une meilleure compréhension de la relation entre les différentes hormones, l'activité des isoformes d'Akt et une connaissance de leurs cibles, il pourrait être possible d'établir des cibles thérapeutiques spécifiques. Par exemple, pour certaines maladies où ces hormones sont perturbées comme dans le SOPK qui est caractérisé par une augmentation de pulses de LH et l'hyperandrogénie, il serait possible d'identifier les isoformes d'Akt impliquées et de proposer une thérapie ciblée (110). Les résultats concernant l'action de ces hormones, notamment des stéroïdes ovariens, sur l'expression et l'activation des isoformes d'Akt dans un modèle moins complexe de culture cellulaire sont discutés dans un autre point plus loin.

Au-delà des spécificités fonctionnelles, la similarité du patron d'expression d'Akt1 et 3 durant le cycle œstral, et celle de l'activation d'Akt1 et 2 en E supportent l'hypothèse de leurs redondances fonctionnelles. Or, l'expression et l'activation des isoformes d'Akt sont en lien avec les différents événements cellulaires et biologiques au sein de l'ovaire. Ainsi, en se basant sur nos résultats qui concernent ces aspects, nous pouvons suggérer que les rôles d'Akt1 et 3 dans la survie, la prolifération, la croissance et la différenciation des cellules folliculaires soient plus investigués. L'accroissement du niveau d'expression de ces trois isoformes, et surtout

l'accroissement de l'activation d'Akt1 et 2 en E suggèrent que leur participation est requise dans l'ovulation et la formation du corps jaune. L'activation d'Akt2 en D plaiderait en faveur de son rôle métabolique et dans la différenciation cellulaire, nécessaires dans le fonctionnement et le maintien du corps jaune.

Nous avons trouvé utile, avant de clore ce point, de relever le fait que les phases du cycle œstral se déroulent dans un temps court (5 jours). Cela entraîne parfois des intrications entre certaines phases au cours d'un même jour. Ce fait peut rendre complexe l'interprétation de certains résultats comme les variations des niveaux d'expression ou d'activation entre les différentes phases. En effet, ces variations parfois petites d'une phase à l'autre sur le plan de la quantification, peuvent ne pas correspondre à un impact fonctionnel réel. En plus, ces variations peuvent être différentes selon les stades folliculaires. Dans la dynamique folliculaire, comme expliquée dans l'introduction, Akt joue un rôle dans toutes les étapes (de l'activation de la folliculogénèse jusqu'à l'ovulation et la formation du corps jaune). Ainsi, la détermination des variations des niveaux d'expression, d'activation, et de la fonction des isoformes d'Akt dans les différents stades folliculaires devrait être étudié. Ce qui permettrait de déterminer une piste intéressante pour voir à quels stades une isoforme est importante pour la dynamique folliculaire, la différenciation des cellules de la granulosa et la synthèse hormonale. Une telle étude nécessiterait des modèles de culture de follicules entiers qui sont disponibles, bien que complexes (140). En effet, l'âge de l'animal donneur, le stade du follicule à étudier, la composition du milieu ainsi que les objectifs à atteindre sont des paramètres à prendre en compte dans le développement d'un tel modèle (140).

4.3 La déficience d'Akt3 impacte la réserve ovarienne et la dynamique folliculaire

Akt3 est l'isoforme la moins exprimée dans plusieurs organes et de ce fait, le plus souvent la moins étudiée comme nous l'avons mentionné ci-dessus. Les données établissent qu'Akt en général est impliqué dans la folliculogénèse. Ces études établissent aussi les rôles spécifiques d'Akt1 et d'Akt2 au niveau de l'ovaire en particulier, et de la reproduction en général. En effet, comme mentionné en introduction, l'élimination d'Akt1 entraîne, entre autres, une diminution des follicules primordiaux et une subfertilité (118). L'élimination d'Akt2 résulte en une

apparition de kystes ovariens sévères chez les souris âgées, et en une augmentation de la sévérité de la formation du SOPK chez les souris jeunes (141). Les données issues de doubles KO des isoformes d'Akt, dont les souris sont viables comme le double KO d'Akt2 et 3 révèlent un impact sur les ovaires. En effet, les souris déficientes concomitamment en Akt2 et 3 présentent une réduction de la taille de l'ovaire et de la taille de leur portée (79). De plus en plus, dans l'ovaire certains rôles pour Akt3 émergent. En effet, il a été observé qu'Akt3 joue un rôle dans la progression du cancer ovarien (81) comme nous l'avons relevé plus haut dans cette thèse. Dans le cancer, l'ovaire augmente de volume, devient hypervascularisé; sa surface devient irrégulière à cause de multiples excroissances dues à une multiplication désordonnée de cellules cancéreuses. Akt3 inhiberait l'expansion du cancer ovarien (81). L'utilisation des souris Akt3 déficientes (Akt3^{-/-}) nous a permis de montrer, qu'à l'âge de 45 jours, la RO est significativement diminuée chez les souris Akt3^{-/-} comparativement aux souris de type sauvage. Nous avons observé également une augmentation significative des follicules secondaires chez les souris Akt3^{-/-}. Ceci expliquerait l'effet corollaire que la délétion d'Akt3 conduise à l'activation de la croissance folliculaire, et ainsi à la réduction de la RO et l'augmentation du nombre de follicules secondaires. Cependant, chez les souris âgées de 100 jours, ces différences n'étaient plus significatives bien que les mêmes tendances étaient conservées. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que dans les ovaires de ces souris Akt3^{-/-} plusieurs follicules primaires sont entrés en croissance et que la RO n'en produit plus assez; ou par le fait que cette action d'Akt3 s'estompe progressivement avec l'augmentation de l'âge. Ces résultats suggèrent qu'Akt3 exercerait un frein à la croissance folliculaire du pool de la réserve vers le stade avancé. L'action de frein sur la croissance folliculaire que nous attribuons à Akt3 au sein de l'ovaire ne serait pas isolée ou limitée à la folliculogénèse. En effet, dans une étude *in vivo* sur les souris, Linnerth *et al.* (81) avaient démontré que l'inhibition d'Akt3 résultait en une augmentation de la croissance du cancer ovarien. Cette observation révèle ainsi qu'Akt3 exercerait une inhibition de la croissance des cellules tumorales. Ces différents résultats révèlent que malgré sa faible expression dans l'ovaire et probablement dans d'autres organes, Akt3 joue d'importants rôles physiologiques et serait impliqué dans le développement des pathologies. Plusieurs autres études sont nécessaires pour améliorer notre compréhension sur les mécanismes par lesquels Akt3 agit dans ces processus. En effet, notre étude étant de nature descriptive, corrélative et non causative, appelle à des études complémentaires, notamment des études de surexpression d'Akt3 dans l'ovaire afin

d'observer le phénotype qui en découlerait. Nonobstant cette observation de limitation, cela n'altère pas à nos yeux les conclusions de la présente étude qui vient ressortir un rôle potentiel d'Akt3.

4.4 L'effet de la déficience d'Akt3 sur l'ovulation

Le développement folliculaire a pour finalité d'aboutir à une ovulation. Après celle-ci, la formation du corps jaune est mise en place et en constitue le témoin. Ce corps jaune est un organe important pour le développement d'une éventuelle grossesse, étant donné sa fonction endocrine avec la sécrétion de la progestérone (hormone nécessaire au maintien de la grossesse) (42, 142). Nous avons trouvé que les souris Akt3^{-/-} présentaient une réduction significative du nombre de corps jaune comparativement aux souris de type sauvage particulièrement en M et D. Ces résultats laissent suggérer un possible rôle d'Akt3 dans l'ovulation et la formation du corps jaune. En effet, la perturbation de l'ovulation résulte en une diminution du processus de la formation du corps jaune dans certains modèles animaux comme celui déficient en Nuclear receptor subfamily 5 group A member 2 (NR5A2) (42). Comme relevé plus haut dans la section résultats, le nombre des souriceaux est également réduit chez les souris Akt3^{-/-} comparativement aux souris de type sauvage. Bien que ce résultat était non significatif, cette tendance supporte notre interprétation de l'impact d'Akt3 sur l'ovulation. En effet, il est connu dans la littérature que le nombre de souriceaux dans une portée est en corrélation avec le nombre de follicules qui ont ovulé. Ainsi, toute anomalie d'ovulation aboutit à une subfertilité ou à une infertilité comme en cas du SOPK (110). La non-significativité des différences des corps jaunes en P et en E nous semble s'expliquer par le fait que les corps jaunes sont des structures qui involuent avec le temps. Comme le P et l'E sont des phases éloignées de l'ovulation, et au fur et à mesure des cycles, les corps jaunes régressent et disparaissent. Ainsi, les différences entre les deux groupes peuvent s'atténuer. Elle peut également s'expliquer par la petite taille de notre échantillon qui n'a pas pu ressortir la significativité de ces différences.

En mettant en perspective ce résultat sur l'ovulation et le nombre des corps jaunes avec ceux de la RO et du nombre de follicules, une contradiction apparente peut sembler s'observer. En effet, la logique aurait voulu que l'augmentation du nombre de follicules secondaires résultât

conséquemment en une augmentation du nombre de corps jaunes. En réalité, cette corrélation n'est pas aussi directe et simple tel que relevé dans une revue de la littérature publiée par Gershon et Dekel (143). En effet, certains chercheurs ont observé l'absence d'ovulation chez certaines femmes infertiles malgré une folliculogénèse normale (144). Quoique la folliculogénèse ait pour finalité l'obtention d'un follicule mature prompt à ovuler, les mécanismes hormonaux et moléculaires qui régulent la folliculogénèse et l'ovulation sont différents (143). Comme développé dans la partie introductive de cette thèse, la folliculogénèse implique des hormones comme la FSH, les œstrogènes qui réalisent leur signalisation cellulaire par des voies moléculaires appropriées (114). Puis, l'ovulation et la formation des corps jaunes sont consécutives au pic de LH (137). Cette disparité entre la dynamique folliculaire et l'ovulation ainsi que la formation du corps jaune est aussi remarquable et frappante en clinique, notamment comme on le note en cas du SOPK. Dans cette pathologie des follicules dont la maturation est bloquée au stade antral s'accumulent anormalement. Ce dysfonctionnement aboutit ainsi à des anovulations chroniques (60). Le LUF syndrome (Luteinized unruptured follicle) ou le syndrome du follicule lutéinisé non rompu est une autre pathologie anovulatoire qui montre cette disparité. Celle-ci fait voir l'implication particulière au niveau de l'ovulation des protéines comme la cyclooxygénase 2 et le granulocyte colony-stimulating factor 3 (144). Dans cette pathologie, même si le follicule est arrivé au stade mature, l'ovulation ne se produit pas. Le follicule s'accroît excessivement, ce qui va aboutir à l'infertilité si le phénomène est répétitif à travers des cycles menstruels (145). Ce qui est intéressant est que les molécules aussi bien centrales que locales incriminées dans la survenue de ces pathologies anovulatoires comme la LH, les œstrogènes, les androgènes, ou des prostaglandines ont un lien avec la voie de signalisation d'Akt comme décrit en introduction.

4.5 La déficience en Akt3 entraine la diminution du volume ovarien

Des études antérieures déterminent le rôle d'Akt3 dans la régulation du volume du cerveau. En effet, Tschopp *et al.* (76) ont rapporté que les souris Akt3^{-/-} présentaient une réduction de la taille du cerveau. Dans notre étude, nous avons observé que les souris Akt3^{-/-} présentent une réduction significative du volume ovarien tout le long du cycle œstral. Cette observation révèle l'implication d'Akt3 dans la régulation du volume ovarien.

En plus, avec les données de l'étude de Tschopp *et al.*, elle suggère que cette fonction d'Akt3 peut concerner d'autres organes. Pour l'ovaire, certaines données de la littérature appuient cette observation de l'implication de la voie PI3K/Akt dans la régulation de la taille de l'ovaire. Une fois de plus, ces données de la littérature restent d'ordre général. En effet, Zhao *et al.* (146) ont rapporté sur le rat, dans un modèle *in vivo* du SOPK, la réduction du volume ovarien induit par Heqi san, un médicament traditionnel chinois ainsi que par la metformine, un antidiabétique oral. Ils ont démontré que cette réduction du volume ovarien passait par la voie PI3K/Akt, notamment en altérant l'activation ou l'expression de diverses protéines comme Akt, GSK3 β et PTEN. Notre étude vient dévoiler l'implication spécifique d'Akt3 dans la régulation du volume ovarien dans le contexte physiologique. Ce rôle paraît redondant avec celui que joue Akt2 comme nous l'avons relevé dans le point précédent avec l'étude sur les souris double KO d'Akt2 et 3. Notre étude ouvre en même temps un questionnement sur l'effet réel du KO d'Akt2 sur le volume ovarien, et elle pousse comme nous le suggérons dans les perspectives à étudier cette question. Notre observation pousse à investiguer davantage le rôle d'Akt3 dans divers contextes pathologiques où le volume ovarien est perturbé comme en cas du SOPK. En plus, la réduction du volume ovarien induite par Akt3 peut être mise sous le compte du processus du VO. En effet, en mettant en perspective l'impact de l'élimination d'Akt3 sur la RO et le volume ovarien qui sont de marqueurs du VO, nous pouvons en comprendre le lien. Car, il est établi qu'avec la perte folliculaire et la survenue du VO, le volume ovarien aussi diminue (28,29).

4.6 Les isoformes d'Akt dans les cellules de la granulosa ovarienne et leur régulation par les stéroïdes ovariens

Les cellules de la granulosa sont très importantes pour le destin folliculaire. Leur participation dans la physiologie de la RO et la dynamique folliculaire nécessite la participation de plusieurs voies de signalisation cellulaire, dont celle d'Akt. Cette dernière en occupe un rôle principal (8, 145). Ces cellules de la granulosa constituent une cible privilégiée de plusieurs substances endogènes et exogènes qui ont un impact sur la RO et la dynamique folliculaire et par le fait même, sur la fertilité féminine (8). Parmi les substances qui agissent sur les cellules de la granulosa, les androgènes et les œstrogènes sont abondamment utilisés dans la thérapeutique, mais leurs effets sur les isoformes d'Akt ne sont pas clairement connus.

En revanche, il est établi que les isoformes d'Akt peuvent jouer des rôles spécifiques, voire opposés. Les effets de ces divers traitements se manifestent sur diverses voies de signalisation. Ainsi, nous avons étudié l'influence des deux stéroïdes ovariens sur les isoformes d'Akt *in vitro* en utilisant les cellules de la granulosa. Les résultats issus de ces expériences ont montré d'abord que les isoformes d'Akt sont différemment exprimées et localisées au sein des cellules de la granulosa ovarienne. Chaque isoforme possède une localisation spécifique en plus de certaines similarités. En effet, Akt1 a montré une nette double localisation nucléaire et cytoplasmique tandis qu'Akt2 une localisation plus cytoplasmique; pour Akt3, la localisation est en prédominance cytoplasmique, et quelque peu nucléaire. Ces différentes localisations des isoformes d'Akt sont en accord avec le fait que les isoformes d'Akt jouent des rôles spécifiques et aussi redondants. Il est établi que la localisation d'une protéine favorise l'accès à des cibles et détermine ainsi son action au sein de la cellule comme nous l'avons discuté précédemment. Nos résultats montrent qu'Akt3 est l'isoforme la moins exprimée au sein des cellules de la granulosa comme précédemment relevé dans l'ovaire entier dans notre étude *in vivo* et par d'autres chercheurs (126, 147,148). Concernant la localisation de ces isoformes, les résultats *in vitro* sont en majeure partie en accord avec les constatations de ceux rapportés précédemment *in vivo* dans notre thèse. Les petites différences notamment concernant la localisation d'Akt2 nous semblent liées probablement à l'influence d'interactions moléculaires complexes qui existent *in vivo*, et agissent sur Akt.

Les tendances qui se dégagent de ces expériences montrent que la DHT et l'E₂ régulent de façon opposée les isoformes d'Akt, bien que les effets observés sur l'expression protéique ne sont pas majeurs. En effet, nous avons observé que le traitement avec l'E₂ tend à augmenter l'intensité de l'expression d'Akt1 selon nos résultats de WB et des ICC. Cependant, en se basant sur les ICC, le traitement avec l'E₂ tend à diminuer l'expression d'Akt2. Ce traitement n'a pas d'effet apparent sur l'expression d'Akt3. Dans un cadre thérapeutique d'infertilité chez les patientes qui souffrent de troubles de la folliculogénèse et de l'ovulation, ce résultat paraît intéressant dans le développement des médicaments comme les stimulateurs d'Akt. En effet, des études ont montré que l'E₂ induit la croissance folliculaire par la prolifération des cellules de la granulosa (149). Les résultats de notre étude suggèreraient un rôle prépondérant pour Akt1 dans la croissance folliculaire que peut induire l'E₂. Ce qui pousserait à cibler plus Akt1 dans les

stratégies thérapeutiques pour les pathologies qui ont lien avec l'E₂. Les différentes thérapies à base de stimulateurs d'Akt ne sont pas utilisées en clinique en raison de leur manque de spécificité (115). Il en est également le cas des inhibiteurs de la voie PI3K/Akt. Ils ont été proposés dans le traitement de beaucoup de pathologies gynécologiques, dont les cancers endométriaux et mammaires, voire comme cibles thérapeutiques dans l'endométriose et le myome utérin (150-154). Par exemple, l'endométriose (localisation ectopique de l'endomètre) se caractérise par une augmentation de la phosphorylation d'Akt. Celle-ci aboutit à la promotion de la prolifération, à l'inhibition de l'apoptose ainsi qu'à la réduction de l'expression de PR des cellules endométriosiques. L'utilisation de MK 2206, un inhibiteur d'Akt, comme traitement dans l'endométriose, augmente l'expression des PR, et réduit de ce fait la viabilité de cellules endométriosiques (153). Ces dernières années, des efforts sont constamment faits pour améliorer la spécificité de ces médicaments comme en témoignent plusieurs essais thérapeutiques qui sont en cours de réalisation (150-154). Notre étude apporte ainsi une contribution dans ce sens en suggérant des relations potentielles entre les hormones et les isoformes d'Akt. Contrairement au traitement avec l'E₂, le traitement avec la DHT tendait à baisser le niveau d'expression d'Akt1 et Akt3 selon nos résultats de WB, et à augmenter celui d'Akt2. Nos résultats sont en partie en accord avec ceux d'une étude menée par Nekoonam *et al.* en 2016 (155). Ces chercheurs ont observé une élévation de l'expression d'ARNm d'Akt1 et Akt2 au sein des cellules de la granulosa lutéinisées des patientes hyperandrogéniques atteintes du SOPK. Ils ont ainsi établi une corrélation entre l'hyperandrogénie et l'élévation de ces deux isoformes d'Akt. Ce qui paraît intéressant est la corrélation entre Akt2 et l'hyperandrogénie qui corrobore notre observation. La différence entre notre résultat d'avec celui de l'étude de Nekoonam *et al.* pourrait provenir du modèle expérimental utilisé. En effet, dans leur étude, Nekoonam *et al.* ont utilisé les cellules de la granulosa lutéinisées qui sont en fait en pleine transformation. En effet, 12 à 24 heures déjà après le pic de LH ou l'induction de l'ovulation avec hCG, les cellules de la granulosa arrêtent leur prolifération. Elles s'hypertrophient, et commencent à sécréter de façon prédominante de la progestérone ainsi que des protéases (144). Ce processus résulte en des modifications partielles et progressives de l'expression des différentes protéines (par exemple : Cyclooxygénase 2, cytokines, Star, Cyp 11A1) impliquées dans la synthèse de ces molécules ou dans cette transformation (144). Un autre fait observé dans notre étude est que le niveau protéique d'Akt total n'augmente pas avec ces deux traitements. Mais nous observons comme une régulation

inverse des isoformes Akt1 et Akt2 par ces deux stéroïdes ovariens alors qu'Akt3 est moins régulé par l'E₂ que par la DHT. En effet, comme décrit ci-haut, le traitement avec la DHT a tendance à baisser l'expression d'Akt1, mais à augmenter celle d'Akt2 selon les résultats des WB et des ICC. En revanche, le traitement avec l'E₂ tend à augmenter l'expression d'Akt1. Ceci laisse penser que les isoformes Akt1 et Akt2 joueraient des rôles opposés au sein des cellules de la granulosa ovarienne, et pourraient être différemment ciblées pour des objectifs précis.

De façon intéressante, nos résultats ont montré que les effets de ces deux stéroïdes ovariens se manifestent beaucoup plus et de façon significative sur la phosphorylation des isoformes d'Akt. Nos résultats ressortent ainsi le fait que la phosphorylation des isoformes d'Akt revêt une importance capitale plus que leur expression protéique seule. Ce constat est vrai, notamment en ce qui concerne leur régulation par les stéroïdes ovariens au sein de cellules de la granulosa. En effet, nous avons démontré que la DHT réduit sensiblement le niveau de phosphorylation des deux isoformes d'Akt étudiées (Akt1 et 2) bien que la différence n'ait été significative que pour pAkt1. En revanche, l'E₂ augmente sensiblement le niveau de phosphorylation de ces deux isoformes bien que cela n'ait été significatif que pour pAkt2. Il ressort de ces observations que concernant l'activation des isoformes d'Akt, l'action de ces deux stéroïdes ovariens nous paraît non sélective. En ce qui concerne l'activation d'Akt en général par ces deux stéroïdes, nos résultats corroborent ceux rapportés par de précédentes études (114, 156, 157). Notre étude apporte une nouveauté en précisant la non-spécificité de cette activation ou inhibition d'Akt par les stéroïdes ovariens. En revanche, une étude réalisée par Nekoonam avait montré un niveau élevé de phosphorylation d'Akt dans les cellules de la granulosa lutéinisées humaines chez les patientes qui souffrent du SOPK après stimulation avec la GnRH (155). Les patientes qui souffrent du SOPK sont souvent hyperandrogéniques, et par conséquent, elles devraient avoir un niveau bas de phosphorylation dans les cellules de la granulosa. Nous pensons que dans l'étude de Nekoonam, le niveau élevé de phosphorylation d'Akt dans les cellules de la granulosa est attribuable à l'action de la GnRH qui est parvenue à renverser les effets de l'hyperandrogénie. La GnRH induit la libération de la FSH, et la FSH induit l'activation d'Akt afin de permettre la prolifération et la différenciation de cellules de la granulosa (114).

4.7 Régulation des isoformes d'Akt dans le vieillissement ovarien induit par le VCD

Le VO est un processus majeur dans la vie d'une femme. Il est normal quand il survient autour de la cinquantaine. Dans le cas de certaines pathologies comme l'IOP, le VO survient de façon précoce, soit avant l'âge de 40 ans (6). La survenue du VO précoce implique plusieurs voies de signalisation, dont celle d'Akt. Dans l'arsenal thérapeutique concernant la prise en charge de l'infertilité qui en découle, les molécules qui stimulent Akt occupent une place centrale dans l'élaboration de thérapies. Cependant, les molécules utilisées pour l'activation des isoformes d'Akt sont non isoformes-spécifiques; ce fait complique leur utilisation chez les patientes (6b). La famille des protéines Akt est composée des kinases versatiles qui possèdent plusieurs cibles moléculaires. Leurs implications dans les mécanismes qui sous-tendent le VO sont bien établies. Cependant, malgré ces connaissances, les rôles des isoformes d'Akt demeurent moins clarifiés. Pourtant, elles possèdent des spécificités sur le plan fonctionnel comme relevé tout le long de cette thèse.

Notre étude a établi que le VO s'accompagne d'une réduction de l'expression et de l'activation des isoformes d'Akt et de ses cibles. De plus, notre étude est la première à montrer *in vitro* que, à l'échelle protéique, l'expression des trois isoformes d'Akt est réduite bien que cette réponse ne soit significative que pour Akt1 et Akt2. Akt3 est aussi fortement réduit. Ainsi, sur le plan de l'expression protéique, nos résultats ne suggèrent pas une sélectivité de l'action du VCD sur les isoformes d'Akt. Partant de cette observation, nous pouvons suggérer que l'implication des isoformes d'Akt dans le VO ne soit pas spécifique. C'est-à-dire, les trois isoformes d'Akt seraient impliquées dans les mécanismes qui régulent la survenue du VO, car nous avons observé la réduction de leur expression. Nos résultats montrent également que la phosphorylation d'Akt1 et Akt2 est significativement réduite dans le groupe du VO comparativement au groupe contrôle. Bien que n'ayant étudié que la phosphorylation de ces deux isoformes par le fait de la non-disponibilité de l'anticorps spécifique pour celle d'Akt3, notre étude montre la non-sélectivité de l'action du VCD sur la phosphorylation d'Akt. Comme pour l'expression protéique, notre étude est la première à relever la non-spécificité de l'inactivation protéique des isoformes d'Akt dans le VO, du moins celui induit par le VCD. Conformément aux isoformes, le niveau d'expression d'Akt total est également réduit *in vitro*. Cependant, *in vivo*, ces protéines ne montrent pas de réduction évidente. Nous préférons discuter

cet aspect des résultats *in vivo* dans le point suivant. Contrairement à nos résultats, Keating *et al.* en travaillant sur des ovaires de rats *in vitro*, n'ont pas trouvé la réduction d'Akt total dans le groupe VCD en comparaison au groupe contrôle (158). Ces différences nous semblent possiblement être liées aux doses utilisées. En effet, dans leur étude, Keating *et al.* ont utilisé une dose inférieure à celle que nous avons utilisée soit 30 μM vs 60 μM . Prises ensemble, ces observations soulignent l'effet dose-dépendant du VCD sur la voie de signalisation PI3K/Akt. Ce constat lié à l'effet dose-dépendant du VCD a été aussi observé chez les rats *in vitro* par Devine *et al.* En effet, ils ont observé cette association avec la déplétion folliculaire et l'expression élevée de caspase 3 en immunofluorescence (158). Par ailleurs, nos résultats ont montré que le niveau de caspase-3 clivée en WB était élevé dans le groupe traitement, et que le VCD induirait la mort cellulaire par apoptose. Ces deux faits viennent appuyer nos résultats, car c'est en effet à des doses plus élevées que 30 μM que cette déplétion paraissait plus prononcée dans l'étude de Devine. En plus, une étude publiée récemment a montré qu'à des doses très faibles, de l'ordre de nanomolaire (10 nM), le VCD peut montrer des effets contraires sur le développement folliculaire (160). En effet, selon cette étude menée sur des souris *in vitro* et *in vivo*, à des doses faibles et pendant une courte exposition de 3 jours, le VCD induisait une augmentation des follicules primordiaux et petits primaires. En ce qui concerne la réduction de la phosphorylation, nos résultats sont en accord avec ceux publiés dans une revue de Kappeler *et al.* (161), bien qu'une fois de plus, ils n'ont pas étudié les isoformes d'Akt. En effet, ils ont trouvé dans un modèle *in vitro* la réduction de la phosphorylation d'Akt dès le deuxième jour du traitement. Cette réduction de la phosphorylation d'Akt précédait les modifications transcriptionnelles qui surviennent au J4. Tout en appuyant leurs résultats, notre étude apporte une lumière de plus en montrant la non-sélectivité de l'action du VCD sur la phosphorylation des isoformes d'Akt. Nos résultats laissent suggérer qu'au niveau protéique, l'implication de ces isoformes dans la survenue du VO ne soit pas isoforme spécifique. Notre étude a montré également que l'effet du VCD est non sélectif sur la diminution des isoformes d'Akt concernant leurs différentes localisations dans les structures ovariennes. Ce résultat appuie la suggestion selon laquelle l'action du VCD sur Akt est étendue, et la redondance possible des isoformes d'Akt dans la survenue du VO. En effet, les différentes fractions d'Akt sont nécessaires pour atteindre leurs cibles moléculaires pour les phosphoryler afin de les inhiber ou les activer. Ainsi, la fraction nucléaire d'Akt, après son activation est très importante pour phosphoryler les

cibles pro-apoptotiques d'Akt comme le Foxo3a. Ce dernier est ainsi délocalisé du noyau en vue de sa dégradation, l'empêchant ainsi de jouer son rôle (71). Aussi, cette fraction nucléaire d'Akt est reconnue stimuler la transcription de plusieurs molécules anti-apoptotiques (71, 73). Les autres fractions cytoplasmiques peuvent cibler d'autres protéines comme Bad, GSK3 β et mTOR (71) pour une action coordonnée et puissante du VCD.

À l'échelle transcriptionnelle, nous avons également observé la réduction notable des transcrits d'Akt1 et d'Akt3. Ces observations révèlent un fait très intéressant, que le VCD agirait sur les isoformes d'Akt probablement à deux niveaux, protéique et transcriptionnel. En effet, pour Akt2 au niveau transcriptionnel, l'effet du VCD est non visible pendant qu'au niveau protéique, il est notable. Cependant, pour Akt1 et 3, des effets aux niveaux protéique et transcriptionnel sont observés. Il en ressort que l'effet du VCD est sélectif sur la transcription des gènes des isoformes d'Akt. Ces résultats suggèrent que le VCD aurait une action directe sur la transcription des gènes de certaines isoformes (Akt1 et 3). Nos résultats sont en accord avec ceux de Keating *et al.* (158) qui ont trouvé également la réduction de l'ARNm d'Akt1 dans le groupe VCD au J4 du traitement *in vitro* dans les ovaires des rats. Cependant, dans leur étude, ils n'ont pas étudié les autres isoformes d'Akt. Notre étude est la première à investiguer toutes les isoformes d'Akt au niveau transcriptionnel dans un tel modèle du VO. Ces trouvailles nécessiteront des études plus approfondies dans le but de disséquer la part de l'effet à ces deux échelles pour Akt1 et Akt3, notamment en étudiant l'implication du protéasome. En effet, nos résultats, tout en étant clairs, viennent soulever quelques questions, dont celle de la compréhension de l'action du VCD sur les disparités entre le niveau protéique et transcriptionnel des isoformes d'Akt. Un autre argument qui pousse à étudier cette piste du protéasome est la baisse concomitante des formes phosphorylées et non phosphorylées des isoformes d'Akt et de leurs cibles. Aussi, il faudra disséquer l'implication du protéasome ou des miARN dans la réduction des isoformes d'Akt, essentiellement pour Akt2. Ensuite, il faut chercher à éclairer le mécanisme qui suggère la régulation transcriptionnelle du VCD. Il est connu que la réduction du niveau protéique d'une isoforme quand le niveau de son ARNm est normal peut être due à sa dégradation par le protéasome ou à l'inhibition de sa traduction par les miARN. Concernant le protéasome, il sera par exemple nécessaire d'utiliser en préincubation dans le milieu de culture des inhibiteurs de leur activité. Cela permettra de voir l'impact d'une telle action sur l'effet du VCD

sur les isoformes d'Akt au niveau de l'expression protéique. Pour l'autre piste à étudier, celle des miARN, il est connu que ceux-ci peuvent diminuer la traduction des ARNm sans nécessairement provoquer leur dégradation. Ce fait résulterait en une diminution de niveau protéique. Ces microARN (miARN) sont des petits ARN qui comprennent 21 à 25 nucléotides, sont retrouvés chez les eucaryotes, et sont non codants. Ils font partie de la famille des ARN interférents qui possèdent la capacité de réguler négativement la traduction d'ARN qui leur sont cibles, et de contrôler ainsi l'expression des gènes (162 -164). Nos résultats concernant Akt2 plaident en faveur de la vérification de ce deuxième mécanisme, car le taux d'ARNm est le même que dans le groupe sans traitement ou sans VO. Pour ce faire, les expériences d'hybridation *in situ* des ARNm et du Co-marquage des protéines nécessaires à l'assemblage du miARN et de son ARNm cible, comme le GW182 permettront d'atteindre cet objectif en confirmant leur localisation (162). D'autant plus que les données récentes de la littérature révèlent des profils intéressants qui montrent les miARN impliqués dans le VO dont les gènes cibles appartiennent à la voie PI3K/Akt (165). En effet, dans leur étude sur les souris, Schneider *et al.* ont trouvé l'existence des 5 tops miARN exprimés dans l'ovaire, et qui ciblaient les gènes impliqués dans la croissance cellulaire et l'apoptose. Ces miARN étaient différemment exprimés entre les souris qui présentent un VO et celles normales. Ce constat leur avait permis de conclure à l'implication possible de la gestion du VO par les miARN. Parmi ces miARN dont les rôles émergent dans la régulation de la survenue du VO, il y a miR-17, miR-20a, miR-92a et miR-145 (165).

4.8 Les cibles d'Akt dans le vieillissement ovarien et leur régulation par les stéroïdes ovariens

a) Les cibles moléculaires d'Akt dans le vieillissement ovarien induit par le VCD

Notre étude a montré la réduction *in vitro* de l'expression protéique et de la phosphorylation de 4 cibles d'Akt étudiées (Foxo3a, Bad, GSK3 β et mTOR) dans le groupe des ovaires en culture à la suite de l'administration du VCD. Notre étude confirme ce que d'autres chercheurs comme Keating *et al.* (158) ont trouvé en ce qui concerne l'activation d'Akt et de ses cibles. Ces résultats suggèrent aussi que l'action du VCD sur l'inactivation protéique des isoformes d'Akt est non sélective. De plus, l'action du VCD concernerait d'autres voies de signalisation confluentes impliquées dans la survie cellulaire, dont celle de MAPK comme l'a

suggéré Kappeler dans sa revue (161). En plus, en induisant la réduction des formes non phosphorylées des cibles et des isoformes d'Akt, le VCD conduit possiblement au moins en partie à la réduction de leurs formes phosphorylées. Ces constats suggèrent un effet potentiel du VCD sur la dégradation protéique dans la voie PI3K/Akt en plus de l'inactivation comme observé par d'autres chercheurs et relevé précédemment.

b) Les effets du VCD sur les isoformes d'Akt et leurs cibles *in vivo*

In vivo nous n'avons pas observé les différents effets du VCD, notamment sur l'expression protéique, l'activation, l'ARNm des isoformes d'Akt, et sur leurs cibles. Nos résultats corroborent les trouvailles de Keating *et al.* ainsi que celles d'autres chercheurs (158, 161). En effet, Hu *et al.* (166) ont démontré, *in vivo* sur les rats, que l'effet du VCD sur les protéines pro-apoptotiques Bad, Bax et Bcl-xL est visible jusqu'à quatre heures après la dernière dose. En revanche, 15 jours après, ils n'avaient observé aucune différence entre le groupe contrôle et celui qui a reçu le VCD. Une des explications est que le VCD agit essentiellement sur la destruction des follicules de la RO (primordiaux et primaires) (161). Les autres follicules des stades supérieurs continuent leur croissance et maintiennent le fonctionnement de l'ovaire. Une autre explication qui peut être avancée est le fait que les mécanismes de suppléance sont mis en œuvre pour assurer la survie de l'ovaire chez l'animal encore vivant. Malgré cette suppléance, la destruction des follicules primordiaux étant irréversible, la RO ne peut être restaurée par la suite. Ainsi, Kappeler dans sa revue, relève le fait que, *in vivo* sur les rongeurs, le niveau sanguin de LH et FSH (comme témoins de la ménopause) ne monte que jusqu'à 240 jours après la fin de l'administration du VCD.

Cependant, la destruction des follicules de la RO est observée plutôt (161). Ce fait révèle la particularité de l'action du VCD *in vivo* qui est de mimer la ménopause naturelle et progressive. Cette particularité fait du VCD un excellent outil pour créer des modèles du VO par rapport aux autres modèles (ovariectomie bilatérale, utilisation des anticancéreux par exemple) qui induisent le VO sans la phase de transition. L'utilisation du double modèle d'induction du VO permet de comprendre que le VCD induit la destruction des follicules primordiaux comme démontré *in vitro* avec la conservation des follicules des stades plus avancés. Il s'en suit l'effondrement des restes de follicules avec le temps à la suite d'ovulations successives comme

le montrent les résultats *in vivo*. Ce constat est en accord avec les données antérieures publiées dans la littérature (127). Cette action du VCD sur l'expression et l'activation d'Akt et de ses cibles au sein des follicules de la RO est précoce et directe. Par la suite, l'expression et l'activation des isoformes d'Akt sont restaurées pour assurer la survie de l'ovaire chez l'animal vivant.

c) La régulation de cibles moléculaires d'Akt par les stéroïdes ovariens

Notre étude menée sur les cellules de la granulosa en culture a montré que la DHT et l'E₂ agissaient de façon inverse sur la phosphorylation des cibles d'Akt principalement impliquées dans l'apoptose (Bad et Fox03a). La DHT réduit leur niveau de phosphorylation, tandis que l'E₂ l'augmente. Ce résultat suggère que la signalisation par Foxo3a et Bad au sein des cellules de la granulosa est importante pour médier les effets des stéroïdes sur l'apoptose dans l'ovaire. En effet, la phosphorylation de Fox03a et de Bad joue un rôle anti-apoptotique puissant. Cette phosphorylation révèle le rôle que joue l'E₂ dans la survie cellulaire au sein de l'ovaire. Comme relevé précédemment dans cette thèse, plusieurs études soulignent l'implication de Foxo3a dans la survenue du VO. Des souris KO de Foxo3a présentent un VO prématuré (63, 167). Notre étude vient renforcer ce constat, et révèle l'importance des cellules de la granulosa et des stéroïdes ovariens dans le destin du follicule. À ce jour, peu d'études existent concernant le rôle au niveau de l'ovaire des autres cibles d'Akt comme GSK3 β et mTOR. En plus, les pathologies caractérisées par l'hyperandrogénie comme le SOPK sont associées à un arrêt de croissance folliculaire probablement à cause de la diminution de phosphorylation d'Akt et, par conséquent, de celle de ses cibles. Cependant, dans le SOPK, cet arrêt de croissance folliculaire n'est pas associé à un accroissement de l'apoptose folliculaire (155, 168). Cette discordance entre l'arrêt de la croissance folliculaire et le non-accroissement de l'apoptose folliculaire en cas du SOPK nous semble liée à la suppléance d'autres voies de survie cellulaire comme celle de MAPK.

4.9 Limitations méthodologiques

Les résultats de nos différentes expérimentations montrent bien les rôles des isoformes d'Akt ainsi que de la voie PI3K/Akt dans l'ovaire. Nous avons relevé ces rôles aussi bien dans

les processus physiologiques, comme la dynamique folliculaire et l'ovulation, que dans le processus pathologique, tel que le VO. Au sein de l'ovaire, ces isoformes d'Akt démontrent des spécificités ainsi que des similarités ou des redondances. Celles-ci concernent leur localisation, leur expression ainsi que leur régulation tout au long du cycle œstral, par les stéroïdes ovariens et dans le VO induit par le VCD. Toutefois, en observant bien ces données, certaines questions subsistent, et d'autres émergent. Notre travail a permis de révéler beaucoup d'aspects concernant ces isoformes d'Akt et d'en caractériser d'autres. En ce qui concerne leur expression, essentiellement l'intensité des isoformes d'Akt au travers du cycle œstral, nos données restent descriptives. Elles ne permettent à ce titre que de suggérer de liens entre ces variations et les effets des hormones au niveau ovarien étant donné le modèle animal utilisé. Mais cela ne remet pas en cause la pertinence de notre travail, car la complexité du modèle animal murin le rapproche de la femme. En effet, le modèle murin permet de comprendre ce qui se passe dans les différentes phases du cycle concernant les isoformes d'Akt. Pour pallier cet écueil, le développement des modèles moins complexes et bien contrôlés comme les cultures cellulaires est la solution. Nous avons exploité cette piste, notamment dans l'effet des stéroïdes sur les isoformes d'Akt. Elle mérite d'être étendue pour les autres aspects qui impliquent les isoformes d'Akt afin d'envisager de liens causatifs de différentes hormones sur les isoformes d'Akt.

Une autre limitation est la multiplicité des phases du cycle (4 phases) dans un intervalle court de temps (5 jours). Ce fait a rendu parfois l'analyse complexe, et les différences qui étaient parfois minimes, difficiles à mettre en évidence. Cela a paru comme une limitation à souligner, à côté d'une certaine variabilité liée au modèle murin et à la petite taille de notre échantillon. Cette variabilité et la petite taille de notre échantillon, dans certains cas, n'ont pas permis de ressortir la significativité des différences existantes. Mais qu'à cela ne tienne, nos données conservent une bonne validité interne dans la mesure où nos résultats conservaient les mêmes tendances quoique le seuil de signification n'était pas atteint pour certaines phases du cycle œstral. Ainsi, notre travail permet d'ouvrir des avenues pour des études sur les humains avec des données fondamentales. Ces études permettront d'étayer des hypothèses et de faire avancer la recherche dans des pistes prometteuses en proposant des perspectives pour consolider nos résultats.

CHAPITRE V

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

5.1 Conclusion

Les isoformes d'une protéine sont ses différentes formes qui peuvent être générées par différents processus, dont la transcription de différents gènes comme il en est le cas des isoformes d'Akt. Elles peuvent l'être aussi par l'épissage alternatif des ARNm à partir d'un seul gène (65, 169). Elles constituent une des manières pour les cellules de diversifier la fonction d'une seule protéine, et de lui permettre d'être versatile. Ces isoformes peuvent jouer des rôles redondants ou spécifiques, voire opposés au sein d'un même type cellulaire selon des stimuli divers (65, 81, 169, 170). Ces constatations sont aussi vraies pour les isoformes d'Akt dans divers organes, mais concernant l'ovaire ces données étaient manquantes. L'objectif général de cette thèse était d'élucider la régulation et les rôles des isoformes d'Akt dans la physiologie ovarienne. Nos travaux ont apporté une contribution dans ce sens pour une meilleure compréhension du sujet.

Grâce aux IHC réalisées sur des ovaires des souris C57 BL/6J de type sauvage et sexuellement matures, nous avons pu caractériser l'expression et la localisation des isoformes d'Akt au sein de l'ovaire. Nous avons établi, en effet, que les follicules ovariens, les corps jaunes sont des structures qui expriment de façon nette les 3 isoformes d'Akt. Akt3 est l'isoforme la moins exprimée. Le stroma ovarien est le compartiment qui exprime moins et de façon éparse Akt1 et 2. L'expression d'Akt3 y est quasi nulle. Ces isoformes démontrent également une expression différentielle au sein des différents types cellulaires qui composent les follicules. Si leur expression est permanente dans les cellules de la granulosa et l'ovocyte, elle variait dans les cellules de la thèque. Ces IHC nous ont permis également d'établir que les localisations subcellulaires de ces différentes isoformes d'Akt sont spécifiques, mais avec parfois quelques similarités. Akt1 montre une localisation nucléaire et cytoplasmique, notamment au sein des cellules de la granulosa. Akt2 montre une localisation cytoplasmique basale et quelque peu

membranaire. Akt3 montre une localisation cytoplasmique et parfois nucléaire. Les localisations subcellulaires d'Akt2 et 3 subissent certaines variations le long du cycle œstral. Grâce à des WB réalisés dans les différentes phases du cycle œstral, nous avons observé que l'intensité d'expression et d'activation des isoformes d'Akt varie de façon isoforme-spécifique. Cependant, nous avons observé une similarité dans le patron d'expression protéique d'Akt1 et 3. Ces différentes variations de localisation, d'expression et d'activation des isoformes d'Akt au travers du cycle œstral suggèrent un éventuel lien de régulation de ces isoformes d'Akt avec les hormones propres à chaque phase du cycle. Elles suggèrent également d'éventuels rôles qu'elles jouent de manière spécifique ou redondante.

En utilisant un modèle des souris déficientes en Akt3, nous avons étudié l'impact de cette élimination d'Akt3 dans la physiologie ovarienne, notamment concernant la RO, la dynamique folliculaire, le volume ovarien et l'ovulation. Nous avons observé que les souris déficientes en Akt3 présentent de façon significative une diminution de la RO et une augmentation des follicules secondaires avant l'âge de la maturité sexuelle. Bien qu'une telle tendance persistât à l'âge de 100 jours, elle n'était plus significative. En plus, les souris Akt3^{-/-} âgées de 100 jours démontrent une diminution significative des corps jaunes et du volume ovarien. Ces résultats ont démontré les rôles d'Akt3 dans l'ovaire bien que son expression y soit moindre. Ces résultats constituent une première qui vient montrer le rôle potentiel d'Akt3 dans la physiologie ovarienne, notamment comme frein de la sortie de follicules de la RO chez les souris avant la maturité sexuelle. Ils montrent aussi qu'Akt3 jouerait un rôle dans la promotion de l'ovulation et de la formation du corps jaune ainsi que dans la régulation du volume ovarien.

La variation de l'expression des isoformes d'Akt au travers du cycle œstral laisse suggérer leur régulation probable par des hormones. Nous avons examiné, à cet effet, dans un modèle moins complexe, l'impact sur les isoformes d'Akt d'un traitement avec les stéroïdes ovariens. Nous avons étudié *in vitro* la régulation de l'expression et de l'activation des isoformes d'Akt par la DHT et l'E₂ sur des cellules de la granulosa ovarienne des souris C57 BL/6J de type sauvage. Cette étude nous a permis d'observer quelques tendances quoique ces effets ne fussent pas significatifs. Akt1 paraît régulé à la hausse par l'E₂, tandis qu'Akt2 à la baisse. La DHT induit l'inverse. Akt3 est l'isoforme qui semble plus influencée par la DHT qui tend à induire sa

diminution. L'action de ces deux stéroïdes n'a également aucune sélectivité sur les localisations subcellulaires des isoformes d'Akt. Nos données ont confirmé cependant de façon évidente et significative que ces deux stéroïdes régulent inversement l'activation des isoformes d'Akt. L'E₂ augmente leur phosphorylation, alors que la DHT la diminue. Ce résultat laisse suggérer que la régulation de l'activation des isoformes d'Akt par les stéroïdes ovariens est non spécifique.

Finalement, à l'aide d'une double approche d'induction du VO (*in vitro* et *in vivo*) par le VCD chez les souris de type sauvage, nous avons établi que les isoformes d'Akt sont régulées à la baisse. Cette régulation est observée à deux niveaux, protéique et transcriptionnel. Au niveau protéique, la réduction de l'expression, de l'activation et de la localisation de ces isoformes sont non spécifiques. Cependant, au niveau transcriptionnel, la réduction des isoformes d'Akt nous paraît spécifique. En effet, seuls les transcrits d'Akt1 et 3 sont réduits après administration du VCD. Aussi, nos résultats suggèrent que le VCD induirait une dégradation protéique et la mort cellulaire par apoptose. Cette double approche nous a permis de montrer que ces effets du VCD sur les isoformes d'Akt sont restaurés avec le temps. En effet, les différences observées *in vitro* ne sont plus visibles *in vivo* quoique le VO était induit et persistait.

En considérant toutes ces observations, nous pouvons conclure que les isoformes d'Akt dans l'ovaire possèdent des similarités, mais aussi des spécificités. Celles-ci concernent leur expression, leur régulation et probablement leurs fonctions tout au long du cycle œstral ainsi que leur régulation par les stéroïdes ovariens. Akt3, bien que moins exprimée et apparemment moins régulée par certains stéroïdes, jouerait un rôle dans la dynamique folliculaire, la RO, la régulation du volume ovarien et l'ovulation. Les trois isoformes d'Akt sont impliquées dans le processus du VO aussi bien concernant leur expression que leur activation. En notre connaissance, cette étude est la première qui établit l'implication des isoformes d'Akt au travers du cycle œstral et dans le VO. Elle est également la première à relever le rôle d'Akt3 dans la dynamique folliculaire, la régulation du volume ovarien et l'ovulation. Les principales découvertes de notre thèse sont résumées dans la figure 5.1 ci-dessous.

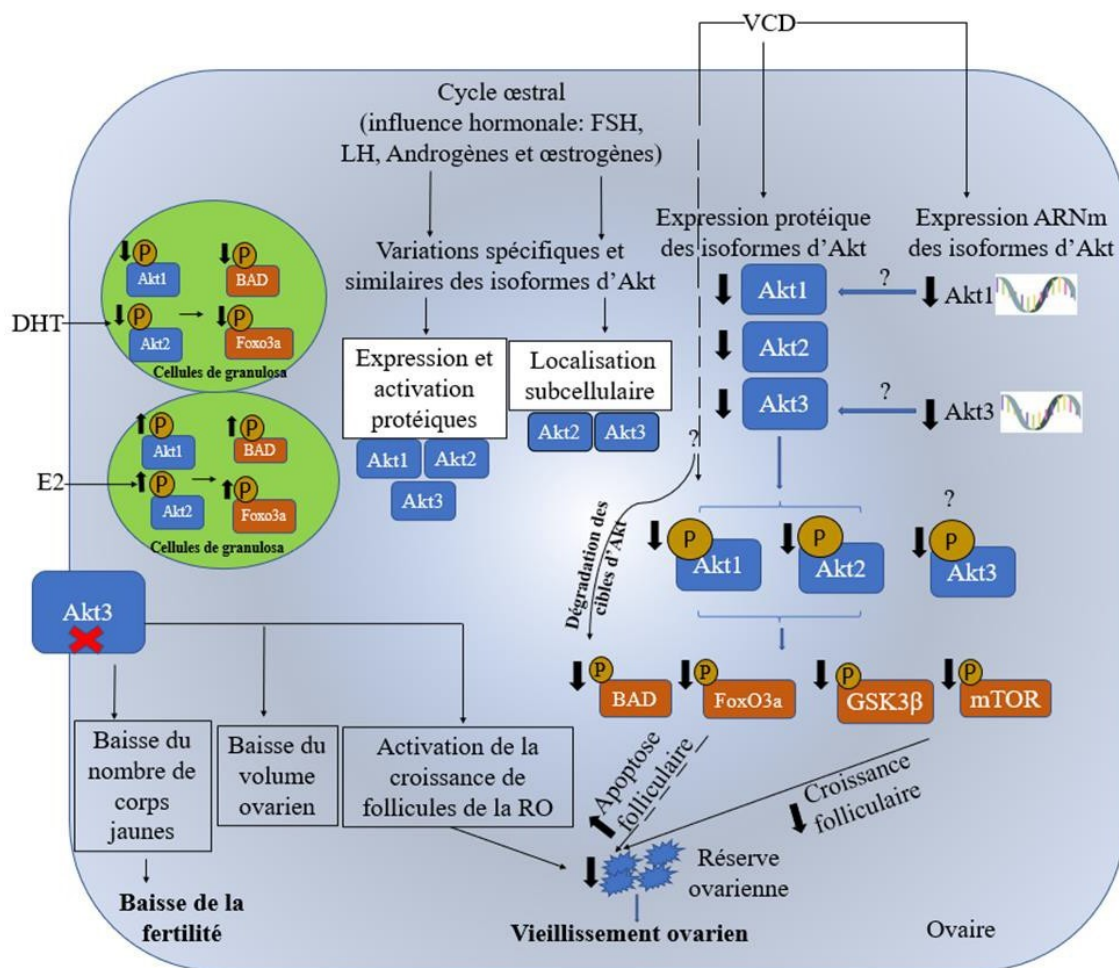


Figure 5.1 Représentation schématique de principales implications des isoformes d'Akt et de leur signalisation dans l'ovaire.

Les effets des stéroïdes ovariens, du VCD ainsi que l'influence du cycle œstral sur les isoformes d'Akt et leurs cibles sont divers. Ces effets sont parfois spécifiques ou similaires. L'élimination d'Akt3 induit également des conséquences sur l'ovaire, et révèle des rôles émergents pour cette isoforme d'Akt.

DHT : Dihydrotestostérone, E2 = 17 β -Œstradiol, VCD = 4-vinylcyclohexène diépoxyde.

5.2 Perspectives

Dans cette section, nous tenons à développer certaines perspectives que notre étude ouvre en plus de celles abordées dans notre discussion précédemment.

5.2.1 Perspectives à court terme

5.2.1.1 Détermination du rôle de chacune des isoformes d'Akt dans la survie des cellules de la granulosa

Notre étude a montré une spécificité des variations des isoformes d'Akt le long du cycle œstral et une tendance à la spécificité de leur régulation par les stéroïdes ovariens. Ces observations laissent suggérer des fonctions particulières de chacune d'elles. Des études montrent que les cellules de la granulosa jouent un rôle déterminant au sein du follicule (8), et elles s'appêtent mieux pour une étude moins complexe. Cette donnée paraît intéressante quant aux visées thérapeutiques qui ciblent les isoformes d'Akt. Nous estimons intéressant d'étudier la survie et la croissance cellulaires ainsi que la compensation des isoformes d'Akt au sein des cellules de la granulosa. Dans cet ordre, il serait pertinent d'induire dans les cellules de la granulosa une simple, double ou triple inhibition des isoformes d'Akt en utilisant par exemple la technologie de l'ARN interférent, ou celle récente et révolutionnaire de CRISPR Cas-9. Dans cette dernière technologie, l'endonucléase (Cas-9), à l'aide d'un ARN-guide associé aux séquences CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), peut couper une séquence précise de l'ADN. Ainsi, grâce aux différents ARN-guide synthétisés indépendamment, il est possible d'induire efficacement des KO des gènes d'intérêt (171). Avec un tel modèle, nous pourrions approfondir les connaissances sur les rôles et fonctions des isoformes d'Akt dans les cellules de la granulosa et partant, sur le destin folliculaire.

5.2.1.2 Identifier si les cibles d'Akt sont isoformes spécifiques dans l'ovaire

La détermination de l'implication des isoformes d'Akt comme dans le modèle des cellules de la granulosa proposé dans le point précédent constituera une première étape. Ensuite, nous trouvons intéressant, dans le but de comprendre les mécanismes sous-jacents, d'étudier si les cibles d'Akt sont également activées ou inhibées de manière isoforme-spécifique. L'étude de la phosphorylation de différentes cibles d'Akt après stimulation de la voie PI3K/Akt dans ce modèle d'inhibition des isoformes d'Akt permettra d'établir l'effet de chacune d'elles sur leurs cibles. Ces connaissances permettront d'approfondir l'étude sur la voie de signalisation d'Akt, et de cerner sa versatilité en vue des visées thérapeutiques.

5.2.2 Perspectives à long terme

5.2.2.1 *Étude de la compensation et interaction entre les isoformes d'Akt au sein de l'ovaire*

La compréhension des rôles et de l'interaction entre les isoformes d'Akt dans l'ovaire impliquera un approfondissement des études mécanistiques. Celui-ci nécessitera un modèle plus complexe que les cultures cellulaires. Il sera de ce fait utile de développer un modèle de KO conditionnel des isoformes d'Akt qui cible particulièrement les ovaires. Un tel modèle de simple, double et triple KO des isoformes d'Akt sera possible, notamment grâce à la recombinaison-Cre et dont l'expression sera liée à celle des récepteurs de l'AMH. Ce KO conditionnel permettra d'éviter les effets pervers et étendus de l'élimination permanente des isoformes d'Akt pour des doubles et triples KO des isoformes d'Akt. Car, il est établi que les souris qui ont subi de doubles et triples éliminations permanentes des isoformes d'Akt ne sont pas viables sauf peut-être celles avec une double élimination d'Akt2 et 3 (77-79). Un tel modèle permettra ainsi d'étudier l'impact de telles déficiences des isoformes d'Akt sur la RO, la dynamique folliculaire et le destin folliculaire. Il relèvera également les interactions entre les différentes isoformes d'Akt dans ces processus biologiques. Il permettra aussi de compléter nos présents résultats en ce qui concerne par exemple la baisse des isoformes d'Akt observée dans le modèle du VO induit par le VCD.

5.2.2.2 *Rôles des isoformes d'Akt dans l'ovulation, la formation du corps jaune et la régulation du volume ovarien*

Nous avons observé que l'élimination d'Akt3 impacte le nombre des corps jaunes. Nous estimons important d'étudier également les rôles d'autres isoformes d'Akt dans le processus d'ovulation et de la formation du corps jaune. Celle-ci se fera grâce à une étude dédiée qui va s'étendre sur les différents aspects de ces processus. Une telle étude va se réaliser dans le modèle susmentionné de KO conditionnel des isoformes d'Akt, et va s'atteler sur divers aspects, notamment morphologiques, moléculaires, enzymatiques et hormonaux liés à l'ovulation et au corps jaune. Elle permettra de cerner les effets de chaque isoforme d'Akt et leurs interactions possibles.

En ce qui concerne le volume ovarien, il s'avère nécessaire d'investiguer les mécanismes impliqués dans la régulation du volume ovarien par Akt3 en plus de celui abordé dans la discussion. Il sera utile de mener des études plus approfondies pour investiguer les rôles d'autres isoformes également avec des modèles de KO disponibles. En plus, il faudra regarder dans le contexte pathologique avec des modèles du SOPK, l'implication possible d'Akt3.

5.2.2.3 Étude translationnelle de l'implication des isoformes d'Akt chez les patientes atteintes d'IOP ou chez les ménopausées

Toutes ces études devront aboutir à l'élaboration d'une étude translationnelle chez les patientes atteintes d'IOP ou chez les ménopausées en vue de confirmer ces différentes trouvailles. Cette étude translationnelle pourra se consacrer à analyser, notamment chez ces patientes, des modifications éventuelles des gènes d'Akt ou l'expression de ses isoformes au sein de l'ovaire sur des pièces opératoires. Elle pourra également étudier, sur des prélèvements sanguins, des marqueurs potentiels de l'IOP. Par exemple, l'étude des microARN qui ont un lien avec des protéines de la voie PI3K/Akt peut y être approfondie. Toutes les connaissances qui pourront être accumulées dans ces différentes études auront pour finalité de servir des bases pour le développement des thérapeutiques. Ces thérapeutiques cibleront les isoformes d'Akt dans la prise en charge de l'infertilité féminine liée aux perturbations ovariennes comme dans le cas d'IOP et d'autres troubles d'ovulation (par exemple, le SOPK). Elles pourront servir ainsi au développement des stimulateurs ou inhibiteurs sélectifs de chaque isoforme d'Akt. Ceux-ci pourront être utiles dans la prise en charge d'autres pathologies ovariennes comme le cancer, qui est un fléau pour la femme.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Standring S. Gray's anatomy e-book: the anatomical basis of clinical practice: Elsevier Health Sciences; 2015.
2. Kamina P. « l'ovaire » (septième partie), dans Anatomie gynécologique et obstétricale. 3^e ème ed. Maloine, editor. Paris 2002. p. 209-45.
3. Guillomot M. L'implantation du blastocyste. In: Thibault C LM-C, editor. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipses éditions ed. Paris 2001. p. 457-78.
4. Gougeon A. Régulation de l'initiation de la croissance folliculaire. Gynécologie Obstétrique & Fertilité. 2011;39(9):511-3.
5. Gougeon A. Human ovarian follicular development: from activation of resting follicles to preovulatory maturation. Annales d'endocrinologie. 2010, 71(3):132-43.
6. Kinnear HM, Tomaszewski CE, Chang FL, Moravek MB, Xu M, Padmanabhan V, et al. The ovarian stroma as a new frontier. Reproduction. 2020;160(3):R25-R39.
7. Empeire J-C. Gynécologie endocrinienne du praticien. Éditions Frison-Roche ed. édition e, editor. Paris 2007. 327 p.
8. Alam MH, Miyano T. Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro. Reproductive medicine and biology. 2020;19(1):13-23.
9. Tian Y, Shen W, Lai Z, Shi L, Yang S, Ding T, et al. Isolation and identification of ovarian theca-interstitial cells and granulosa cells of immature female mice. Cell biology international. 2015;39(5):584-90.
10. Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson ML, Hoffman LB, Bradshaw Dk, Cunnigham G. William's Gynecology e-book. In: Hills M, editor. 2008.
11. Geoffroy Robin SC-J. Physiologie et methodes d'exploration du cycle menstruel. In: Brigitte Letombe SC-J, Geoffroy Robin, editor. Endocrinologie en gynécologie et obstétrique Elsevier Masson ed. Paris2012. p. 63-79.
12. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. Nature. 2004;428(6979):145-50.

13. Christin-Maitre S, Pasquier M, Donadille B, Bouchard P. L'insuffisance ovarienne prématurée. *Annales d'endocrinologie*; 2006, 67(6):557-566.
14. Adhikari D, Liu K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocrine reviews*. 2009;30(5):438-64.
15. Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human reproduction update*. 2005;11(2):162-78.
16. Visser JA, Durlinger AL, Peters IJ, van den Heuvel ER, Rose UM, Kramer P, et al. Increased oocyte degeneration and follicular atresia during the estrous cycle in anti-Mullerian hormone null mice. *Endocrinology*. 2007;148(5):2301-8.
17. de Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertility and sterility*. 2002;77(2):357-62.
18. da Silva A-LB, Even M, Grynberg M, Gallot V, Frydman R, Fanchin R. Hormone antimüllérienne: acteur et marqueur de la folliculogénèse. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 2010;38(7):471-4.
19. Jewelewicz R, Schwartz M. Premature ovarian failure. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*. 1986;62(3):219.
20. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Human Reproduction*. 1986;1(2):81-7.
21. Broekmans F, Soules M, Fauser B. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocrine reviews*. 2009;30(5):465-93.
22. Donnez J, Dolmans M-M, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *The lancet*. 2004;364(9443):1405-10.
23. McNatty KP, Hillier SG, van den Boogaard AM, Trimbos-Kemper TC, Reichert JR LE, van Hall EV. Follicular development during the luteal phase of the human menstrual cycle. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1983;56(5):1022-31.
24. Koering MJ. Cyclic changes in ovarian morphology during the menstrual cycle in *Macaca mulatta*. *American journal of anatomy*. 1969;126(1):73-101.
25. Gougeon A, Lefèvre B. Evolution of the diameters of the largest healthy and atretic follicles during the human menstrual cycle. *Reproduction*. 1983;69(2):497-502.

26. Mutlu MF, Erdem A. Evaluation of ovarian reserve in infertile patients. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*. 2012;13(3):196.
27. Aramesh S, Alifarja T, Jannesar R, Ghaffari P, Vanda R, Bazarganipour F. Does vitamin D supplementation improve ovarian reserve in women with diminished ovarian reserve and vitamin D deficiency: a before-and-after intervention study. *BMC Endocrine Disorders*. 2021;21(1):1-5.
28. Broekmans FJ, Knauff EA, te Velde ER, Macklon NS, Fauser BC. Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2007;18(2):58-65.
29. Broekmans FJ, Faddy MJ, Scheffer G, te Velde ER. Antral follicle counts are related to age at natural fertility loss and age at menopause. *Menopause*. 2004;11(6 Part 1 of 2):607-14.
30. Verhagen TE, Hendriks DJ, Bancsi L, Mol BWJ, Broekmans FJ. The accuracy of multivariate models predicting ovarian reserve and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis. *Human Reproduction Update*. 2008;14(2):95-100.
31. Treloar A, Boynton R, Behn B, Brown B. Variation of the Human Menstrual Cycle Through Reproductive Life. *International journal of fertility*. 1967;12(1 Pt 2):77-126.
32. den Tonkelaar I, Te Velde E, Looman C. Menstrual cycle length preceding menopause in relation to age at menopause. *Maturitas*. 1998;29(2):115-23.
33. Weinstein M, Gorrindo T, Riley A, Mormino J, Niedfeldt J, Singer B, et al. Timing of menopause and patterns of menstrual bleeding. *American journal of epidemiology*. 2003;158(8):782-91.
34. Treloar AE. Menstrual cyclicity and the pre-menopause. *Maturitas*. 1981;3(3-4):249-64.
35. van Noord PA, Dubas JS, Dorland M, Boersma H, te Velde E. Age at natural menopause in a population-based screening cohort: the role of menarche, fecundity, and lifestyle factors. *Fertility and sterility*. 1997;68(1):95-102.
36. Gleicher N, Ryan E, Weghofer A, Blanco-Mejia S, Barad DH. Miscarriage rates after dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation in women with diminished ovarian reserve: a case control study. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2009;7(1):108.
37. Shuster LT, Rhodes DJ, Gostout BS, Grossardt BR, Rocca WA. Premature menopause or early menopause: long-term health consequences. *Maturitas*. 2010;65(2):161-6.

38. Vries Ed, Den Tonkelaar I, Van Noord P, Van der Schouw Y, Te Velde E, Peeters P. Oral contraceptive use in relation to age at menopause in the DOM cohort. *Human Reproduction*. 2001;16(8):1657-62.
39. Te Velde E, Dorland M, Broekmans F. Age at menopause as a marker of reproductive ageing. *Maturitas*. 1998;30(2):119-25.
40. Bachelot A, Dulon J, Touraine P. Insuffisance ovarienne prématurée. *Diabetes Care*. 2011;34:533-39.
41. Barlow C, Hirotsume S, Paylor R, Liyanage M, Eckhaus M, Collins F, et al. Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell*. 1996;86(1):159-71.
42. Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(4):963-72.
43. Kipp JL, Kilen SM, Bristol-Gould S, Woodruff TK, Mayo KE. Neonatal exposure to estrogens suppresses activin expression and signaling in the mouse ovary. *Endocrinology*. 2007;148(5):1968-76.
44. Iguchi T, Fukazawa Y, Uesugi Y, Takasugi N. Polyovular follicles in mouse ovaries exposed neonatally to diethylstilbestrol in vivo and in vitro. *Biology of reproduction*. 1990;43(3):478-84.
45. Chen Y, Jefferson WN, Newbold RR, Padilla-Banks E, Pepling ME. Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary in vitro and in vivo. *Endocrinology*. 2007;148(8):3580-90.
46. Dery M-C, Leblanc V, Shooner C, Asselin E. Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17 β -estradiol in the rat uterus during estrous cycle. *Reproductive biology and endocrinology*. 2003;1(1):47.
47. Bertoldo M-J, Bernard J, Duffard N, Mermillod P, Locatelli Y. Régulation de la croissance des follicules pré-antraux, un frein à l'épuisement de la réserve ovarienne. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 2013;41(9):540-3.
48. Reddy P, Shen L, Ren C, Boman K, Lundin E, Ottander U, et al. Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Developmental biology*. 2005;281(2):160-70.

49. Otsuka F, Shimasaki S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(12):8060-5.
50. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*. 1996;383(6600):531-5.
51. Erickson GF, Case E. Epidermal growth factor antagonizes ovarian theca-interstitial cytodifferentiation. *Molecular and cellular endocrinology*. 1983;31(1):71-6.
52. Sasano H, Okamoto M, Mason J, Simpson E, Mendelson C, Sasano N, et al. Immunolocalization of aromatase, 17 α -hydroxylase and side-chain-cleavage cytochromes P-450 in the human ovary. *Reproduction*. 1989;85(1):163-9.
53. Sasano H, Mori T, Sasano N, Nagura H, Mason J. Immunolocalization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in human ovary. *Reproduction*. 1990;89(2):743-51.
54. Richards JS, Sharma S, Falender AE, Lo YH. Expression of FKHR, FKHRL1, and AFX genes in the rodent ovary: evidence for regulation by IGF-I, estrogen, and the gonadotropins. *Molecular endocrinology*. 2002;16(3):580-99.
55. Gava N, Clarke CL, Byth K, Arnett-Mansfield RL, deFazio A. Expression of progesterone receptors A and B in the mouse ovary during the estrous cycle. *Endocrinology*. 2004;145(7):3487-94.
56. Soyal SM, Mukherjee A, Lee KYS, Li J, Li H, DeMayo FJ, et al. Cre-mediated recombination in cell lineages that express the progesterone receptor. *genesis*. 2005;41(2):58-66.
57. Pinter JH, Deep C, Park-Sarge O-K. Progesterone receptors: expression and regulation in the mammalian ovary. *Clinical obstetrics and gynecology*. 1996;39(2):424-35.
58. Fan H-Y, Liu Z, Cahill N, Richards JS. Targeted disruption of Pten in ovarian granulosa cells enhances ovulation and extends the life span of luteal cells. *Molecular endocrinology*. 2008;22(9):2128-40.
59. Fan H-Y, Shimada M, Liu Z, Cahill N, Noma N, Wu Y, et al. Selective expression of KrasG12D in granulosa cells of the mouse ovary causes defects in follicle development and ovulation. *Development*. 2008;135(12):2127-37.

60. Cecconi S, Mauro A, Cellini V, Patacchiola F. The role of Akt signalling in the mammalian ovary. *International Journal of Developmental Biology*. 2013;56(10-11-12):809-17.
61. Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine reviews*. 2009;30(6):624-712.
62. Reddy P, Adhikari D, Zheng W, Liang S, Hämäläinen T, Tohonen V, et al. PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles. *Human molecular genetics*. 2009;18(15):2813-24.
63. John GB, Shirley LJ, Gallardo TD, Castrillon DH. Specificity of the requirement for Foxo3 in primordial follicle activation. *Reproduction*. 2007;133(5):855-63.
64. Lian Liu SR, Pradeep Reddy, Chun Du, Krishna Jagarlamudi, Yan Shen, David Gunnarsson, Gunnar Selstam, Karin Boman, Kui Liu. Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a. *Developmental biology*. 2007; 134:199-209
65. Fabi F, Asselin E. Expression, activation, and role of AKT isoforms in the uterus. *Reproduction*. 2014;148(5):R85-R95.
66. Martini M, De Santis MC, Braccini L, Gulluni F, Hirsch E. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Annals of medicine*. 2014;46(6):372-83.
67. Liao Y, Hung M-C. Physiological regulation of Akt activity and stability. *American journal of translational research*. 2010;2(1):19.
68. Jethwa N, Chung GH, Lete MG, Alonso A, Byrne RD, Calleja V, et al. Endomembrane PtdIns (3, 4, 5) P 3 activates the PI3K–Akt pathway. *Journal of cell science*. 2015;128(18):3456-65.
69. Fabi F, Grenier K, Parent S, Adam P, Tardif L, Leblanc V, et al. Regulation of the PI3K/Akt pathway during decidualization of endometrial stromal cells. *PloS one*. 2017;12(5).
70. Lipton JO and Sahin M. The neurology of mTOR. *Neuron*. 2014, 84: 275-91.
71. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007;129(7):1261-74.
72. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*. 2005;4(12):988-1004.

73. Manning BD, Toker A. AKT/PKB signaling: navigating the network. *Cell*. 2017;169(3):381-405.
74. Chen WS, Xu P-Z, Gottlob K, Chen M-L, Sokol K, Shiyanova T, et al. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes & development*. 2001;15(17):2203-8.
75. Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB β). *Science*. 2001;292(5522):1728-31.
76. Tschopp O, Yang Z-Z, Brodbeck D, Dummler BA, Hemmings-Mieszczak M, Watanabe T, et al. Essential role of protein kinase B γ (PKB γ /Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development*. 2005;132(13):2943-54.
77. Peng X-d, Xu P-Z, Chen M-L, Hahn-Windgassen A, Skeen J, Jacobs J, et al. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes & development*. 2003;17(11):1352-65.
78. Yang Z-Z, Tschopp O, Di-Poï N, Bruder E, Baudry A, Dümmler B, et al. Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase B α (PKB α) and Akt3/PKB γ on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(23):10407-18.
79. Dummler B, Tschopp O, Hynx D, Yang Z-Z, Dirnhofer S, Hemmings BA. Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(21):8042-51.
80. Veillette A, Grenier K, Brasseur K, Fréchette-Frigon G, Leblanc V, Parent S, et al. Regulation of the PI3-K/Akt survival pathway in the rat endometrium. *Biology of reproduction*. 2013;88(3):79.
81. Linnerth-Petrik NM, Santry LA, Moorehead R, Jücker M, Wootton SK, Petrik J. Akt isoform specific effects in ovarian cancer progression. *Oncotarget*. 2016;7(46):74820-33.
82. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development*. 1999;13(15):1899-911.
83. Condorelli F, Salomoni P, Cotteret S, Cesi V, Srinivasula SM, Alnemri ES, et al. Caspase cleavage enhances the apoptosis-inducing effects of BAD. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(9):3025-36.

84. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(1):47-59.
85. Kaidanovich-Beilin O, Woodgett JR. GSK-3: functional insights from cell biology and animal models. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2011;4:40.
86. Yang H, Jiang X, Li B, Yang HJ, Miller M, Yang A, et al. Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40. *Nature*. 2017;552(7685):368-73.
87. Yip CK, Murata K, Walz T, Sabatini DM, Kang SA. Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Molecular cell*. 2010;38(5):768-74.
88. Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell*. 2010;141(2):290-303.
89. Showkat M, Beigh MA, Andrabi KI. mTOR signaling in protein translation regulation: implications in cancer genesis and therapeutic interventions. *Molecular biology international*. 2014;2014.
90. Tian W, Teng F, Gao J, Gao C, Liu G, Zhang Y, et al. Estrogen and insulin synergistically promote endometrial cancer progression via crosstalk between their receptor signaling pathways. *Cancer Biology & Medicine*. 2019;16(1):55.
91. Lee II, Kim JJ. Influence of AKT on progesterone action in endometrial diseases. *Biology of reproduction*. 2014;91(3):63, 1-10.
92. Park S, Song J, Joe CO, Shin I. Akt stabilizes estrogen receptor α with the concomitant reduction in its transcriptional activity. *Cellular signalling*. 2008;20(7):1368-74.
93. Bhat-Nakshatri P, Wang G, Appaiah H, Luktuke N, Carroll JS, Geistlinger TR, et al. AKT alters genome-wide estrogen receptor α binding and impacts estrogen signaling in breast cancer. *Molecular and cellular biology*. 2008;28(24):7487-503.
94. Sanchez M, Sauve K, Picard N, Tremblay A. The hormonal response of estrogen receptor β is decreased by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway via a phosphorylation-dependent release of CREB-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(7):4830-40.
95. Vasan N, Toska E, Scaltriti M. Overview of the relevance of PI3K pathway in HR-positive breast cancer. *Annals of Oncology*. 2019;30(Supplement_10):x3-x11.

96. Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinidou D, Ali S, Nakshatri H. Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor α A new model for anti-estrogen resistance. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(13):9817-24.
97. Edwards DP. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol*. 2005;67:335-76.
98. Xin L, Teitell MA, Lawson DA, Kwon A, Mellinghoff IK, Witte ON. Progression of prostate cancer by synergy of AKT with genotropic and nongenotropic actions of the androgen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(20):7789-94.
99. Carver BS, Chapinski C, Wongvipat J, Hieronymus H, Chen Y, Chandralapaty S, et al. Reciprocal feedback regulation of PI3K and androgen receptor signaling in PTEN-deficient prostate cancer. *Cancer cell*. 2011;19(5):575-86.
100. Mulholland DJ, Tran LM, Li Y, Cai H, Morim A, Wang S, et al. Cell autonomous role of PTEN in regulating castration-resistant prostate cancer growth. *Cancer cell*. 2011;19(6):792-804.
101. Schaffir J, Worly BL, Gur TL. Combined hormonal contraception and its effects on mood: a critical review. *The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care*. 2016;21(5):347-55.
102. Wiegatz I, Thaler CJ. Hormonal contraception—what kind, when, and for whom? *Deutsches Ärzteblatt International*. 2011;108(28-29):495.
103. Bedell S, Nachtigall M, Naftolin F. The pros and cons of plant estrogens for menopause. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2014;139:225-36.
104. Hickey M, Elliott J, Davison SL. Hormone replacement therapy. *Bmj*. 2012;344.
105. Dratva J, Real FG, Schindler C, Ackermann-Liebrich U, Gerbase MW, Probst-Hensch NM, et al. Is age at menopause increasing across Europe? Results on age at menopause and determinants from two population-based studies. *Menopause*. 2009;16(2):385-94.
106. Cruz G, Foster W, Paredes A, Yi KD, Uzumcu M. Long-term effects of early-life exposure to environmental oestrogens on ovarian function: role of epigenetics. *Journal of neuroendocrinology*. 2014;26(9):613-24.

107. Sunkara SK, Coomarasamy A. Androgen pretreatment in poor responders undergoing controlled ovarian stimulation and in vitro fertilization treatment. *Fertility and sterility*. 2011;95(8):e73-e4.
108. Hammes SR, Levin ER. Impact of estrogens in males and androgens in females. *The Journal of clinical investigation*. 2019;129(5):1818-26.
109. Iwase A, Goto M, Harata T, Takigawa S, Nakahara T, Suzuki K, et al. Insulin attenuates the insulin-like growth factor-I (IGF-I)-Akt pathway, not IGF-I-extracellularly regulated kinase pathway, in luteinized granulosa cells with an increase in PTEN. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009;94(6):2184-91.
110. Annu Makker MMG, Vinita Das & Anjoo Agarwal. PI3K-Akt-mTOR and MAPK signaling pathways in polycystic ovarian syndrome, uterine leiomyomas and endometriosis: an update,. *Gynecological Endocrinology*. 2012; 28(3): 175-81.
111. Bushnik T, Cook JL, Yuzpe AA, Tough S, Collins J. Estimating the prevalence of infertility in Canada. *Human reproduction*. 2012;27(3):738-46.
112. Direkvand MA, Delpisheh A, Sayehmiri K. An investigation of the worldwide prevalence of infertility as a systematic review. 2016, 10(1):76-87.
113. Chandra A, Copen CE, Stephen EH. Infertility and impaired fecundity in the United States, 1982–2010: data from the National Survey of Family Growth. *Natl Health Stat Report*. 2013;67(67):1-19.
114. Chen M-J, Chou C-H, Chen S-U, Yang W-S, Yang Y-S, Ho H-N. The effect of androgens on ovarian follicle maturation: Dihydrotestosterone suppress FSH-stimulated granulosa cell proliferation by upregulating PPAR γ -dependent PTEN expression. *Scientific reports*. 2015;5(1):1-13.
115. Ravel C, Kazdar N, Leveque J. Fertilité et insuffisance ovarienne: de nouveaux traitements en perspective? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 2016;44(1):56-62.
116. Cheng Y, Kim J, Li XX, Hsueh AJ. Promotion of ovarian follicle growth following mTOR activation: synergistic effects of AKT stimulators. *PLoS One*. 2015;10(2):e0117769.
117. Kawamura K, Kawamura N, Hsueh AJ. Activation of dormant follicles: a new treatment for premature ovarian failure? *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2016;28(3):217-22.

118. Brown C, LaRocca J, Pietruska J, Ota M, Anderson L, Smith SD, et al. Subfertility caused by altered follicular development and oocyte growth in female mice lacking PKB α /Akt1. *Biology of reproduction*. 2010;82(2):246-56.
119. Van Kempen TA, Milner TA, Waters EM. Accelerated ovarian failure: a novel, chemically induced animal model of menopause. *Brain research*. 2011;1379:176-87.
120. Driancourt M-A, Levasseur M-C. cycles estriens et cycles menstruels In: Thibault C et Levasseur M-C, editor. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Paris: Ellipses éditions; 2001. p. 680-98.
121. Bertolyn K and Murphy DB. Reproductive Tract Changes During the Mouse Estrous Cycle. In: Croy BA, Yamada AT, DeMayo FJ and Adamson SL, editor. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. Waltham, Massachusetts: Elsevier; 2014. p. 85-94.
122. Nicolino M, Forest MG. La puberté. In: Thibault C et Levasseur M-C, editor. *la reproduction chez les mammifères et chez l'homme*. Paris: ellipses éditions; 2001. p. 655-79.
123. Miller MM, Plowchalk DR, Weitzman GA, London SN, Mattison DR. The effect of benzo (a) pyrene on murine ovarian and corpora lutea volumes. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1992;166(5):1535-41.
124. Plowchalk DR, Mattison DR. Reproductive toxicity of cyclophosphamide in the C57BL/6N mouse: 1. Effects on ovarian structure and function. *Reproductive toxicology*. 1992;6(5):411-21.
125. Santi SA, Lee H. The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2010;298(3):C580-C91.
126. Easton RM, Cho H, Roovers K, Shineman DW, Mizrahi M, Forman MS, et al. Role for Akt3/protein kinase B γ in attainment of normal brain size. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(5):1869-78.
127. Haas JR, Christian PJ, Hoyer PB. Effects of impending ovarian failure induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide on fertility in C57BL/6 female mice. *Comparative medicine*. 2007;57(5):443-9.
128. Meng C, Shi F, Zhou Z, Huang R, Liu G, Watanabe G, et al. Cellular localization of inhibin α -subunit, PKB/Akt and FoxO3a proteins in the ovaries of minipigs. *Journal of Reproduction and Development*. 2006:0611280035-.

129. Goto M, Iwase A, Ando H, Kurotsuchi S, Harata T, Kikkawa F. PTEN and Akt expression during growth of human ovarian follicles. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2007;24(11):541-6.
130. Magoffin DA. Ovarian theca cell. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2005;37(7):1344-9.
131. Chen S, Wang F, Liu Z, Zhao Y, Jiang Y, Chen L, et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes proliferation and progesterone synthesis in bovine granulosa cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2019;234(6):8776-87.
132. Li X, Chen H, Zhang Z, Xu D, Duan J, Li X, et al. Isorhamnetin Promotes Estrogen Biosynthesis and Proliferation in Porcine Granulosa Cells via the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2021;69(23):6535-42.
133. Ortega I, Villanueva JA, Wong DH, Cress AB, Sokalska A, Stanley SD, et al. Resveratrol reduces steroidogenesis in rat ovarian theca-interstitial cells: the role of inhibition of Akt/PKB signaling pathway. *Endocrinology*. 2012;153(8):4019-29.
134. Gava N, Clarke CL, Byth K, Arnett-Mansfield RL, deFazio A. Expression of progesterone receptors A and B in the mouse ovary during the estrous cycle. *Endocrinology*. 2004;145(7):3487-94.
135. Guzeloglu Kayisli O, Kayisli UA, Luleci G, Arici A. In vivo and in vitro regulation of Akt activation in human endometrial cells is estrogen dependent. *Biology of reproduction*. 2004;71(3):714-21.
136. Camper-Kirby D, Welch S, Walker A, Shiraishi I, Setchell KD, Schaefer E, et al. Myocardial Akt activation and gender: increased nuclear activity in females versus males. *Circulation research*. 2001;88(10):1020-7.
137. Cadagan D, Towlson C. Mechanisms of Luteinising Hormone Regulation in Female Steroidogenesis. *American Journal of Medical Case Reports*. 2017;5(3):65-8.
138. Wang J, Zhao W, Guo H, Fang Y, Stockman SE, Bai S, et al. AKT isoform-specific expression and activation across cancer lineages. *BMC cancer*. 2018;18(1):1-10.
139. Toker A. Achieving specificity in Akt signaling in cancer. *Advances in biological regulation*. 2012;52(1):78.
140. Devine P, Rajapaksa K, Hoyer PB. In vitro ovarian tissue and organ culture: a review. *Front Biosci*. 2002;7:d1979-89.

141. Restuccia DF, Hynx D, Hemmings BA. Loss of PKB β /Akt2 predisposes mice to ovarian cyst formation and increases the severity of polycystic ovary formation in vivo. *Disease Models & Mechanisms*. 2012;5(3):403-11.
142. Barnett K, Schilling C, Greenfeld C, Tomic D, Flaws J. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Human reproduction update*. 2006;12(5):537-55.
143. Gershon E, Dekel N. Newly identified regulators of ovarian folliculogenesis and ovulation. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(12):4565.
144. Duffy DM, Ko C, Jo M, Brannstrom M, Curry Jr TE. Ovulation: parallels with inflammatory processes. *Endocrine Reviews*. 2019;40(2):369-416.
145. Bashir S, Gastal M, Tazawa S, Tarso S, Hales D, Cuervo-Arango J, et al. The mare as a model for luteinized unruptured follicle syndrome: intrafollicular endocrine milieu. *Reproduction*. 2016;151(3):271-83.
146. Zhao H, Zhou D, Chen Y, Liu D, Chu S, Zhang S. Beneficial effects of Heqi san on rat model of polycystic ovary syndrome through the PI3K/AKT pathway. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;25(1):1-12.
147. Young J, McNeilly AS. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction*. 2010;140(4):489.
148. Yang Z-Z, Tschopp O, Hemmings-Mieszczak M, Feng J, Brodbeck D, Perentes E, et al. Protein kinase B α /Akt1 regulates placental development and fetal growth. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(34):32124-31.
149. Drummond AE, Fuller PJ. The Importance of ERbeta Signalling in the Ovary. *The Journal of endocrinology*. 2010;205(1):15-23.
150. Hanker AB, Kaklamani V, Arteaga CL. Challenges for the clinical development of PI3K inhibitors: strategies to improve their impact in solid tumors. *Cancer discovery*. 2019;9(4):482-91.
151. Rewcastle GW, Kolekar S, Buchanan CM, Gamage SA, Giddens AC, Tsang KY, et al. Biological characterization of SN32976, a selective inhibitor of PI3K and mTOR with preferential activity to PI3K α , in comparison to established pan PI3K inhibitors. *Oncotarget*. 2017;8(29):47725.
152. Mishra R, Patel H, Alanazi S, Kilroy MK, Garrett JT. PI3K Inhibitors in Cancer: Clinical Implications and Adverse Effects. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(7):3464.

153. Aznaurova YB, Zhumataev MB, Roberts TK, Aliper AM, Zhavoronkov AA. Molecular aspects of development and regulation of endometriosis. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2014;12(1):1-25.
154. Borahay MA, Al-Hendy A, Kilic GS, Boehning D. Signaling pathways in leiomyoma: understanding pathobiology and implications for therapy. *Molecular medicine*. 2015;21(1):242-56.
155. Nekoonam S, Naji M, Nashtaei MS, Mortezaee K, Koruji M, Safdarian L, et al. Expression of AKT1 along with AKT2 in granulosa-lutein cells of hyperandrogenic PCOS patients. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2017;295(4):1041-50.
156. Gentilini D, Busacca M, Di Francesco S, Vignali M, Viganò P, Di Blasio A. PI3K/Akt and ERK1/2 signalling pathways are involved in endometrial cell migration induced by 17 β -estradiol and growth factors. *Molecular human reproduction*. 2007;13(5):317-22.
157. Fuentes N, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in protein chemistry and structural biology*. 2019;116:135-70.
158. Keating AF, Fernandez SM, Mark-Kappeler CJ, Sen N, Sipes IG, Hoyer PB. Inhibition of PIK3 signaling pathway members by the ovotoxicant 4-vinylcyclohexene diepoxide in rats. *Biology of reproduction*. 2011;84(4):743-51.
159. Devine PJ, Sipes IG, Skinner MK, Hoyer PB. Characterization of a rat in vitro ovarian culture system to study the ovarian toxicant 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Toxicology and applied pharmacology*. 2002;184(2):107-15.
160. Cao LB, Liu HB, Lu G, Lv Y, Leung CK, Du YZ, et al. Hormone-like effects of 4-vinylcyclohexene diepoxide on follicular development. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2020;8:587.
161. Kappeler CJ, Hoyer PB. 4-vinylcyclohexene diepoxide: a model chemical for ovotoxicity. *Systems biology in reproductive medicine*. 2012;58(1):57-62.
162. Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, Yates JR, Parker R, Hannon GJ. A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nature cell biology*. 2005;7(12):1261-6.
163. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(8):509-24.

164. Hartmann C, Corre-Menguy F, Boualem A, Jovanovic M, Lelandais-Brière C. Les microARN- Une nouvelle classe de régulateurs de l'expression génique. *médecine/sciences*. 2004;20(10):894-8.
165. Schneider A, Matkovich SJ, Victoria B, Spinel L, Bartke A, Golusinski P, et al. Changes of ovarian microRNA profile in long-living Ames dwarf mice during aging. *PloS one*. 2017;12(1):e0169213.
166. Hu X, Christian P, Sipes IG, Hoyer PB. Expression and redistribution of cellular Bad, Bax, and Bcl-xL protein is associated with VCD-induced ovotoxicity in rats. *Biology of reproduction*. 2001;65(5):1489-95.
167. Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science*. 2003;301(5630):215-8.
168. Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(43):17474-9.
169. Stastna M, Van Eyk JE. Analysis of protein isoforms: can we do it better? *Proteomics*. 2012;12(19-20):2937-48.
170. Perrin BJ, Ervasti JM. The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton*. 2010;67(10):630-4.
171. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014;346(6213):1258096.

ANNEXE

LES DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES DU CHAPITRE II ET III

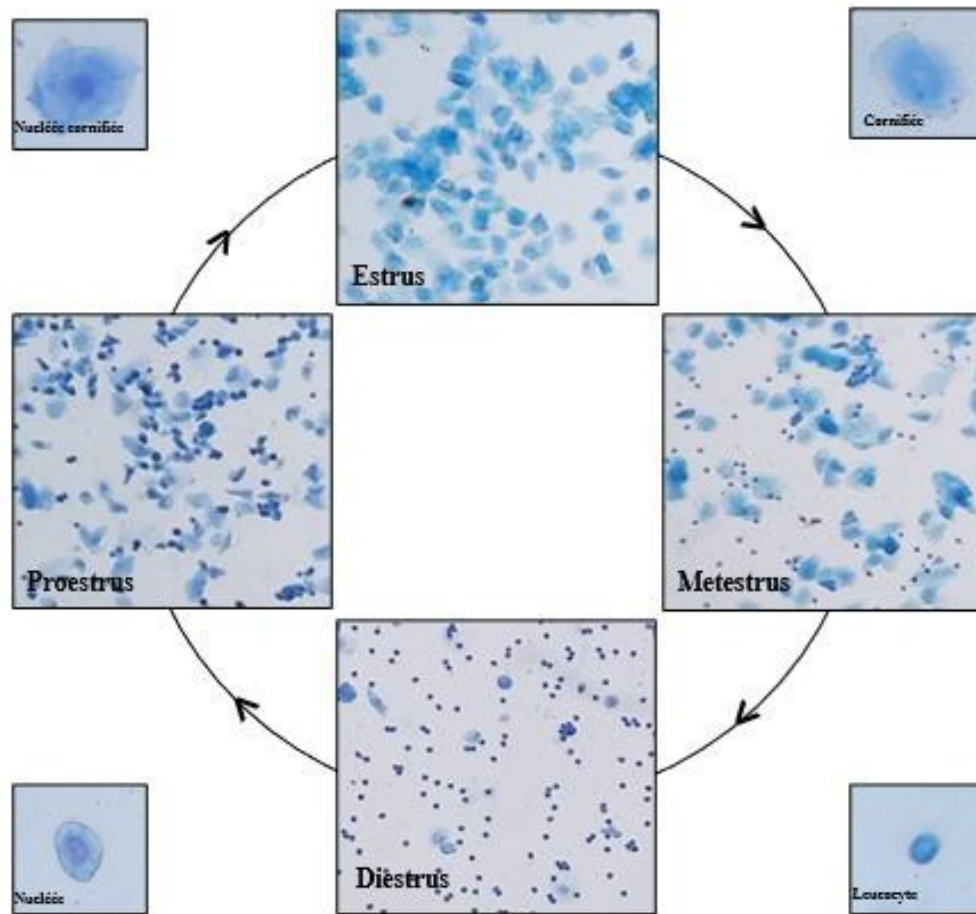


Fig. supplémentaire 1 Différentes phases du cycle œstral.

Les différentes phases du cycle œstral décrites après coloration au bleu de méthylène sur des frottis vaginaux comme décrit dans matériel et méthodes. (Tirée de www.asselinlab.com.)

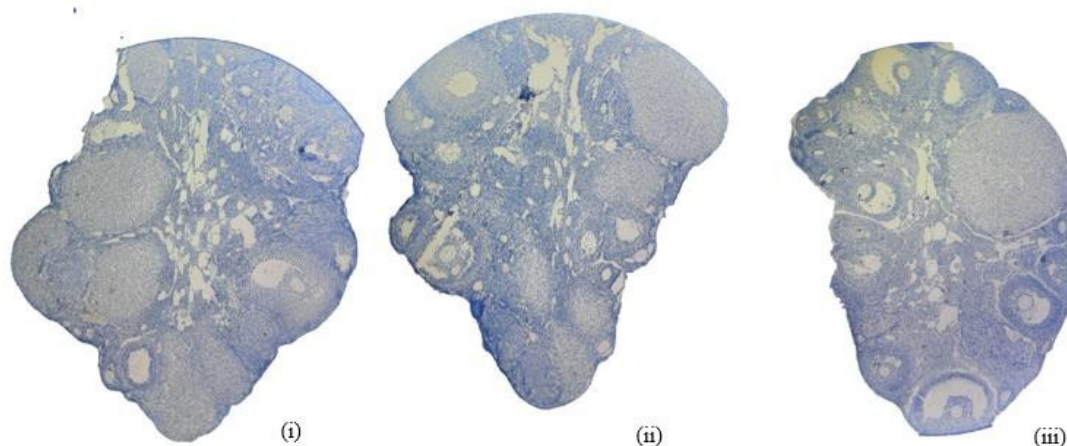


Fig. supplémentaire 2 Ovaires représentatifs des contrôles négatifs des anticorps dirigés contre les isoformes d'Akt.

Les ovaires des souris enrobés dans la paraffine ont été sectionnés en des coupes de 5 μm . Ils ont été incubés avec des Ig G en concentrations équivalentes à celles des différents anticorps utilisés, comme décrit dans matériel et méthodes. Ils ont servi comme des contrôles négatifs aux anticorps : (i) pour anti-Akt1, (ii) pour anti-Akt2 et (iii) pour anti-Akt3.