



## Open Archive Toulouse Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 23872

### To cite this version:

Sautier, Lucile . *Le rôle crucial des effets membranaires du récepteur aux oestrogènes  $\alpha$  dans la fonction ovarienne et la fertilité : étude expérimentale à partir du premier modèle murin d'inactivation des effets membranaires du  $\text{E}\alpha$* . Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2018, 109 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: [tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr](mailto:tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr)

---

# LE RÔLE CRUCIAL DES EFFETS MEMBRANAIRES DU RÉCEPTEUR AUX ŒSTROGÈNES ER $\alpha$ DANS LA FONCTION OVARIENNE ET LA FERTILITÉ :

## Étude expérimentale à partir du premier modèle murin d'inactivation des effets membranaires du ER $\alpha$

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul Sabatier de Toulouse*

*par*

**SAUTIER Lucile**

Née le 30 décembre 1987 à Langres (52)

---

**Directrice de thèse : Mme Isabelle RAYMOND-LETRON**

---

### JURY

PRESIDENT

**M. Jean-François ARNAL**

Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS

**Mme Isabelle RAYMOND-LETRON**

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Mme Sylvie CHASTANT-MAILLARD**

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITEE

**Mme Françoise LENFANT**

Directrice de Recherche à l'Institut des Maladies  
Métaboliques et Cardiovasculaires de TOULOUSE



*Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département.*

Mise à jour : 03/11/2017

**DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN**

ELEVAGE ET PRODUITS/SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRINAIRE	SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES	SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS
<p><b>Responsable : M. SANS</b></p> <p><u>ALIMENTATION ANIMALE :</u> M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p><u>EPIDEMIOLOGIE :</u> Mathilde PAUL, MC</p> <p><u>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE :</u> M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHSIRA Emilie, MC</p> <p><u>HYGIÈNE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS :</u> M. BRUGERE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laure, MCC</p> <p><u>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION :</u> M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DES RUMINANTS :</u> M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIÈRE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, PR M. MEYER Gilles, PR</p> <p><u>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVIAIRE ET PORCINE :</u> Mme WARET-SZKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p><u>PRODUCTIONS ANIMALES AMÉLIORATION GÉNÉTIQUE ÉCONOMIE :</u> M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p>	<p><b>Responsable : Mme GAYRARD</b></p> <p><u>ANATOMIE :</u> M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNEREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC</p> <p><u>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE :</u> M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, PR Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR M. GAIDE Nicolas, AERC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, MC</p> <p><u>MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES :</u> M. MILON Alain, PR M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, MC Mme DANIELS Hélène, MC</p> <p><u>BIOSTATISTIQUES :</u> M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p><u>PHARMACIE-TOXICOLOGIE :</u> M. PETIT Claude, PR Mme CLAUW Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p><u>PHYSIOLOGIE –PHARMACOLOGIE THERAPEUTIQUE :</u> M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p><u>BIOCHIMIE :</u> Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p><u>ANGLAIS :</u> M. SEVERAC Benoît, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p>	<p><b>Responsable : Mme CADIERGUES</b></p> <p><u>ANESTHESIOLOGIE</u> M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p><u>CHIRURGIE :</u> M. AUTEFAGE André, PR M. ASIMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p><u>MEDECINE INTERNE :</u> Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC</p> <p><u>OPHTALMOLOGIE :</u> M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p><u>DERMATOLOGIE :</u> Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p><u>IMAGERIE MEDICALE</u> M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p><u>BIOLOGIE MEDICALE :</u> Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p><u>PATHOLOGIE DES EQUIDES :</u> M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme LALLEMAND Elodie, AERC</p>



## REMERCIEMENTS

**A Monsieur le Professeur Jean-François ARNAL,**

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier de l'Université Paul Sabatier, de la Faculté  
de Médecine et du CHU de Toulouse  
Responsable scientifique de l'équipe 9 – I2MC – UMR1048 – INSERM  
*Physiologie Médicale*

Pour nous avoir accueilli dans votre unité,  
Pour nous avoir fait l'honneur de présider notre jury de thèse,  
Hommages respectueux.

**A Madame le Docteur Isabelle RAYMOND-LETRON,**

Professeure de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
*Anatomie Pathologique*

Pour nous avoir fait l'honneur de diriger cette thèse,  
Soyez assurée de notre gratitude pour votre soutien durant les années de formation initiale et  
de spécialisation vétérinaires.

**A Madame le Professeur Sylvie CHASTANT-MAILLARD,**

Professeure de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
*Pathologie de la Reproduction*

Pour nous avoir fait l'honneur de participer à notre jury de thèse,  
Sincères remerciements pour l'intérêt que vous portez à notre travail.

**A Madame le Docteur Françoise LENFANT,**

Directrice de Recherche de l'équipe 9 – I2MC – UMR1048 – INSERM

Pour nous avoir fait l'honneur de nous intégrer à votre passionnant domaine de recherche,  
Pour votre aide précieuse et votre gentillesse tout au long de notre travail,  
Veuillez trouver ici notre profonde reconnaissance.

**A Madame le Docteur Marine ADLANMERINI,**

Post-doctorante de l'IDOM, Ecole de Médecine de Perelman, Université de Pennsylvanie

Pour votre disponibilité, votre enthousiasme et votre confiance dans les projets que vous  
portez et auxquels vous nous avez associées,  
Soyez assurée de notre sincère estime.

Je tiens à remercier les personnes avec qui j'ai eu plaisir à travailler dans le cadre de mon Master II « Biologie intégrative et Toxicologie » :

**Marie-José Fouque** et **Guy Carcasses**, pour leurs soins quotidiens auprès des souris, et pour nos échanges matinaux toujours empreints de bienveillance et de bonne humeur.

**Céline Bleuart** et **Isabelle Pardo** du laboratoire d'Histologie de l'ENVT, pour votre disponibilité et votre assistance scientifique.

**Romain Solinhac**, pour ta compagnie apaisante au sein du bureau des doctorants et pour les footings le long de la Garonne.

**Frédéric Boudou**, pour tes explications sur la PCR et pour ta gentillesse.

**Aurélié Fabre**, **Anne Abot**, **Sandra Handgraaf**, **Mélissa Buscato** pour avoir aussi contribué à rendre mon accueil chaleureux au sein de l'équipe.

**Martine Clauw**, Professeure de Pharmacie-Toxicologie à l'ENVT, pour tous vos conseils prodigués.

De façon plus générale, je tiens à remercier tout le **corps enseignant de l'ENVT** qui m'a offert une formation initiale vétérinaire diversifiée, et qui m'a permis de réaliser des stages toujours plus intéressants. J'ai beaucoup appris en vous lisant et en vous écoutant.

Je remercie aussi l'équipe pédagogique de la formation spécialisée en Anatomie Pathologique à Alfort, et plus particulièrement le **Professeur Jean-Jacques Fontaine** pour son soutien dans les épreuves difficiles.



## Serment de Bourgelat

FIDÈLEMENT ATTACHÉ AUX DIRECTIVES FIXÉES AUX ÉLÈVES  
DES ÉCOLES ROYALES VÉTÉRINAIRES DE FRANCE PAR CLAUDE BOURGELAT,  
INSPECTEUR GÉNÉRAL, EN L'ARTICLE 19 DU RÈGLEMENT  
POUR CES ÉCOLES DE 1777 ET AINSI EXPRIMÉES :

“Toujours imbus des principes d'honnêteté qu'ils auront puisés  
et dont ils auront vu des exemples dans les Ecoles,  
ils ne s'en écarteront jamais. Ils distingueront le pauvre du riche.  
Ils ne mettront point à un trop haut prix des talents  
qu'ils ne devront qu'à la bienfaisance et à la générosité  
de leur patric. Enfin, ils prouveront par leur conduite  
qu'ils sont tous également convaincus que la fortune consiste  
moins dans le bien que l'on a que dans celui que l'on peut faire.”

*“Je promets et je jure devant le Conseil de l'Ordre des Vétérinaires  
de conformer ma conduite professionnelle aux règles prescrites  
par le code de déontologie et d'en observer en toute circonstance  
les principes de correction et de droiture.  
Je fais le serment d'avoir à tout moment et en tout lieu le souci constant  
de la dignité et de l'honneur de la profession vétérinaire.”*



# Table des matières

<b>Introduction .....</b>	<b>17</b>
<b>PARTIE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>21</b>
<b>1 Le cycle œstral aux niveaux central et périphérique .....</b>	<b>21</b>
1.1 La régulation centrale du cycle œstral : l'axe hypothalamo-hypophysaire .....	21
1.2 Le cycle œstral au niveau périphérique.....	26
1.2.1 Cycle ovarien .....	28
1.2.2 Cycles utérin et vaginal : intérêt pour le suivi du cycle œstral .....	32
<b>2 Structure et mécanismes d'action du ER<math>\alpha</math> .....</b>	<b>36</b>
2.1 Organisations génique et protéique du ER $\alpha$ .....	36
2.2 Mécanismes d'action nucléaire du ER $\alpha$ .....	38
2.2.1 Activation de la transcription ligand-dépendante et ERE-dépendante (voie génomique classique) .....	38
2.2.2 Activation de la transcription ligand-dépendante et ERE-indépendante (voie génomique non classique) .....	38
2.2.3 Activation ligand-indépendante (autre voie génomique non classique) .....	39
2.3 Mécanismes d'action membranaire du ER $\alpha$ .....	39
<b>3 Modèles murins et stratégies pharmacologiques: apports sur la compréhension des effets nucléaires et membranaires du ER<math>\alpha</math>.....</b>	<b>41</b>
3.1 Les outils pharmacologiques.....	42
3.2 Les modèles murins transgéniques .....	44
3.2.1 Préliminaires sur les remaniements ciblés du génome.....	44
3.2.2 Des modèles déficients pour la totalité du récepteur ER $\alpha$ .....	45
3.2.3 Des modèles mutés au niveau du domaine de liaison à l'ADN du ER $\alpha$ .....	48
3.2.4 Un modèle muté au niveau du domaine de liaison au ligand du ER $\alpha$ .....	48
3.2.5 Des modèles mutés au niveau de la région de transactivation AF1 ou AF2 du ER $\alpha$ ....	49
3.2.6 Un modèle muté pour une surexpression du domaine de liaison au ligand du ER $\alpha$ .....	50

<b>PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>54</b>
<b>1 Introduction.....</b>	<b>54</b>
<b>2 Matériel et méthodes .....</b>	<b>55</b>
2.1 Animaux et génotypes.....	55
2.2 Fécondité des souris femelles ER $\alpha$ -C451A .....	56
2.3 Étude du cycle œstral .....	56
2.4 Histologie, morphométrie et immunohistochimie de l’ovaire .....	58
2.4.1 Histologie .....	58
2.4.2 Immunohistochimie .....	60
2.4.3 Morphométrie .....	64
2.5 Dosages hormonaux.....	64
2.6 Analyses statistiques .....	65
<b>3 Résultats.....</b>	<b>66</b>
3.1 Reproduction et cyclicité sexuelle : les souris ER $\alpha$ -C451A sont infécondes et présentent une anomalie du cycle œstral à l’âge adulte, différente des mutants ER $\alpha$ - AF2 <sup>o</sup> et ER $\alpha$ <sup>-/-</sup> .....	66
3.2 Histopathologie et morphométrie de l’ovaire : les souris ER $\alpha$ -C451A présentent une altération de la folliculogénèse, plus tard que les souris ER $\alpha$ <sup>-/-</sup> .....	70
3.3 Régulation de la fonction ovarienne : les souris ER $\alpha$ -C451A présentent une altération partielle du rétrocontrôle négatif des œstrogènes .....	77
<b>4 Discussion générale et perspectives .....</b>	<b>79</b>
4.1 A propos de l’acyclicité œstrale.....	80
4.2 A propos du défaut de folliculogénèse.....	81
4.3 A propos du dérèglement de la fonction ovarienne .....	85
4.4 Implications cliniques .....	86
<b>Conclusion.....</b>	<b>88</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>91</b>

<b>Annexes .....</b>	<b>99</b>
Annexe 1. Protocole de coloration histologique à l'Hémalun-Eosine.....	<b>99</b>
Annexe 2. Fiche technique pour l'immunohistochimie Ki-67 .....	<b>100</b>
Annexe 3. Génotypage des lignées de souris transgéniques .....	<b>101</b>
Annexe 4. Exemple d'image digitale de coupe histologique d'ovaire de souris avec annotations morphométriques.....	<b>103</b>
Annexe 5. Exemple de tableau de données brutes de dénombrement folliculaire ovarien	<b>104</b>
Annexe 6. Résultats des comparaisons entre souches de souris WT permettant de les combiner en un seul génotype "ER $\alpha$ -WT" .....	<b>105</b>
Annexe 7. Poster présenté au congrès "Mouse Models of Disease: Using pathology techniques to enhance phenotyping outcomes" .....	<b>106</b>
Annexe 8. Résumé de l'article publié dans PNAS .....	<b>107</b>

## Liste des figures

Figure 1 : L'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique chez la femelle mammifère.....	22
Figure 2 : Rétrocontrôles de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique et profils hormonaux pendant le cycle œstral chez la femme et la souris .....	25
Figure 3 : Dissection de l'appareil génital de souris femelle sexuellement mature .....	27
Figure 4 : Vue d'ensemble d'une section histologique d'ovaire de souris sexuellement mature .....	28
Figure 5 : Vue détaillée d'une section histologique d'ovaire de souris sexuellement mature et principaux types de follicules ovariens .....	31
Figure 6 : Structures génique, transcriptionnelle, traductionnelle et post-traductionnelle du ER $\alpha$ .....	37
Figure 7 : Représentation schématique des mécanismes d'action du ER $\alpha$ dans la cellule .....	39
Figure 8 : Cas de mutations spontanées du ER $\alpha$ publiés chez l'Homme.....	42
Figure 9 : Représentation des actions de composés pharmacologiques sur les voies de signalisation du ER $\alpha$ dans la cellule.....	43
Figure 10 : Résumé des stratégies de manipulation génétique du récepteur ER $\alpha$ .....	47
Figure 11 : Diagramme d'identification du stade œstral murin .....	58
Figure 12 : Frottis vaginal des souris en regard de l'histologie vaginale au cours du cycle œstral .....	59
Figure 13 : Exemple d'identification de follicules sains ou atrétiques par évaluation immunohistochimique de l'épitope Ki-67 sur coupe sériée d'ovaire.....	61
Figure 14 : Illustration des différentes classes de follicules ovariens .....	63
Figure 15 : Pourcentages moyens de jours passés dans chaque phase du cycle œstral pour les mutants étudiés et leurs contrôles à 5 semaines d'âge .....	67
Figure 16 : Changements de phase du cycle œstral observés pendant 14 jours pour les mutants étudiés et leurs contrôles à 5 semaines d'âge .....	68
Figure 17 : Pourcentages moyens de jours passés à chaque phase du cycle œstral pour les mutants ER $\alpha$ -C451A et leurs contrôles à 26 semaines d'âge.....	69
Figure 18 : Changements de phase du cycle œstral observés pendant 14 jours pour les mutants ER $\alpha$ -C451A et leurs contrôles à 26 semaines d'âge .....	70

Figure 19 : Sections histologiques d'ovaires et comptages folliculaires pour les mutants ER $\alpha$ -C451A, ER $\alpha$ <sup>-/-</sup> et leurs contrôles à 4 semaines d'âge .....	71
Figure 20 : Photographies des ovaires d'une souris contrôle et d'une mutante ER $\alpha$ -C451A à 12 semaines d'âge .....	72
Figure 21 : Sections histologiques d'ovaires et comptages folliculaires pour les mutants étudiés et leurs contrôles à 12 semaines d'âge .....	73
Figure 22 : Aires relatives des couches des cellules de la granulosa et de la thèque dans les follicules tertiaires pour les mutants étudiés et leurs contrôles à 12 semaines d'âge.....	75
Figure 23 : Aspect histologique représentatif des glandes interstitielles du stroma ovarien pour les mutants étudiés et leurs contrôles .....	76
Figure 24 : Réponses du taux sérique de LH à l'ovariectomie pour les mutants étudiés et leurs contrôles .....	78

<b>Liste des encadrés</b>
---------------------------

Encadré 1 : La synthèse d'œstrogènes à l'échelle du follicule ovarien.....	32
Encadré 2 : Cycle œstral, histologie et cytologie vaginales chez la souris .....	34

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales caractéristiques des hormones de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique chez la femelle mammifère.....	23
Tableau 2 : Synthèse des différents modèles murins transgéniques de déficience du ER $\alpha$ ou de découplage des effets membranaires et des effets nucléaires du ER $\alpha$ : caractéristiques phénotypiques ovariennes et hormonales.....	52
Tableau 3 : Modèles murins inclus dans l'étude expérimentale pour dissocier les effets membranaires et nucléaires du ER $\alpha$ dans la fertilité.....	55
Tableau 4 : Critères de classification des follicules ovariens de souris .....	62
Tableau 5 : Effectifs de souris par génotype pour les mesures effectuées à différents âges....	65
Tableau 6 : Taux de reproduction des mutants ER $\alpha^{+/C451A}$ , ER $\alpha^{+/-}$ , et ER $\alpha$ -C451A à l'issue d'une période d'accouplement continue de 5 mois .....	66
Tableau 7 : Moyennes (avec erreur standard) des taux d'hormones chez les différents génotypes de souris à 12 semaines d'âge. ....	77
Tableau 8 : Synthèse du phénotypage des mutants murins évalués dans cette thèse.....	80

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**AF1** : "Activation Function 1" ; fonction de transactivation 1 (contenue dans le domaine A/B du récepteur)

**AF2** : "Activation Function 2" ; fonction de transactivation 2 (contenue dans le domaine E (LBD) du récepteur)

**AMPc** : Adénosine MonoPhosphate cyclique, faisant partie des seconds messagers intracellulaires

**AP1** : "Activator Protein 1" ; protéine activatrice 1, facteur de transcription hétérodimérique composé de protéines appartenant notamment aux familles c-fos et c-jun

**ARN** : Acide RiboNucléique

**BSA** : "Bovine Serum Albumin" ; albumine de sérum bovin

**BPA** : Bisphénol A

**DBD** : "DNA Binding Domain" ; domaine de fixation à l'ADN du récepteur nucléaire

**E2** : 17 $\beta$ -œstradiol

**EDC** : "Endogen Dendrimer Conjugate" ; œstrogène conjugué à un dendrimère

**EGF** : "Epidermal Growth Factor" ; facteur de croissance épidermique

**eNOS** : "endothelial Nitric Oxide Synthase" ; oxyde nitrique synthase endothélial

**ENERKI** : "Estrogen Non responsive Estrogen Receptor alpha Knock-In" ; modèle murin transgénique affectant la voie ERE-dépendante du ER $\alpha$

**ENVT** : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

**ER $\alpha$**  : "Estrogen Receptor  $\alpha$ " ; récepteur aux œstrogènes  $\alpha$

**ER $\alpha$ <sup>-/-</sup>** : Modèle murin transgénique totalement déficient pour ER $\alpha$

**ER $\alpha$ -AF1<sup>o</sup>** : Modèle murin transgénique inactivé pour le domaine AF1 du ER $\alpha$

**ER $\alpha$ -AF2<sup>o</sup>** : Modèle murin transgénique inactivé pour le domaine AF2 du ER $\alpha$

**ER $\alpha$ -C451A** ; Modèle murin transgénique inactivé pour les effets membranaires du ER $\alpha$  par substitution d'un acide aminé du ER $\alpha$  (la Cystéine 451) en un autre (Alanine)

**ER $\beta$**  : "Estrogen Receptor  $\beta$ " ; récepteur aux œstrogènes  $\beta$

**ERE** : "Estrogen Response Element" ; élément de réponse aux œstrogènes

**ERK-1 / -2** : "Extracellular signal-regulated kinases" ; kinases régulées par un signal extracellulaire

**ESR1** (gène) : "EStrogen Receptor 1" ; gène du ER $\alpha$

**GnRH** : "Gonadotropin Releasing Hormone" ; gonadolibérine ou hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires

**GPR** : "G Protein-coupled Receptor" ; récepteur couplé aux protéines G

**FSH** : Hormone Folliculo-Stimulante

**H2NES** : "Hinge 2 Nuclear Export Sequence" ; modèle murin transgénique muté au niveau du domaine D du ER $\alpha$

**hER $\alpha$**  : ER $\alpha$  humain

**HE** (coloration) : Coloration Hématoxyline-Eosine

**HHG** (axe) : axe Hypothalamo-Hypophysaire-Gonadique

**HSP** : "Heat Shock Protein" ; protéine de choc thermique

**I2MC** : Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

**IDOM** : "Institute for Diabetes, Obesity and Metabolism"

**IGF-1** : "Insulin-like Growth factor-1" ; facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline

**INSERM** : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

**IP3** : inositol triphosphate, faisant partie des seconds messagers intracellulaires

**KI** : "knock-in" ; inactivation d'un gène et introduction d'un gène d'intérêt

**KO** : "knock-out" ; inactivation d'un gène

**LH** : Hormone Lutéinisante

**LBD** : "Ligand Binding Domain" ; domaine de liaison au ligand du récepteur nucléaire

**MAP-kinases** : "Mitogen Activated Proteins" ; protéines kinases nécessaires à l'induction de la mitose

**MCE** : "Microchip Capillary Electrophoresis"

**mER $\alpha$**  : ER $\alpha$  murin

**MISS** : "Membrane Initiated Steroid Signaling" ; signalisation stéroïdienne initiée à la membrane

**MOER** : "Membrane Only ER" ; modèle murin transgénique pour exprimer seulement le domaine E du ER $\alpha$

**mRNA** : "messenger RiboNucleic Acid" ; ARN messager

**NERKI** : "Non classical ER Knock-In" ; modèle murin transgénique de ER $\alpha$  obtenu par deux mutations du domaine de liaison à l'ADN du ER $\alpha$

**PaPE** : "Pathway Preferential Estrogens" ; voie préférentielle des œstrogènes

**PNAS** : "Proceedings of the National Academy of Sciences"

**PCR** : "Polymerase Chain Reaction" ; amplification en chaîne par polymérase

**PBS** : "Phosphate Buffer Saline" ; tampon phosphate salin

**RITA** : "Registry of Industrial Toxicology Animal-data"

**RTK** : "Receptor Tyrosine Kinase" ; récepteur à activité tyrosine kinase

**SERM** : "Selective Estrogen Receptor Modulator" ; modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes

**SOPK** : Syndrome des Ovaires Polykystiques

**Sp1** : "Specificity protein 1" ; facteur de transcription encodé par le gène SP1

**UMR** : Unité Mixte de Recherche

**WT** : "Wild-Type" ; type naturel ou sauvage



## Introduction

Au cours de la vie des femelles mammifères, les œstrogènes ont un rôle essentiel sur la fonction reproductrice et sur le développement-maintien des caractères sexuels secondaires. La régulation de la sécrétion d'œstrogènes est indispensable au bon fonctionnement du système reproducteur. Par exemple un dérèglement du ratio androgènes/œstrogènes est fréquemment associé au syndrome des ovaires polykystiques responsable d'infertilité. Les changements des taux d'œstrogènes sont aussi critiques vis-à-vis de nombreux processus physiologiques extra-ovariens. En particulier, chez la femme, le déclin de la sécrétion d'œstrogènes lors de la ménopause favorise le développement de l'ostéoporose ou de maladies coronariennes tandis que l'exposition des cellules mammaires à de fortes concentrations d'œstrogènes favorise l'apparition et la progression de cancers du sein hormonodépendants (Russo et Russo 2006). L'administration d'équivalents exogènes de synthèse est depuis longtemps une voie privilégiée non seulement pour mettre en place des stratégies de contraception mais aussi pour traiter des désordres liés à des taux bas d'œstrogènes naturels (traitements hormonaux de substitution). Actuellement les œstrogènes de synthèse représentent une large part des prescriptions médicales ; sur la période d'avril 2014 à mars 2015, six médicaments parmi les cent plus prescrits aux Etats-Unis contenaient de l'éthinylœstradiol ou des œstrogènes équins conjugués comme moyen de contraception ou pour prendre en charge les symptômes de la ménopause (Brown 2015). Toutefois étant donné la multitude d'effets des œstrogènes dépendant de leur concentration, du temps et du lieu d'action, la mise en place d'un traitement œstrogénique peut s'avérer être un véritable cas de Dr. Jekyll et Mr. Hyde. Il est difficile d'induire les effets bénéfiques des œstrogènes (prévention de l'ostéoporose, de l'athérosclérose, du diabète de type 2...) sans favoriser leurs effets délétères (développement des cancers de l'utérus, du sein...). Une voie alternative consiste alors à moduler l'action des œstrogènes au niveau des cellules de l'organisme en ciblant des protéines auxquelles les œstrogènes se lient (les récepteurs aux œstrogènes). De tels traitements modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes (ou communément **SERM** pour "Selective Estrogen Receptor Modulator") visent ainsi à sélectionner les effets bénéfiques recherchés des œstrogènes parmi les effets possibles. Cependant, les SERMs disponibles à ce jour (*e.g.* Tamoxifène, Raloxifène, Bazédoxifène) ainsi que certains traitements œstrogéniques ont des effets controversés. Par exemple, dans le cadre de traitements hormonaux de substitution à la ménopause (*e.g.* Herrington et Klein 2001 ;

Mirkin et Komm 2013) et de traitements de l'infertilité ou de contraception (Christakou *et al.* 2014), un risque de thrombose veineuse et d'accidents vasculaires cérébraux pourrait être augmenté. Une augmentation du risque prolifératif de l'endomètre est aussi avancée pour des traitements de l'infertilité liée aux ovaires polykystiques (Dos Santos Silva *et al.* 2009) et pour des traitements du cancer du sein hormonodépendant (Lenfant *et al.* 2012). Dans ce contexte, l'identification de voies d'action thérapeutique permettant une modulation plus sélective des effets des œstrogènes nécessite une compréhension plus fine de leurs mécanismes d'action moléculaire et de leur expression phénotypique.

Actuellement les récepteurs spécifiques aux œstrogènes sont la cible privilégiée de la plupart des thérapies œstrogéniques. Comme la majorité des hormones, les œstrogènes (plus particulièrement le 17 $\beta$ -œstradiol (**E2**)) agissent sur les cellules pourvues de récepteurs spécifiques en s'y liant, ce qui provoque la transcription de nombreux gènes qui sont ensuite traduits pour médier la réponse physiologique du message hormonal. Les œstrogènes sont classiquement connus pour agir principalement *via* deux récepteurs : **ER $\alpha$**  et **ER $\beta$**  (acronymes de la dénomination anglaise "Estrogen Receptor  $\alpha$ " et "Estrogen Receptor  $\beta$ ", respectivement), largement décrits et caractérisés comme des récepteurs nucléaires. Ces récepteurs spécifiques ont un rôle principal dans la production des effets œstrogéniques dans l'organisme, y compris les effets indésirables comme la prolifération de cellules cancéreuses. Ils ont été découverts à la fin des années 1950 (Jensen et DeSombre 1973), ce qui a révolutionné le traitement du cancer du sein en permettant la mise au point de thérapies bloquant l'action des œstrogènes plutôt que le retrait des organes reproducteurs (ovaires) qui représentait le principal recours jusqu'alors (Jensen *et al.* 2010). Les œstrogènes ont longtemps été considérés comme agissant dans le seul cadre de la voie génomique, c'est-à-dire *via* une série de processus bien connus se déroulant sur plusieurs heures : entrée de l'œstrogène dans la cellule, translocation dans le noyau, interaction avec le récepteur aux œstrogènes, liaison à l'ADN puis activation de la transcription des gènes de réponse aux œstrogènes (Collins et Webb 1999). Or depuis près de cinquante ans, plusieurs travaux ont montré des effets rapides des œstrogènes (de l'ordre de quelques secondes ou quelques minutes) par une voie différente de la voie d'action classique des hormones stéroïdiennes (Szego et Davis 1967). Ce type de réponse a notamment été observé dans les cellules de différents tissus sans action nucléaire (*e.g.* dans les cellules de la granulosa chez le poulet et le cochon (Morley *et al.* 1992), dans des neurones du neostriatum chez le rat (Mermelstein *et al.* 1996)). Plus tard, d'autres études *in vitro* ont confirmé l'existence d'une voie non-génomique impliquant les récepteurs aux œstrogènes localisés dans la membrane

plasmique (revue par Björnström et Sjöberg (2005), Heldring *et al.* (2007)). Ainsi, on s'accorde aujourd'hui à définir deux grandes voies classiques de signalisation œstrogénique : la voie nucléaire/génomique, et la voie membranaire/non-génomique/des effets **MISS** (pour "Membrane Initiated Steroid Signaling"). Jusqu'à présent les mécanismes de la voie non-génomique de signalisation des œstrogènes sont surtout connus à l'échelle de la cellule alors qu'à l'échelle de l'organisme, les rôles de cette voie sur les fonctions biologiques (en particulier la reproduction) sont encore peu identifiés. Des recherches *in vivo* sont donc nécessaires pour considérer directement toute la complexité des mécanismes d'action des ERs dans l'organisme.

Dans cette thèse, je présente une étude expérimentale pour étudier le rôle des effets membranaires du ER $\alpha$  dans la fertilité femelle, et plus particulièrement dans la fonction ovarienne. Pour cela j'ai utilisé un modèle de souris génétiquement modifié développé par mon équipe d'accueil. Ce nouveau modèle a permis d'évaluer pour la première fois directement *in vivo* le rôle du ER $\alpha$  membranaire et donc des effets MISS. Ces souris sont appelées **ER $\alpha$ -C451A** car la mutation induite dans leur génome provoque la substitution d'un acide aminé du ER $\alpha$  (la Cystéine 451) en un autre (Alanine). Cette mutation ponctuelle empêche une modification post-traductionnelle du récepteur (la palmylation) et ainsi, empêche son adressage membranaire, comme cela a été démontré *in vitro* (Pedram *et al.* 2007). Dans mes travaux j'ai comparé les résultats obtenus des souris ER $\alpha$ -C451A avec ceux de souris contrôles non mutées ("Wild-Type" ou **WT**), mais aussi avec deux autres modèles murins transgéniques générés par mon équipe d'accueil : l'un étant totalement déficient pour ER $\alpha$  (**ER $\alpha$ <sup>-/-</sup>**) et l'autre n'exprimant pas le domaine de transcription ligand-dépendant du ER $\alpha$  au rôle capital dans les effets dits génomiques (**ER $\alpha$ -AF2<sup>o</sup>**). Tous ces modèles murins se concentrent sur l'étude du rôle du récepteur ER $\alpha$ . Bien que le récepteur ER $\beta$  semble aussi essentiel pour la reproduction, le récepteur ER $\alpha$  apparaît plus largement impliqué, notamment *via* le maintien de l'homéostasie de nombreux tissus extra-reproducteurs (Antal *et al.* 2008). Excepté dans les ovaires, ER $\alpha$  est plus abondant que ER $\beta$  dans tous les tissus reproducteurs (Couse *et al.* 1997). En outre, il a déjà été démontré que des souris totalement déficientes pour ER $\alpha$  sont complètement infertiles au contraire des souris déficientes pour ER $\beta$ , pour lesquelles les anomalies du tractus reproducteur sont beaucoup moins sévères (Couse *et al.* 2003). De plus, chez la femme, les connaissances actuelles indiquent que les rétrocontrôles positif et négatif exercés par l'E2 au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse sont médiés par ER $\alpha$  plutôt que ER $\beta$  (Christian *et al.* 2008). Dans cette thèse, je me limite à l'implication du ER $\alpha$  dans la fertilité féminine. On peut noter toutefois que ER $\alpha$  est aussi impliqué dans la fertilité masculine (Eddy *et al.* 1996), notamment

dans la fonction testiculaire, la production de testostérone, et les comportements sexuels (McDevitt *et al.* 2008, Micevych *et al.* 2009).

Dans la **partie I** de ce manuscrit, à partir de la littérature je rappelle quelques fondamentaux de physiologie de la reproduction femelle permettant de situer les différentes implications des œstrogènes dans le système nerveux central, dans l'appareil génital et plus précisément dans l'ovaire (1.1). A l'échelle de la cellule, je décris brièvement ensuite les mécanismes d'action du récepteur aux œstrogènes ER $\alpha$  (1.2). Je montre enfin les apports des modèles murins transgéniques sur la compréhension du rôle du ER $\alpha$  dans la fertilité et le phénotype ovarien (1.3).

Dans la **partie II**, je rapporte les travaux expérimentaux que j'ai réalisés au sein de mon équipe d'accueil pour dissocier les effets nucléaires et membranaires du ER $\alpha$  dans la fertilité et le phénotype ovarien.

Je finis par discuter les limites de ces travaux, leurs apports sur la connaissance des effets MISS du ER $\alpha$  et les perspectives.

# PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

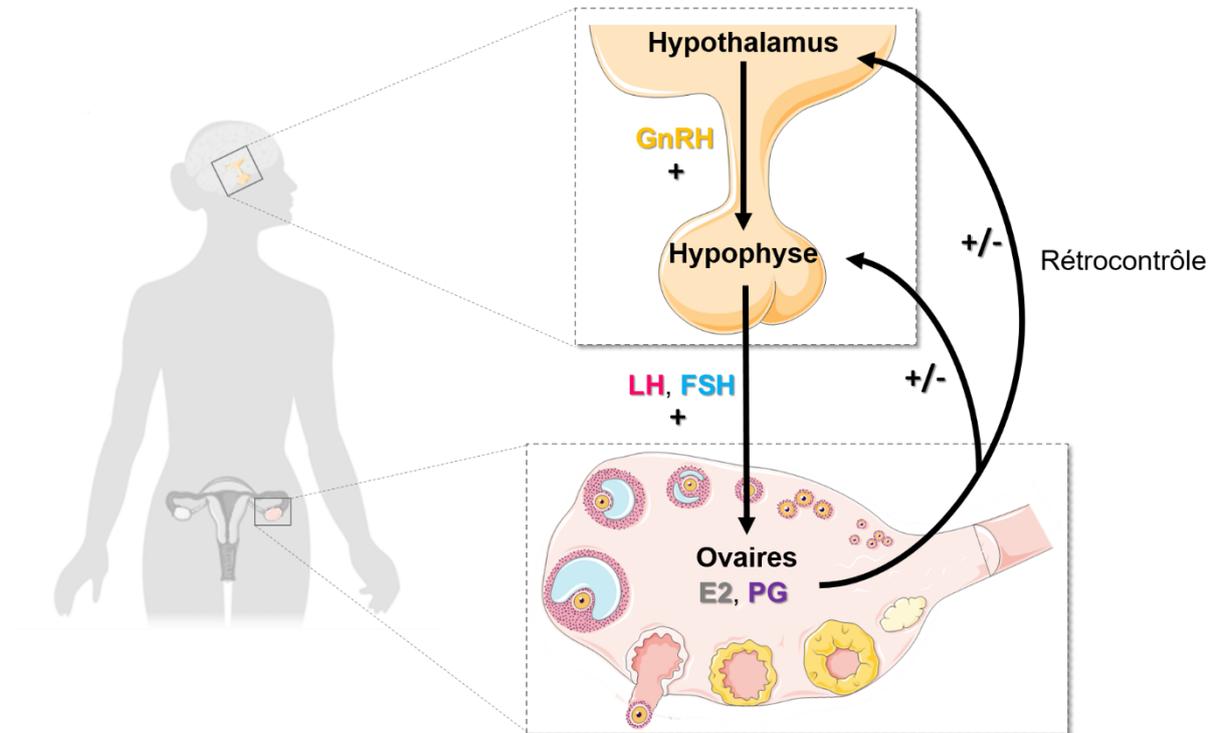
## 1 Le cycle œstral aux niveaux central et périphérique

### 1.1 La régulation centrale du cycle œstral : l'axe hypothalamo-hypophysaire

La reproduction représente le mécanisme fondamental permettant à une espèce de se perpétuer. A l'échelle de l'organisme ce but évolutif est inscrit dans les gènes et sa mise en œuvre repose sur un système complexe de régulation impliquant différents organes et tissus. Chez les vertébrés la coordination des métabolismes liés à la reproduction est communément reliée à l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique (**HHG**). Une visualisation du fonctionnement normal de cet axe est nécessaire pour comprendre la fonction de reproduction et les phénotypes anormaux. Actuellement les connaissances sur la physiologie neuroendocrine de l'axe HHG sont en grande partie dérivées d'essais réalisés chez le rongeur et le singe, dont les résultats ont été translatés et en partie validés dans l'espèce humaine (Herbison 2005). Ces connaissances sont détaillées dans de nombreuses publications (*e.g.* Plant 2015 ; Beshay et Carr 2013). Ici je rappelle les éléments fondamentaux de l'axe HHG illustrant l'implication des œstrogènes dans la régulation centrale de la reproduction femelle.

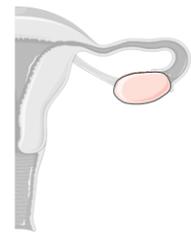
Chez les mammifères femelles sexuellement matures, la fonction ovarienne assure de façon cyclique la formation d'un ou plusieurs oocytes fécondables (ovogénèse) dans l'ovaire et leur libération dans l'oviducte. L'influence de l'environnement sur la production des gamètes femelles peut varier entre espèces (*e.g.* reproduction saisonnière ou non, ovulation spontanée ou déclenchée par la saillie) mais de façon générale l'axe HHG constitue le lien central entre les signaux endogènes et exogènes intégrés, et leur retranscription par des sécrétions modulées de la gonadolibérine (**GnRH**) et d'hormones gonadotropes (ou gonadotrophines, *i.e.* l'hormone folliculo-stimulante (**FSH**) et l'hormone lutéinisante (**LH**)). Cet axe comporte trois grands types d'hormones sécrétées par trois glandes (**Tableau 1**). Les gonadotrophines sécrétées par l'adénohypophyse régulent au niveau des ovaires la croissance et la maturation des follicules contenant les oocytes (folliculogénèse), ainsi que la synthèse concomitante d'hormones stéroïdiennes sexuelles (*i.e.* E2, progestérone, testostérone). En retour, ces hormones stéroïdiennes ont une action de rétrocontrôle (négatif ou positif) sur l'activité neuroendocrine centrale au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse (**Figure 1**) détaillée par la suite. Les

hormones stéroïdiennes agissent aussi au niveau de l'utérus en stimulant la croissance de l'endomètre nécessaire à la nidation de l'embryon.



**Figure 1 : L'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique chez la femelle mammifère.** GnRH = gonadolibérine ; LH = hormone lutéinisante ; FSH = hormone folliculo-stimulante ; E2 = 17 $\beta$ -œstradiol ; PG = progestérone. Les hormones sont liées par des relations d'inhibition (-) ou de stimulation (+), ou les deux mais à différentes phases du cycle œstral. [Réalisation personnelle, banque d'images Servier Medical Art – licence Creative Common Attribution 3.0 France et Openclipart – Creative Commons Zero 1.0 License]

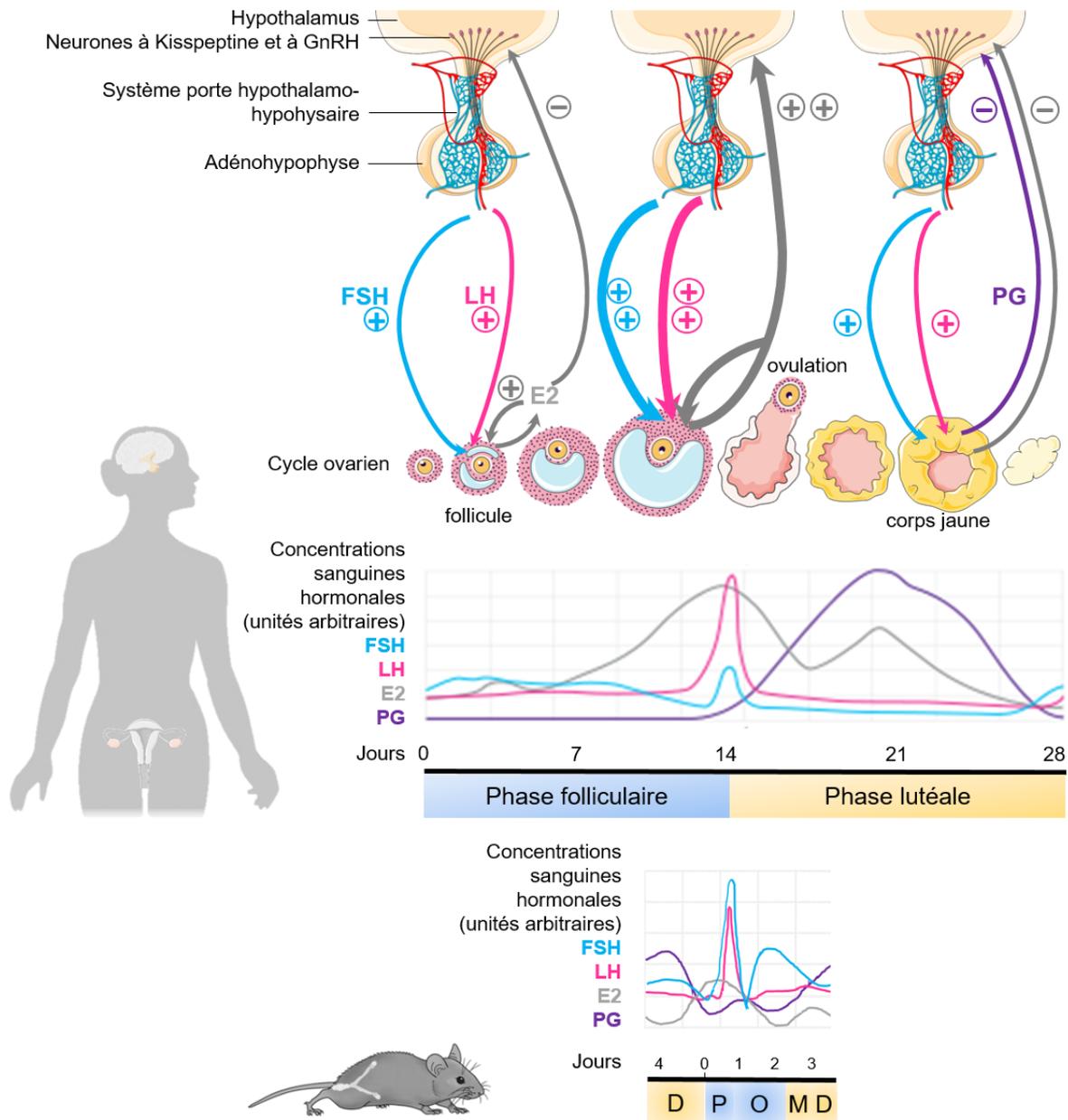
**Tableau 1 : Principales caractéristiques des hormones de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique chez la femelle mammifère.** [Réalisation personnelle, banque d'images Servier Medical Art – licence Creative Common Attribution 3.0 France]

Glandes	Hormones	Molécules	Principaux effets reproducteurs	Régulateurs
Hypothalamus 	Gonadolibérine (GnRH)	Peptide	Stimule la synthèse et la sécrétion de FSH et de LH par l'adénohypophyse	<i>Stimuli externes</i> : photopériode, phéromones sexuelles <i>Stimuli internes</i> : stéroïdes sexuels (rétrocontrôle)
Adénohypophyse 	Hormone lutéinisante (LH)	Glycoprotéine	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stimule la production d'androgènes dans la thèque</li> <li>Stimule le développement terminal du follicule ovulatoire</li> <li>Déclenche l'ovulation par le pic de LH</li> <li>Favorise la formation et le maintien du corps jaune</li> </ul>	GnRH Stéroïdes sexuels (rétrocontrôle)
	Hormone folliculo-stimulante (FSH)	Glycoprotéine	<ul style="list-style-type: none"> <li>Promeut et soutient la croissance des follicules ovariens</li> <li>Sélectionne le follicule dominant</li> <li>Stimule la production d'E2 (induction de l'aromatisation des androgènes en E2 dans la granulosa)</li> <li>Augmente les effets de LH sur l'ovulation</li> <li>Stimule la synthèse d'inhibine</li> </ul>	GnRH Stéroïdes sexuels et inhibine (rétrocontrôle)
Ovaires 	Œstrogènes <ul style="list-style-type: none"> <li>17β-œstradiol (E2)</li> </ul>	Stéroïdes	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stimule le développement de l'endomètre</li> <li>Exerce un rétrocontrôle positif ou négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire</li> <li>Promeut le développement et l'entretien des caractères sexuels secondaires</li> </ul>	FSH LH
	Progestines <ul style="list-style-type: none"> <li>Progestérone (PG)</li> </ul>	Stéroïdes	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stimule la croissance et l'entretien de l'architecture de l'endomètre</li> <li>Exerce un rétrocontrôle positif ou négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire</li> </ul>	FSH LH
	Androgènes <ul style="list-style-type: none"> <li>Testostérone</li> </ul>	Stéroïdes	Sert de substrat à la synthèse d'E2	LH Insuline
	Inhibine	Glycoprotéine	Exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de LH par l'hypophyse	FSH

L'axe HHG coordonne dans le temps l'ensemble des modifications structurales, physiologiques et comportementales qui existent entre deux œstrus ; l'œstrus étant la période pendant laquelle la femelle est réceptive au mâle et est fécondable. L'ensemble de ces modifications désigne le cycle œstral qui peut être conceptuellement représenté selon 4 phases (Heape 1900, Green 1941) : la phase de proœstrus désigne une phase anabolique de croissance de plusieurs parties du tractus génital précédant l'ovulation et la phase d'œstrus. Le métœstrus désigne à l'inverse une phase dégénérative du tractus génital. Enfin le dioœstrus correspond à une phase de quiescence ou de croissance ralentie.

Pendant une grande partie du cycle œstral les œstrogènes ont un effet inhibiteur sur la sécrétion de GnRH au niveau de l'hypothalamus et de LH au niveau de l'adénohypophyse (**Figure 2**). La GnRH participe à la sécrétion de LH *via* le système porte hypothalamo-hypophysaire (permettant la communication vasculaire entre l'hypothalamus et l'adénohypophyse). En début de cycle, du fait des faibles concentrations d'œstrogènes, la sécrétion de gonadotrophines est peu inhibée et stimule alors une sécrétion croissante d'œstrogènes par l'ovaire. Néanmoins lorsque les œstrogènes deviennent particulièrement concentrés dans le sang ils produisent un effet inverse (positif) sur la sécrétion de GnRH et LH. Il s'ensuit alors un pic pré-ovulatoire de LH qui déclenche l'ovulation. Suite à l'ovulation, l'ovaire répond à la LH en sécrétant de la progestérone. La progestérone inhibe le relargage de GnRH et de LH. La concentration en œstrogènes décroît alors et leur rétrocontrôle négatif sur le complexe hypothalamo-hypophysaire est rétabli.

Au cours du cycle œstral, les estrogènes ont donc un effet bimodal (inhibiteur ou stimulateur) sur les concentrations sanguines de GnRH au niveau de l'hypothalamus. Depuis 2003 on sait grâce aux travaux de deux équipes de recherche indépendantes (De Roux *et al.* 2003, Seminara *et al.* 2004) que cet effet implique un neuropeptide, la kisspeptine et son récepteur GPR54 ("G Protein-coupled Receptor 54"). Selon les neurones de l'hypothalamus auxquels elles appartiennent, les kisspeptines pourraient induire un rétrocontrôle négatif (dans les noyaux arqués) ou positif (dans les noyaux antéroventro-périvericulaires) (Smith *et al.* 2005).



**Figure 2 : Rétrocontrôles de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique et profils hormonaux pendant le cycle œstral chez la femme et la souris.** Hormones : GnRH = gonadolibérine ; LH = hormone lutéinisante ; FSH = hormone folliculo-stimulante ; E2 = 17 $\beta$ -œstradiol ; PG = progestérone. Phases du cycle œstral : D = diœstrus ; P = proœstrus ; O = œstrus ; M = métœstrus. [Réalisation personnelle d'après plusieurs sources : profils hormonaux adaptés d'après Isometrick chez la femme – CC BY-SA 3.0 ; d'après Mc Lean *et al.* 2012 chez la souris – avec permission de l'auteur. Banque d'images Servier Medical Art – licence Creative Common Attribution 3.0 France et Openclipart – Creative Commons Zero 1.0 License]

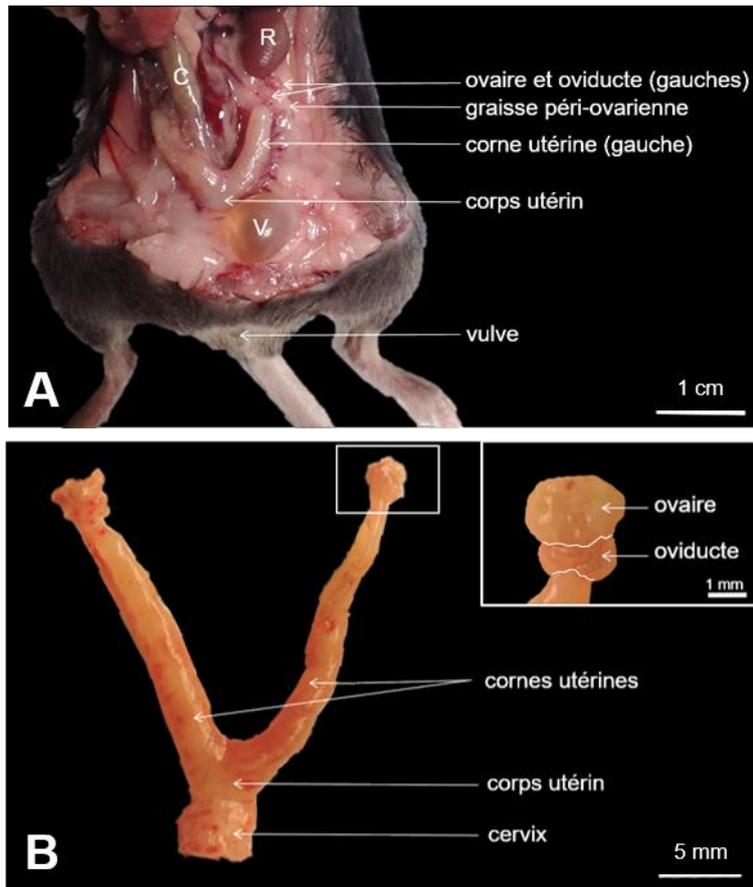
On notera que si globalement les concentrations hormonales pendant le cycle œstral suivent qualitativement les mêmes changements chez la femme et chez la souris, il existe des différences quantitatives importantes entre ces deux espèces. Chez la souris le cycle œstral dure

environ 4-5 jours (28 chez la femme), la puberté débute vers l'âge de 4 semaines (10-11 ans chez la femme) (Rendi *et al.* 2012). Ces données physiologiques peuvent varier en fonction de la souche de souris considérée. Dans cette thèse, les informations rapportées chez la souris concernent la souche C57BL/6 qui est la plus communément utilisée en recherche biomédicale. Cette souche constitue aussi le fond génétique pour la génération des souris mutantes utilisées dans ma partie expérimentale.

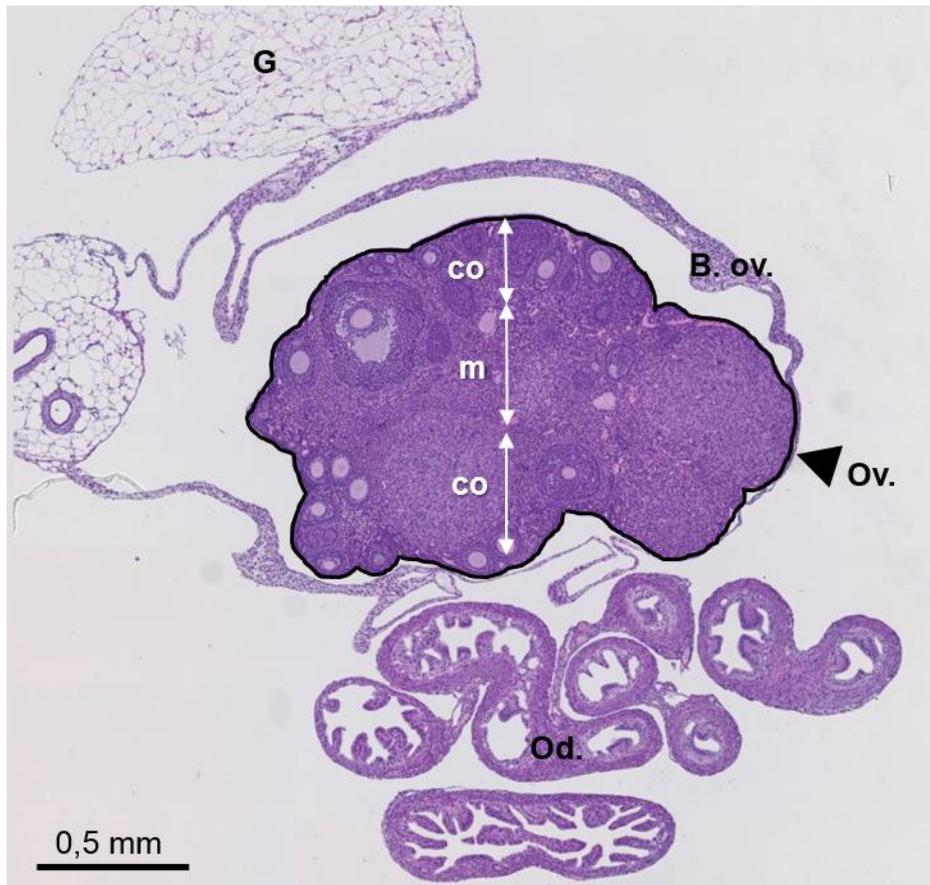
## 1.2 Le cycle œstral au niveau périphérique

Le niveau périphérique du cycle œstral correspond aux ovaires (principalement étudiés dans cette thèse), à l'utérus et au vagin. Les descriptions anatomiques, histologiques et physiologiques qui suivent sont essentiellement réalisées chez la souris sexuellement mature, en lien avec la partie expérimentale. Pour comparaison avec l'appareil reproducteur de la femme, le lecteur pourra se référer à Rendi *et al.* (2012).

D'un point de vue anatomique, les ovaires de souris sont des structures paires sphériques situées dans la cavité péritonéale, au pôle caudal des reins. Ils sont attachés à la paroi lombaire par le ligament suspenseur de l'ovaire et sont recouverts de tissu graisseux (**Figure 3**). A la maturité sexuelle, la surface lisse des ovaires devient nodulaire du fait du développement cyclique des follicules et des corps jaunes. Les ovaires et leur oviducte sont séparés de la cavité abdominale par la bourse ovarique (repli péritonéal transparent) à l'exception d'une petite ouverture communicante (le hile) dans laquelle les vaisseaux et les nerfs pénètrent dans la médullaire de l'ovaire. Ces éléments peuvent être observés d'un point de vue histologique global de l'ovaire dans sa bourse ovarique (**Figure 4**). L'ovaire est constitué d'une région centrale mal délimitée (la médullaire), et d'une région périphérique (le cortex) qui est recouverte par l'épithélium germinatif. La médullaire contient des vaisseaux lymphatiques, des nerfs et de nombreux vaisseaux sanguins tandis que le cortex comporte des follicules primordiaux, des follicules en maturation et des corps jaunes séparés par un stroma conjonctif plus compact et des amas de cellules glandulaires interstitielles.



**Figure 3 : Dissection de l'appareil génital de souris femelle sexuellement mature.** **A** : Vue ventrale de l'appareil reproducteur *in situ*. Chacun des deux ovaires, droit et gauche, est situé en regard du pôle caudal du rein (R) ipsilatéral, et est entouré par de la graisse péri-ovarienne. Les deux oviductes se prolongent chacun par une corne utérine. Les deux cornes se rejoignent à l'endroit du corps utérin qui se trouve ventralement au côlon (C) et dorsalement à la vessie (V). Le vagin (non disséqué ici) est aussi situé dorsalement à la vessie (V); il relie l'utérus à la vulve. Note : l'appareil digestif a ici été récliné sur la droite de l'animal. **B** : Appareil reproducteur *ex vivo* montrant les ovaires pairs, les oviductes pairs, l'uterus bipartite et le cervix. L'encart est un grossissement d'un ovaire dans sa bourse ovarique translucide, et de l'oviducte attachant à la corne utérine. Les organes ont été dégraissés. [Photographies et réalisation personnelles]



**Figure 4 : Vue d'ensemble d'une section histologique d'ovaire de souris sexuellement mature.** La bourse ovarique (B. ov.) entoure complètement l'ovaire (Ov). Sont également présentes sur cette section la graisse péri-ovarienne (G) et plusieurs sections d'oviducte (Od). Autour de la médullaire (m), la région périphérique de l'ovaire (cortex ovarien, co) comporte plusieurs follicules à différents stades de maturation. Coloration HE. [Photographie et réalisation personnelles]

### 1.2.1 Cycle ovarien

Au sein de l'ovaire, le **follicule contenant un oocyte représente l'unité fonctionnelle et le lieu de production des œstrogènes**. Sous l'influence de facteurs endocrines, paracrines et autocrines, les follicules passent par différents stades morphologiques décrivant le **cycle ovarien**. La **phase folliculaire** correspond au développement des follicules. La phase lutéale (ou phase progestative) succède à l'ovulation. Ainsi l'ovaire assure une double fonction : gamétogenèse par la croissance, la maturation et la libération de l'oocyte fécondable, et stéroïdogénèse par la synthèse de progestérone et d'œstrogènes. Les mécanismes qui sous-tendent ces deux fonctions ovariennes sont complexes (Monniaux et al. 2013).

Une vue histologique détaillée de l'ovaire permet de visualiser les différents follicules (follicule primordial, follicule primaire, follicule secondaire, follicule tertiaire, et follicule pré-

ovulatoire), un corps jaune, et le stroma ovarien (**Figure 5**). Les **follicules primordiaux** sont constitués d'un oocyte de petite taille entouré de cellules pavimenteuses. Le nombre de follicules primordiaux présents à la naissance (environ 8000) décline drastiquement (pour tomber à 2500 sept jours après la naissance chez la souris C57BL/6) (Kerr *et al.* 2006). Vers 4 semaines d'âge, quand la souris devient sexuellement mature (premières ovulations), plusieurs follicules primordiaux évoluent en plus grands follicules à chaque cycle œstral. Les cellules pavimenteuses (cellules dites de la pré-granulosa) entourant l'oocyte du follicule primordial deviennent peu à peu cuboïdales et forment une unique couche constituant un **follicule primaire**. Quand les cellules de la pré-granulosa forment deux ou plusieurs couches, cette structure pleine est classifiée en **follicule secondaire** (pré-antral). Durant cette phase pré-antrale, l'oocyte grossit, les cellules de la granulosa se multiplient, la thèque commence à se former à partir des cellules du stroma ovarien et s'arrange en couches concentriques vascularisées sur la surface externe du follicule. De façon concomitante, une matrice extracellulaire glycoprotéique vient se déposer entre l'oocyte et les couches de cellules de la granulosa : c'est la zone pellucide, apparaissant plus éosinophile que l'oocyte en coloration HE. Puis le follicule évolue en une structure cavitaire (antrale) contenant le liquide folliculaire, caractérisant le **follicule tertiaire**. Durant cette phase antrale, la croissance du follicule est assurée par la prolifération intense des cellules de la granulosa et de la thèque. Puis la taille du follicule augmente rapidement, essentiellement en raison de l'accumulation du liquide folliculaire, notamment par coalescence des multiples espaces remplis de liquide folliculaire. La thèque du follicule tertiaire est divisée en deux zones : une thèque externe et une thèque interne. Les cellules de la thèque externe sont fusiformes et se confondent avec le stroma ovarien adjacent ; ces cellules n'ont pas de fonction endocrine. La thèque interne est constituée de cellules polygonales contenant de nombreuses gouttelettes lipidiques cytoplasmiques et possédant les organelles caractéristiques des cellules productrices de stéroïdes. Les cellules de la thèque interne constituent le site principal de synthèse et de sécrétion d'androstènedione et, dans une moindre proportion, de testostérone. Ces deux androgènes sont utilisés comme substrat pour la synthèse d'E2 dans les cellules de la granulosa. Cette synthèse d'œstrogènes en réponse aux taux de LH et de FSH (augmentant juste après la phase de diœstrus) se produit dans les follicules en croissance et implique les cellules de la thèque et de la granulosa (**Encadré 1**).

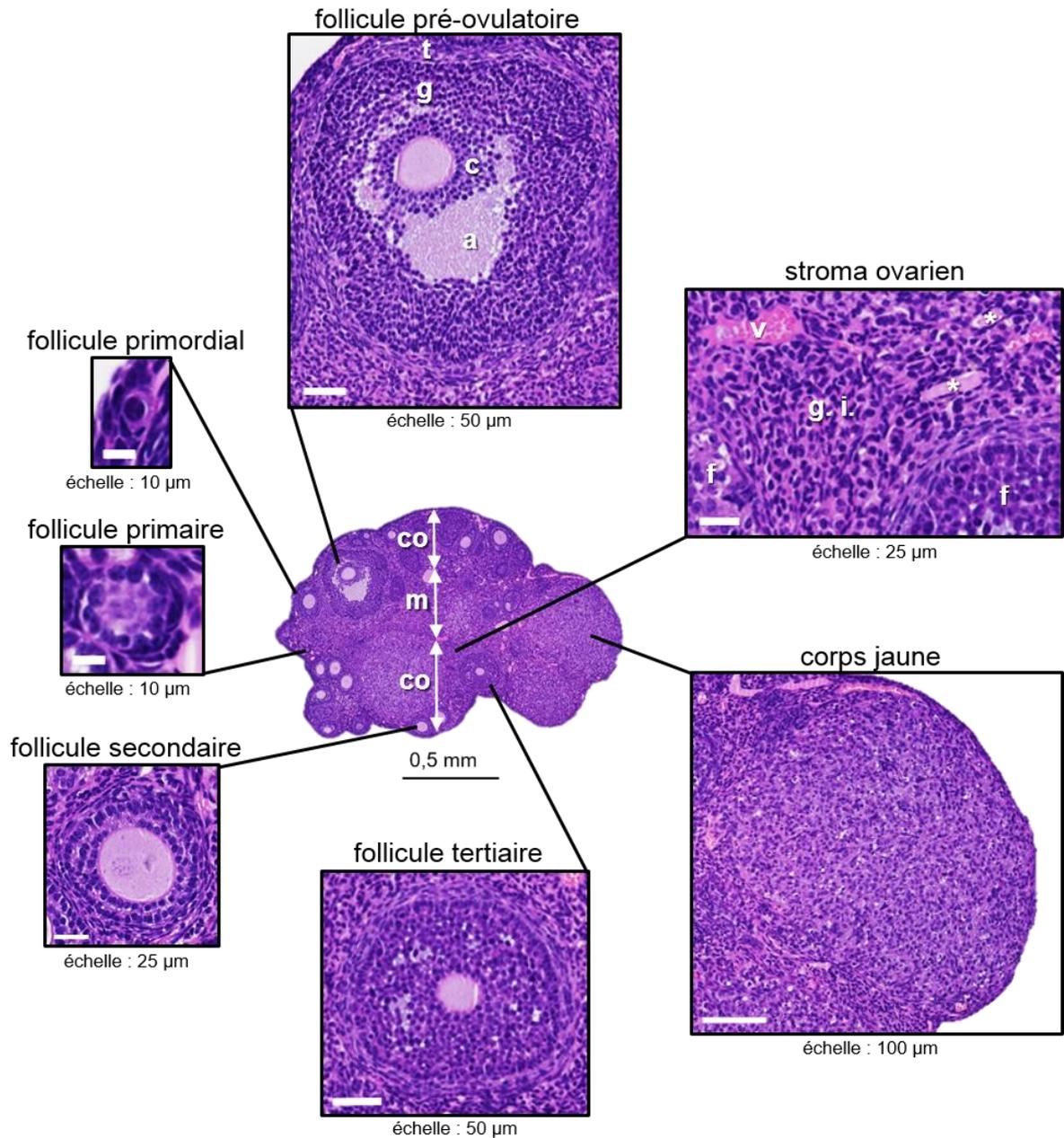
La croissance folliculaire se termine quelques heures avant l'ovulation par la formation d'un ou de plusieurs follicules pré-ovulatoires (un chez la femme, espèce mono-ovulante ; plusieurs chez la souris : espèce poly-ovulante). On identifie le **follicule pré-ovulatoire** (de De Graaf))

par le *cumulus oophorus* qui est un amas de cellules de la granulosa faisant protrusion dans l'espace unique antral et qui entoure l'oocyte. La couche la plus interne de ce cumulus, en contact avec la zone pellucide est appelée la *corona radiata*. La granulosa qui tapisse les parois du follicule est reliée au cumulus par un fin pédoncule. Sous l'effet du pic de LH au moment de l'œstrus, une série de réactions enzymatiques conduit à la rupture folliculaire et à l'expulsion du cumulus avec l'oocyte qu'il contient, et qui sera capté par l'oviducte.

Les cellules murales de la granulosa et de la thèque transforment ensuite le follicule ovulant en **corps jaune** (*corpus luteum*) ce qui correspond au début de la **phase lutéale**, et globalement aux phases de méœstrus et diœstrus du cycle œstral. Dans un premier temps, le follicule rompu se cicatrice et se vascularise au niveau des cellules de la granulosa, et la membrane basale séparant la granulosa de la thèque interne dégénère. Les cellules de la thèque et de la granulosa s'hypertrophient et s'hyperplasient pour devenir respectivement des grandes et petites cellules lutéales. Les cellules lutéales sont enrichies en lipides et sécrètent de la progestérone. Ce processus de lutéinisation est notamment sous le contrôle de la LH, hormone lutéotrophe majeure. La sécrétion de progestérone stimule la croissance des cellules de l'endomètre favorisant la nidation. Si la fécondation a lieu, cette sécrétion est inhibée et le corps jaune persiste et devient un corps jaune de gestation. Si l'oocyte n'a pas été fécondé, l'utérus sécrète des prostaglandines qui déclenchent la lutéolyse, c'est-à-dire la dégénérescence du corps jaune. Les corps jaunes en régression diminuent en taille, sont progressivement parcourus par du tissu fibreux et les cellules lutéales en dégénérescence peuvent contenir des pigments de dégradation intracytoplasmiques jaune-brun (lipofuscine).

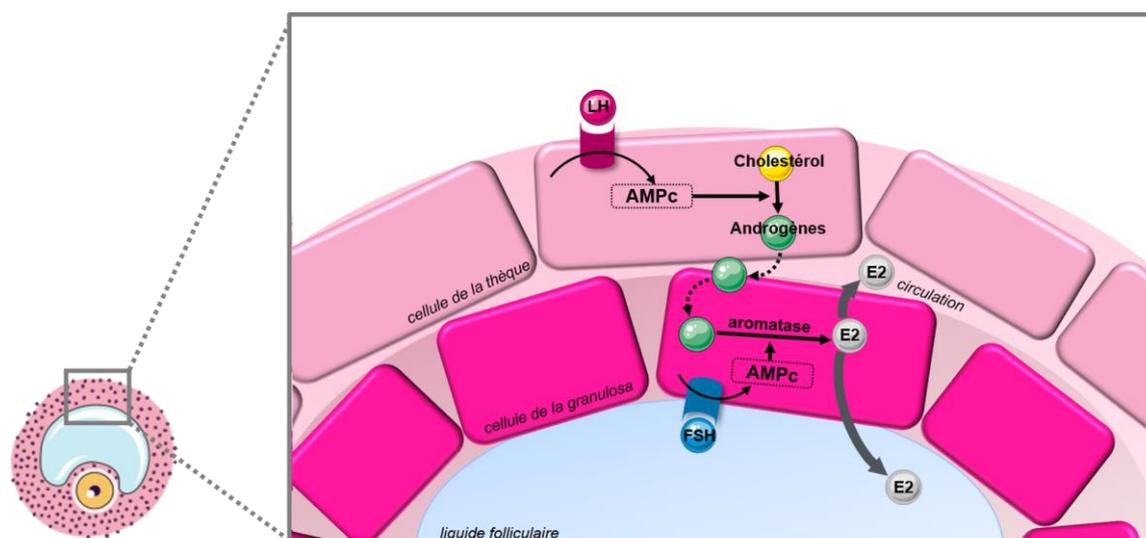
Parmi les follicules parvenant au stade tertiaire seuls quelques-uns continuent leur croissance alors que la majorité d'entre eux non sélectionnés dégénèrent par **atrésie**. Le processus d'atrésie concerne principalement les follicules au stade pré-antral et au début du stade antral (Edwards *et al.* 1977). Les **glandes interstitielles** au sein du stroma ovarien sont des agrégats de cellules de la thèque interne provenant de follicules tertiaires qui ont dégénéré. Ces glandes sont souvent arrangées autour de résidus d'oocyte et de zone pellucide (**Figure 5**).

Dès le proœstrus, l'augmentation des concentrations sanguines d'E2 stimule la division cellulaire (effet mitogène) au niveau des muqueuses vaginale et utérine. Tout au long du cycle œstral, les manifestations utérines et vaginales de la souris reflètent les influences stéroïdiennes résultant des évènements cellulaires cycliques ovariens.



**Figure 5 : Vue détaillée d'une section histologique d'ovaire de souris sexuellement mature et principaux types de follicules ovariens.** co = cortex ; m = médullaire ; t = thèque ; g = granulosa ; c = cumulus ; a = antrum ; v = vaisseaux sanguins ; g. i. = glandes interstitielles ; f = follicule ; \* = zone pellucide en dégénérescence (follicules atrétiques). Coloration HE. [Photographies et réalisation personnelles]

### Encadré 1 : La synthèse d'œstrogènes à l'échelle du follicule ovarien



**Figure E1 :** Théorie des « deux cellules - deux gonadotrophines » [Réalisation personnelle inspirée de Beshay et Carr 2013 ; Banque d'images Servier Medical Art – licence Creative Common Attribution 3.0 France]

L'ovaire est un lieu privilégié de stéroïdogénèse dans lequel les cellules de la thèque et les cellules de la granulosa coopèrent pour la synthèse d'œstrogènes (E2). Dans le modèle proposé (Fig. E1) la liaison de la LH à son récepteur sur les cellules de la thèque interne du follicule stimule la conversion de cholestérol en androgènes (androstènedione, testostérone). La liaison de la FSH sur son récepteur des cellules de la granulosa stimule l'aromatation des androgènes en œstrogènes.

### 1.2.2 Cycles utérin et vaginal : intérêt pour le suivi du cycle œstral

Au niveau de l'utérus et du vagin, les cellules des muqueuses évoluent également de façon cyclique. Les cycles ovariens, utérins et vaginaux correspondent globalement avec les phases du cycle œstral précédemment décrit à l'échelle de l'organisme ce qui peut faciliter l'identification de ces différentes phases *in vivo*. Au niveau de l'utérus la dégénérescence d'une partie de la muqueuse utérine est accompagnée de saignements (menstruations) chez la femme, ce qui marque le premier jour du cycle menstruel de 28 jours. Pour étudier les changements se produisant pendant le cycle reproductif, la courte durée du cycle œstral chez la souris de laboratoire représente un fort intérêt mais chez cette espèce les menstruations ne sont pas observables. Le cycle de la souris est de 4-5 jours. Il est possible de recourir à l'histologie de l'utérus (dont les changements structuraux semblent bien corrélés aux changements de concentrations de progestérone et d'œstrogènes (Wood *et al.* 2007)), toutefois cela suppose que les souris soient euthanasiées. Le suivi du cycle vaginal, en particulier de la transformation de

son épithélium, *via* des frottis vaginaux représente alors le moyen classique de déterminer le cycle œstral murin (Caligioni 2009) (**Encadré 2 ; Figure E2**). L'hormone principale qui induit les changements de la muqueuse vaginale est l'E2 : sous l'influence d'une imprégnation œstrogénique, la muqueuse vaginale se stratifie et se kératinise ; et à l'inverse, le retrait de cette hormone correspond à une desquamation intense de l'épithélium vaginal dans la lumière vaginale (Gupta *et al.* 1989). Les phases du cycle peuvent aussi être identifiées à partir de l'apparence de la vulve mais cette approche est beaucoup moins précise que les frottis vaginaux (Champlin *et al.* 1973).

## Encadré 2 : Cycle œstral, histologie et cytologie vaginales chez la souris

**Pré-requis histologique** : La muqueuse du vagin est un épithélium pluristratifié pavimenteux qui comporte 5 assises cellulaires (Fig. E2.A) décrites ci-après depuis l'interface avec le chorion sous-jacent (*lamina propria* LP) jusqu'à la lumière vaginale (Lu) :

- Une couche basale appelée *stratum germinativum* (SGe) constituant la jonction entre le chorion et l'épithélium de revêtement et contenant les cellules souches assurant le renouvellement de l'épithélium.
  - Une couche épineuse ou *stratum spinosum* (SS) appelée ainsi en raison des jonctions intercellulaires formant des ponts épineux visibles après artefact de rétractation durant le processus de fixation et de coloration en HE du tissu.
  - Une couche granuleuse ou *stratum granulosum* (SGr) dont les cellules contiennent des grains de kératohyaline (précurseur de la kératine).
  - Une couche cornée ou *stratum corneum* (SC) composée de cellules kératinisées ayant perdu leur noyau.
  - Une couche superficielle : *stratum mucification* (SM), constituée de cellules épithéliales nucléées dodues contenant fréquemment de petites vacuoles intracytoplasmiques remplies de mucine.
- Ces 5 couches ne sont présentes toutes ensemble qu'au stade de proœstrus (avancé et tardif).

### ❖ Proœstrus

Le proœstrus est défini par une augmentation des taux circulants d'œstrogènes stimulant indirectement le relargage de LH et FSH dans la circulation. L'épithélium vaginal présente un *stratum mucification* (SM) bien développé, et quelques plages en cours de kératinisation (Fig. E2. A). Le frottis vaginal de souris en proœstrus présente ainsi presque exclusivement des cellules épithéliales nucléées (Fig. E2. B et C) du fait du détachement du *stratum mucification* dans la lumière (Lu).

### ❖ Œstrus

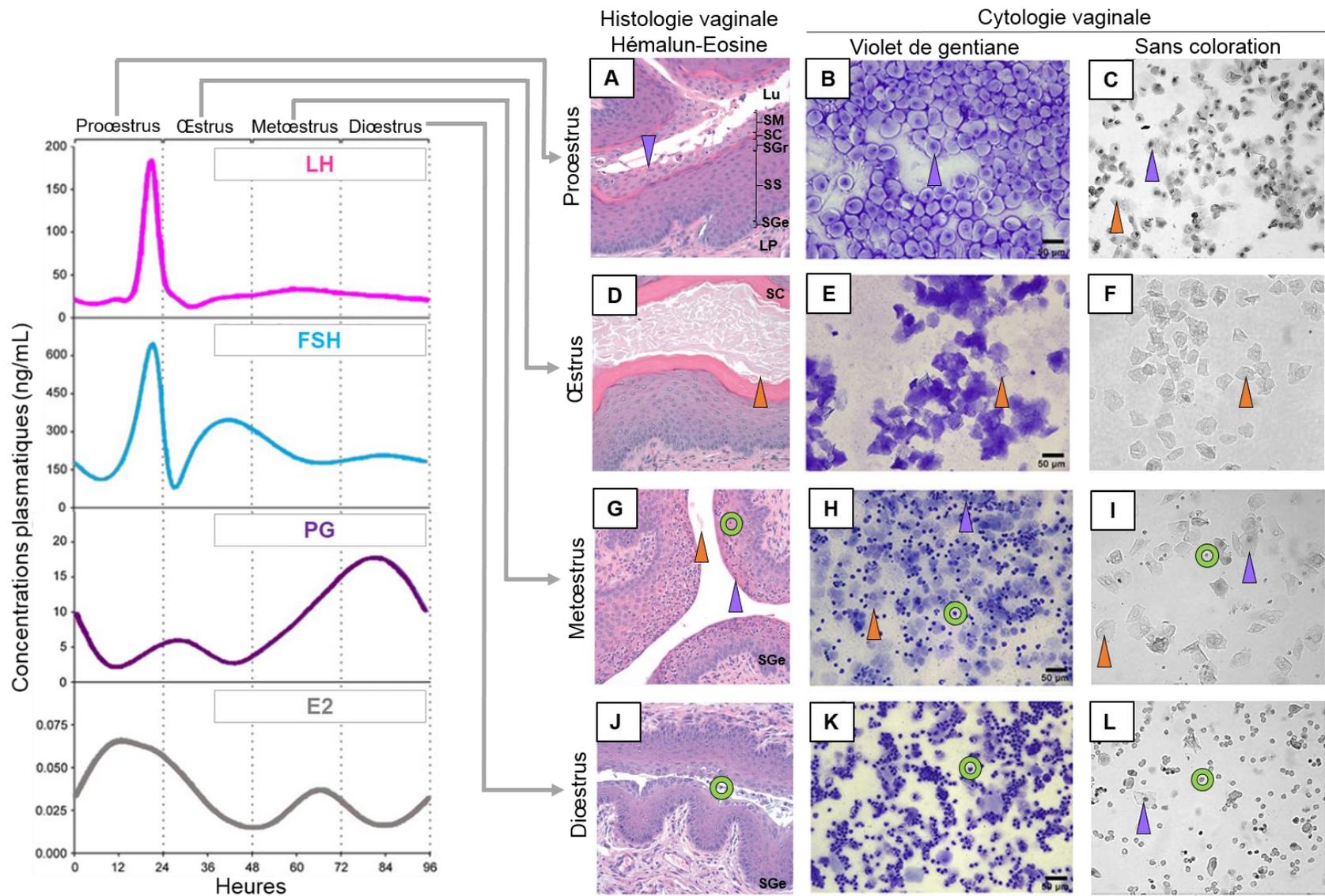
Les pics de LH et FSH signent l'ovulation et l'entrée en phase d'œstrus. Les taux d'E2 déclinent pendant cette phase. L'épithélium de revêtement stratifié pavimenteux du vagin est épais avec une couche cornée (SC) bien développée. Les cellules épithéliales superficielles se détachent dans la lumière (Fig. E2. D) et sont retrouvées dans le frottis vaginal (Fig. E2. E et F). Ces cellules kératinisées ont des formes polyédriques variées et s'assemblent souvent en amas. Il est fréquent d'en trouver en forme d'aiguille ou de bâtonnet (cellule de la couche cornée recroquevillée sur elle-même).

### ❖ Métoœstrus

L'entrée en métoœstrus coïncide avec un taux de progestérone en constante augmentation. Dans le même temps il survient une petite élévation des taux d'E2 en réponse à l'activation du corps jaune. A ce stade, le *stratum corneum* a subi une déhiscence complète mais des cellules kératinisées exfoliées sont encore présentes. Le *stratum granulosum* est absent. Une partie des cellules nucléées du *stratum spinosum* persistent ainsi que la couche basale, tandis que des leucocytes (principalement des granulocytes neutrophiles) sont extravasés dans le chorion et infiltrent l'épithélium (Fig. E2. G). Les trois types cellulaires sont retrouvés dans la cytologie vaginale (Fig. E2. H et I).

### ❖ Diœstrus

Le diœstrus est tout d'abord marqué par un taux élevé de progestérone, puis la régression des corps jaunes conduit consécutivement à un déclin drastique des taux de progestérone. La muqueuse vaginale est de moindre épaisseur mais sous l'influence des œstrogènes en fin de diœstrus, les cellules du *stratum germinativum* commencent à proliférer. Les cellules épithéliales de surface se mucifient, et les leucocytes peuvent être présents en très grand nombre (Fig. E2. J). Ainsi, les leucocytes sont les cellules prédominantes dans le frottis vaginal de diœstrus. Le nombre de cellules épithéliales kératinisées est réduit par rapport au stade précédent, et les cellules épithéliales nucléées commencent à être à nouveau détectées au moment de la transition vers le stade suivant (Fig. E2 K et L).



**Figure E2.** Correspondance entre les évènements endocriniens, l'histologie et la cytologie vaginales au cours du cycle œstral (légende page suivante)

### Encadré 2. Cycle œstral, histologie et cytologie vaginales chez la souris (suite)

**Figure E2. Correspondance entre les évènements endocriniens, l’histologie et la cytologie vaginale au cours du cycle œstral.** Cytologie vaginale par examen direct ou après coloration au violet de gentiane. Cercle vert : leucocyte ; flèche orange : cellule épithéliale kératinisée anucléée ; flèche bleue : cellule épithéliale nucléée. [Réalisation personnelle d’après plusieurs sources : profils hormonaux accompagnant les frottis vaginaux colorés au violet de gentiane (**B, E, H, K**) adaptés d’après Mc Lean *et al.* 2012 – avec permission de l’auteur ; photographies d’histologie vaginale (**A, D, G, J**) d’après Rendi *et al.* 2012 – avec permission de “Elsevier Science and Technology Journals” (numéro de licence 4245500481761) ; photographies des frottis vaginaux sans coloration (**C, F, I, L**) d’après Byers *et al.* 2012 – avec permission de l’auteur]

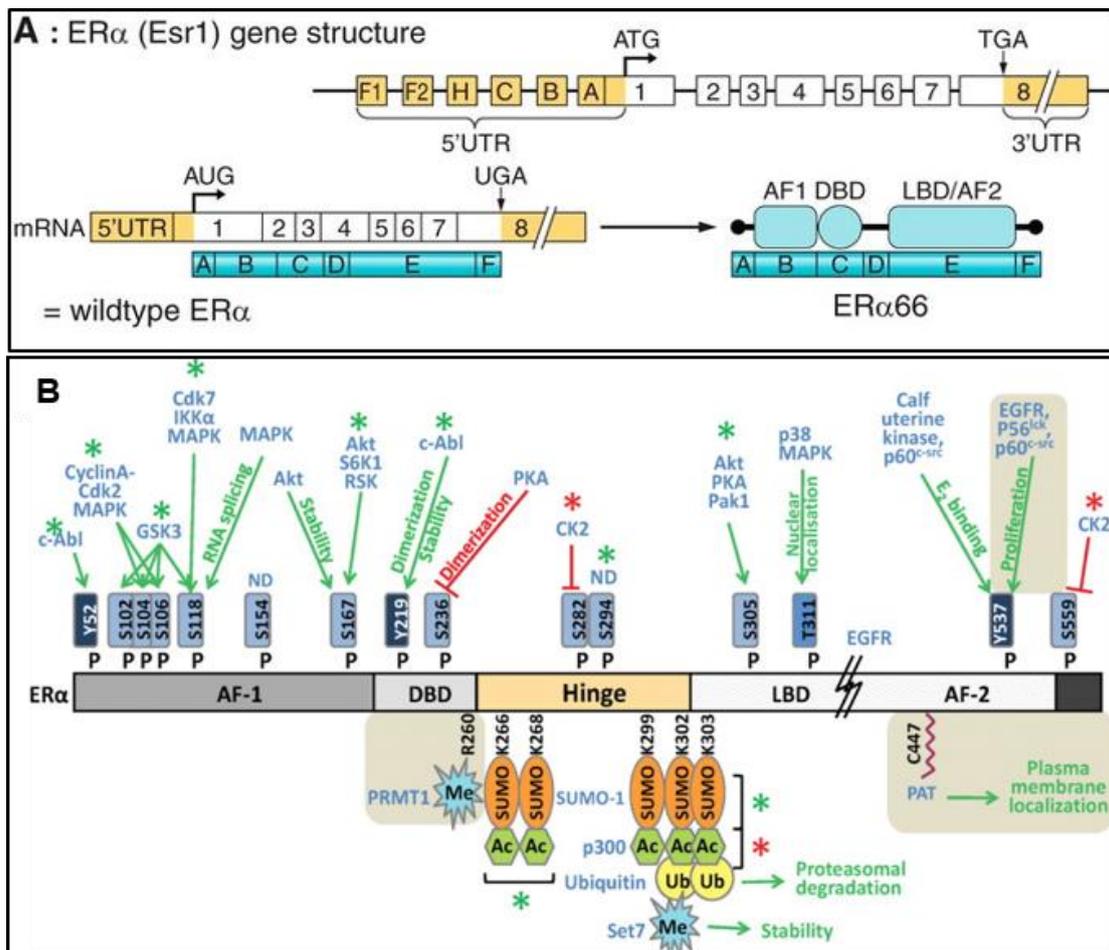
## 2 Structure et mécanismes d’action du ER $\alpha$

La structure et les mécanismes d’action du ER $\alpha$  au niveau cellulaire représentent un sujet complexe dépassant le cadre de cette thèse axée sur l’évaluation phénotypique d’un modèle murin muté (*cf.* Hewitt *et al.* (2016) ; Arnal *et al.* (2017) pour une revue récente). Cette partie se limite donc à décrire schématiquement l’origine et la nature des voies d’action du ER $\alpha$  auxquelles on pourra relier les phénotypes de modèles murins mutés (*cf.* section 3).

### 2.1 Organisations génique et protéique du ER $\alpha$

Comme nous l’avons évoqué précédemment, l’E2 produit ses effets biologiques par l’intermédiaire d’au moins deux types de récepteurs des œstrogènes (ER $\alpha$  et ER $\beta$ ). Un troisième récepteur des œstrogènes a été décrit, le récepteur GPR30 qui est une protéine à 7 domaines transmembranaires (Thomas *et al.* 2010). Seul, le récepteur des œstrogènes ER $\alpha$  est considéré ici. Ce récepteur est une protéine qui correspond à la traduction protéique du **gène ESR1**, porté sur le chromosome 6 chez l’homme et sur le chromosome 12 chez la souris. L’isoforme protéique de pleine taille du ER $\alpha$  qui est majoritairement étudiée est celle constituée de 595 acides aminés chez l’homme (Green *et al.* 1986) et 599 chez la souris (White *et al.* 1987). Son poids moléculaire est de 66 kDa. L’ER $\alpha$  est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires (récepteurs des hormones stéroïdiennes, des hormones thyroïdiennes, des rétinoïdes et de la vitamine D) et comme nombre d’entre eux il participe à la régulation de la transcription des gènes (facteur de transcription). Comme tous les autres membres de cette superfamille, il possède six domaines structuraux notés de A à F, de l’extrémité N-terminale à l’extrémité C-terminale (Krust *et al.* 1986). Ces domaines globalement correspondent avec 8 exons du gène

ESR1 (Ponglikitmongkol *et al.* 1988) (**Figure 6A**). Sur ER $\alpha$  le domaine E représente le domaine de liaison au ligand (**LBD** pour "ligand binding domain"). Le domaine C représente le domaine de fixation à l'ADN (**DBD** pour "DNA binding domain"). Les domaines B et E portent deux surfaces d'interaction avec des régulateurs transcriptionnels (**AF1** et **AF2**, respectivement) (Tora *et al.* 1989). Le domaine D ou région charnière ("hinge") permet la rotation du DBD nécessaire à sa fixation sur l'ADN. Cette région présente une séquence NLS ("Nuclear Localization Signal") permettant la translocation du récepteur dans le noyau (Ylikomi *et al.* 1992).



**Figure 6 : Structures génique, transcriptionnelle, traductionnelle et post-traductionnelle du ER $\alpha$ .**  
**A :** Structure du gène ESR1, de son transcrit mRNA et du ER $\alpha$  [Extrait de Arnal *et al.* 2017]. **B :** Représentation des modifications post-traductionnelles du hER $\alpha$ . P = phosphorylation ; Me = méthylation ; Ac = acétylation ; Ub = ubiquitination ; SUMO = sumoylation ; PAT = palmitoylation. Fonctions d'activation en vert et d'inhibition en rouge. [Extrait de Le Romancer *et al.* 2011 – avec permission de “Oxford University Press” (numéro de licence 4243610615759)]

Après la traduction, ER $\alpha$  peut subir différentes modifications chimiques influant notamment sur sa stabilité et sa localisation cellulaire (**Figure 6B**). Ces modifications post-traductionnelles

combinent phosphorylation, palmylation, méthylation, acétylation, sumoylation et ubiquitination (Le Romancer *et al.* 2011).

## **2.2 Mécanismes d'action nucléaire du ER $\alpha$**

En réponse à l'E2, l'action nucléaire du ER $\alpha$  induit des effets biologiques retardés, au bout de plusieurs heures voire jours (McEwen *et al.* 1978), temps nécessaire à l'induction de la transcription de nombreux gènes. Trois principaux mécanismes pour cette action génomique sont mis en jeu (**Figure 7**).

### **2.2.1 Activation de la transcription ligand-dépendante et ERE-dépendante (voie génomique classique)**

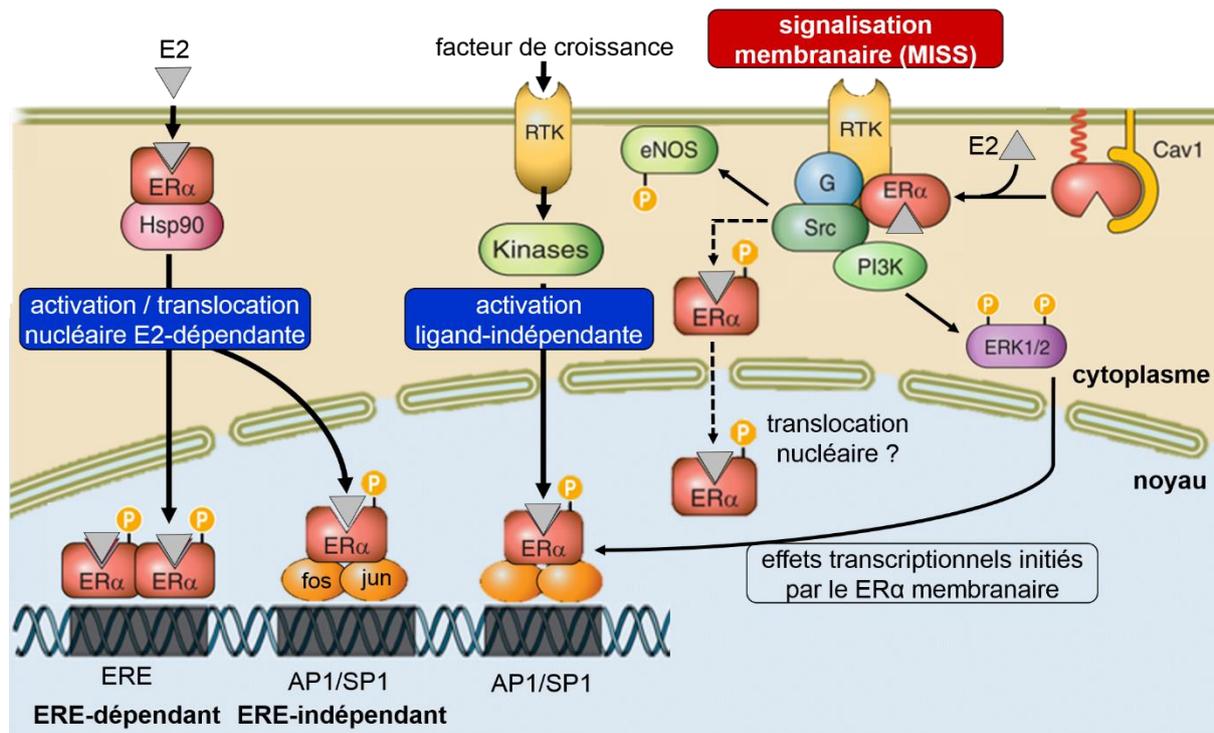
En l'absence de son ligand œstrogénique (E2) le monomère ER $\alpha$  se lie à des protéines chaperonnes **HSP** (pour "Heat Shock Protein"). Lorsque l'E2 (qui diffuse librement à travers les membranes plasmique et nucléaire) se lie à ER $\alpha$  celui-ci subit un changement de conformation déclenchant la dissociation des HSPs. ER $\alpha$  peut alors se dimériser et se lier directement dans le noyau à des séquences d'ADN présentes dans les régions promotrices de gènes cibles appelées **EREs** (pour "Estrogen Response Elements") (Gorski 1987). La transcription de gènes cibles est initiée à partir du complexe nouvellement formé et par le recrutement de cofacteurs. Cette voie de signalisation représente le mécanisme d'action classique du ER $\alpha$ . Dans cette voie, les fonctions de transactivation AF1 et AF2 jouent un rôle capital puisque que ce sont elles qui recrutent les cofacteurs (activateurs ou répresseurs) nécessaires au remodelage de la chromatine et à l'activité transcriptionnelle. Le concours préférentiel d'AF1 ou d'AF2 sur l'activité transcriptionnelle du ER $\alpha$  varie en fonction des promoteurs et du type cellulaire impliqués (Tora *et al.* 1989).

### **2.2.2 Activation de la transcription ligand-dépendante et ERE-indépendante (voie génomique non classique)**

Pour activer la transcription de certains gènes (*e.g.* gène IGF-1, "Insulin-like Growth factor") ER $\alpha$  peut aussi se lier à d'autres séquences d'ADN autres que les EREs : il interagit alors indirectement avec l'ADN par l'intermédiaire de deux facteurs de transcription **c-fos** et **jun** (complexe protéine/protéine également appelé **AP1** ("Activator Protein 1") ou de **Sp1** ("Specificity protein 1")) (Safe et Kim 2008).

### 2.2.3 Activation ligand-indépendante (autre voie génomique non classique)

La transcription de gènes cibles par ER $\alpha$  peut également être activée en l'absence d'E2. Par exemple, la voie de transduction des MAP-kinases ("Mitogen Activated Proteins") initiée par des facteurs de croissance tels que EGF ("Epidermal Growth Factor") potentialise l'activité transcriptionnelle du ER $\alpha$  (Kato 2001).



**Figure 7 : Représentation schématique des mécanismes d'action du ER $\alpha$  dans la cellule.** MISS = membrane initiated steroid signaling ; Hsp90 = heat shock Protein 90 ; RTK = receptor tyrosine kinase ; eNOS = endothelial nitric oxide synthase ; PI3K = phosphoinositide 3-kinase ; ERK = extracellular signal-regulated kinase ; Cav1 = Caveolin-1; ERE = estrogen response element ; AP1 = activator protein 1 ; SP1 = specificity protein 1. [Modifiée d'après Arnal *et al.* 2017]

### 2.3 Mécanismes d'action membranaire du ER $\alpha$

En dehors de la voie de signalisation nucléaire classique, il existe un autre mode d'activation moins connu, induit par le ER $\alpha$  membranaire. Cette voie est appelée de façon interchangeable voie membranaire, voie non-génomique, voie extra-nucléaire, voie non-nucléaire, ou encore effets membranaires initiés à la membrane ou **MISS** pour "**Membrane Initiated Steroid Signaling**" (Figure 7).

Depuis près de 50 ans ont été décrits des effets rapides des hormones stéroïdiennes (de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes), incompatibles avec des mécanismes d'action

transcriptionnelle (Szego et Davis 1967). Mais ce n'est que depuis une vingtaine d'années que de plus en plus de travaux décrivent plus concrètement une localisation et une signalisation membranaire pour le récepteur aux œstrogènes ER $\alpha$ .

L'existence d'un récepteur membranaire aux œstrogènes a été indirectement mise en évidence par l'observation d'effets rapides et transitoires en réponse à l'E2 dans différents tissus et cellules : l'ovaire (Morley *et al.* 1992, Razandi *et al.* 1999), les cellules du cancer du sein (Auricchio *et al.* 1996), le tissu nerveux (Gu et Moss 1996, Singer *et al.* 1999), les vaisseaux (Hayashi *et al.* 1995), et l'os (Endoh *et al.* 1997). Toutes ces études *in vitro* ont démontré que les œstrogènes activent des voies de signalisation provenant de la membrane cellulaire et du cytoplasme telles que la voie des kinases MAP (*e.g.* ERK1, ERK2), la phosphorylation de la eNOS, la stimulation des messagers secondaires intracellulaires (*e.g.* Ca<sup>2+</sup>, IP3, AMPc). Il est important de souligner que certaines de ces cascades de signalisation cytoplasmique, activées par le ER $\alpha$  membranaire, peuvent aussi aboutir à des effets transcriptionnels. Madak-Erdogan *et al.* (2008) ont par exemple montré que l'EDC – un œstrogène conjugué par une macromolécule empêchant son entrée dans le noyau cellulaire (Harrington *et al.* 2006) – était capable d'induire la transcription d'environ 25% de gènes cibles de l'E2.

L'équipe de Filippo Acconcia (Acconcia *et al.* 2005) a montré le rôle prépondérant d'une modification post-traductionnelle du ER $\alpha$  pour son adressage membranaire : la **palmitoylation**, c'est-à-dire l'attachement covalent d'un acide gras comme l'acide palmitique sur un résidu de protéine le plus souvent membranaire (**Figure 6B**). Cette modification située sur le résidu Cystéine 447 du ER $\alpha$  humain (un équivalent du résidu Cystine 451 du ER $\alpha$  murin), augmente l'hydrophobicité du récepteur. L'hydrophobicité est importante pour l'association du ER $\alpha$  avec la cavéoline-1 et pour son transport à la membrane. La **cavéoline-1** est une protéine membranaire formant un revêtement permanent de la membrane plasmique. L'interaction de cette protéine avec ER $\alpha$  implique également le résidu Sérine 522 comme l'ont décrit Acconcia *et al.* (2005). Une autre équipe a montré que cette palmitoylation se fait grâce à 2 palmitoylacyltransférases DHHC-7 et DHHC-21 (l'acronyme DHHC correspondant à la séquence d'acides aminés signature Asp-His-His-Cys) (Pedram *et al.* 2011).

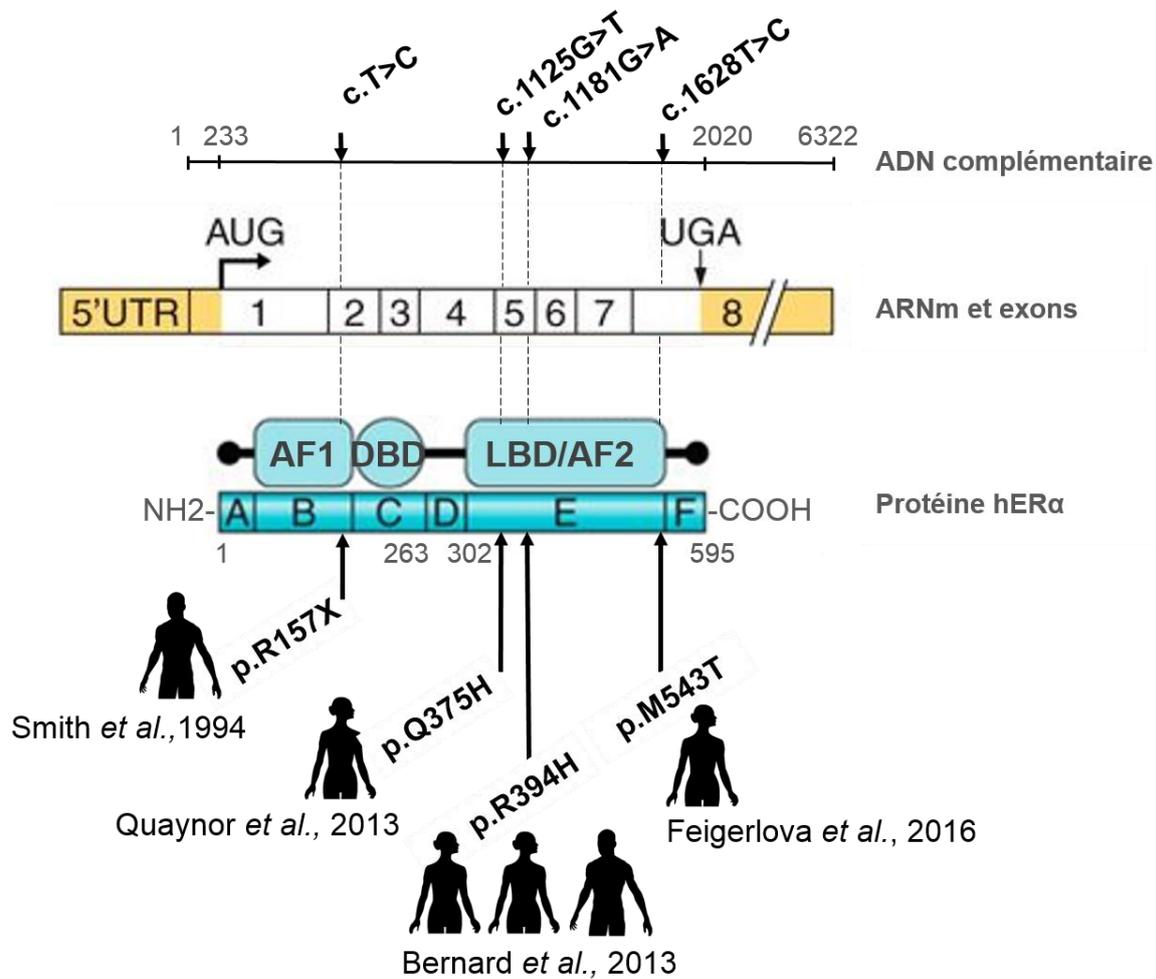
Pour étudier les effets membranaires *in vivo* mon équipe d'accueil a généré un premier modèle murin d'inactivation des effets membranaires du ER $\alpha$  en mutant le site Cys451 de palmitoylation. Avant de détailler ce modèle pour lequel j'ai étudié le phénotype ovarien et la

fertilité, je décris brièvement dans la section suivante quels sont les apports des modèles murins à notre compréhension des effets du ER $\alpha$  dans le contrôle de la fertilité femelle *in vivo*.

### **3 Modèles murins et stratégies pharmacologiques: apports sur la compréhension des effets nucléaires et membranaires du ER $\alpha$**

Chez l'Homme, il n'existe que très peu de cas rapportés de mutation spontanée du gène ESR1. Le premier cas identifié est un homme de 28 ans portant la mutation homozygote non-sens sur l'Arginine 157 dans le domaine A/B, entraînant un arrêt de la traduction de la protéine ER $\alpha$  et générant ainsi une protéine sévèrement tronquée et non fonctionnelle (Smith *et al.* 1994) (**Figure 8**). Il est intéressant de souligner que la mère de ce patient était hétérozygote pour la même mutation et a subi trois avortements spontanés, attestant d'une diminution de fertilité. Chez la femme, le premier cas connu de mutation homozygote a été rapporté dans la littérature en 2013 ; il s'agissait de la mutation faux-sens Q375H du gène ESR1 affectant le domaine de liaison à l'ADN du récepteur, induisant chez cette patiente de 18 ans une hyperœstradiolémie sévère et des ovaires polykystiques (Quaynor *et al.* 2013). D'autres cas ont récemment été décrits : les mutations homozygotes non-sens R394H affectant deux femmes (21 et 25 ans) et un homme (18 ans) d'une même fratrie (Bernard *et al.* 2016) et M543T affectant une patiente de 20 ans (Feigerlova *et al.* 2016) (**Figure 8**). Ces deux dernières mutations identifiées associent également un tableau clinique de résistance aux œstrogènes : hyperœstradiolémie élevée, maturation osseuse retardée, retard pubertaire et ovaires élargis polykystiques pour les femmes.

La voie privilégiée pour étudier les effets du ER $\alpha$  *in vivo* est alors l'utilisation d'outils pharmacologiques ou la génération de modèles de souris transgéniques. Dans les parties suivantes, nous résumons les principaux modèles élaborés et leurs fonctions.



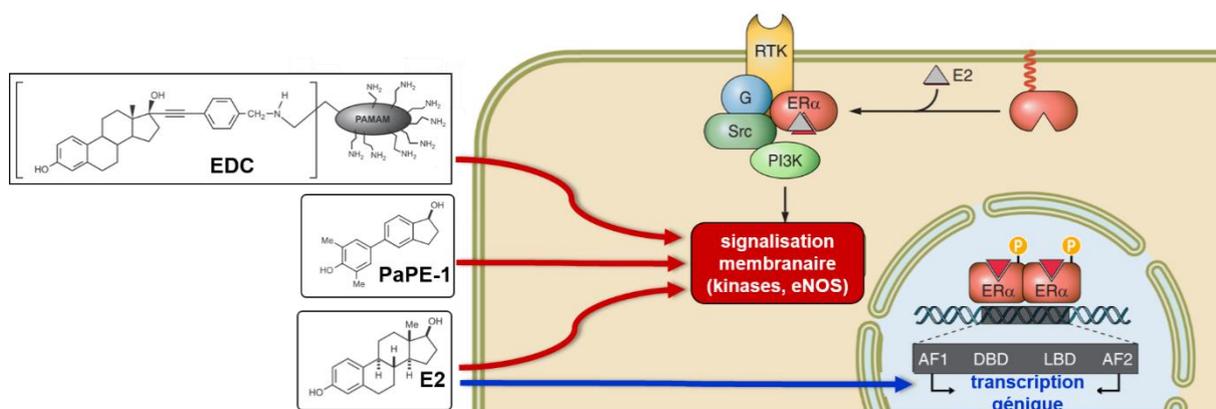
**Figure 8 : Cas de mutations spontanées du ERα publiés chez l'Homme.** c = complémentaire, p = protéine. Code international des acides aminés : Q = Glutamine (Gln), M = Méthionine (Met), R = Arginine (Arg), T = Thréonine (Thr), H = Histidine (His), X = codon stop. [Réalisation personnelle à partir de plusieurs sources : banque d'images Openclipart – Creative Commons Zero 1.0 License ; structures transcriptionnelle et traductionnelle du ERα extraites de Arnal *et al.* 2017]

### 3.1 Les outils pharmacologiques

Pour isoler les effets non-génomiques des œstrogènes, un des principes utilisés est de les conjuguer avec une macromolécule pour empêcher leur entrée dans le noyau (**Figure 9**). Dans ce cadre, l'albumine de sérum bovin (BSA) a largement été utilisée mais sa stabilité et sa sélectivité pour l'activation des récepteurs ERs ont été remises en cause au début des années 2000 (Stavis *et al.* 1999, Taguchi *et al.* 2004). Harrington *et al.* (2006) ont alors proposé comme alternative la synthèse d'éthinylœstradiol liée de manière covalente à une macromolécule dendrimère (**EDC** pour "Estrogen Dendrimer Conjugate") (**Figure 9**). Grâce à sa structure, le dendrimère lie de façon hydrolytiquement stable environ 20 molécules d'E2 ce qui permet un

accès optimal de l'E2 aux récepteurs membranaires. En plus de sa taille, la charge positive de l'EDC garantit son exclusion du noyau (Harrington *et al.* 2006). Il a ainsi été démontré que l'administration *in vivo* d'EDC à des souris permettait de conserver des effets vasculoprotecteurs de l'E2 (accélération de la cicatrisation endothéliale après lésion carotidienne), sans induire certains de ses effets indésirables (hypertrophie utérine, croissance de tumeurs ER $\alpha$  positives) (Chambliss *et al.* 2010). En raison de sa nature polymérique, l'EDC ne peut être considéré comme un agent pharmacologique (Madak-Erdogan *et al.* 2016). Toutefois, il représente un modèle primordial en tant que SERM *in vivo* dans la mesure où il a permis de montrer que les voies de signalisation membranaire du ER $\alpha$  sont nécessaires et suffisantes à la ré-endothélialisation.

Plus récemment, de nouveaux composés ont été synthétisés, les PaPEs ("Pathway Preferential Estrogens") (**Figure 9**) qui présentent une structure chimique totalement différente, basée sur la structure du bisphénol A (BPA), et qui ont des affinités pour ER $\alpha$  50 000 fois plus faibles que l'E2. Le PaPE-1 activerait préférentiellement le ER $\alpha$  membranaire, de par son taux de dissociation très rapide par rapport à l'E2 (1 min pour le PaPE contre 30h pour l'E2). Le PaPE conserverait les effets bénéfiques (ré-endothélialisation, prévention de l'obésité) sans stimuler les effets reproductifs (Madak-Erdogan *et al.* 2016).



**Figure 9 : Représentation des actions de composés pharmacologiques sur les voies de signalisation du ER $\alpha$  dans la cellule.** EDC = Estrogen Dendrimer Conjugate ; PaPE = Pathway Preferential Estrogens ; E2 = 17 $\beta$ -œstradiol [Modifiée d'après Arnal *et al.* 2017]

Ainsi, l'utilisation de ligands spécifiquement synthétisés (tels que l'EDC et les PaPEs qui activent préférentiellement la voie de signalisation membranaire par rapport à la voie de signalisation nucléaire du ER $\alpha$ ) suggère qu'il est possible de découpler les effets membranaires et nucléaires des œstrogènes *in vivo*. A ce jour, aucune étude ne semble avoir encore évalué le

phénotype ovarien ni la fertilité de ces deux composés impliquant les effets MISS du ER $\alpha$  avec des administrations uniques ou répétées.

Les outils pharmacologiques et les outils génétiques peuvent se compléter dans la compréhension et la dissection cellulaire et moléculaire de la fonction du récepteur ER $\alpha$  *in vivo*. Dans notre étude, les résultats obtenus par manipulation génétique du ER $\alpha$  chez la souris sont essentiels ; indéniablement, des progrès majeurs ont été accomplis grâce à la génération de souris transgéniques.

## 3.2 Les modèles murins transgéniques

### 3.2.1 Préliminaires sur les remaniements ciblés du génome

Depuis le début des années 90, l'essor des techniques de biologie moléculaire a permis des avancées majeures pour identifier précisément le rôle d'un gène du génome dans les processus biologiques, en particulier grâce aux méthodes de manipulation génétique ciblée (*i.e.* "gene targeting"). Les détails de ces techniques sont maintenant largement documentés (*e.g.* Doyle *et al.* 2012, Bouabe et Okkenhaug 2013). Seuls les principes généraux sont mentionnés ici. Le premier type de manipulation, à partir duquel d'autres techniques ont émergé, est l'invalidation génique ou "**knock-out**" (KO), c'est-à-dire la suppression totale d'un gène. Le principe général de cette technique est qu'en remplaçant une séquence spécifique du génome d'un organisme, puis en analysant le phénotype de cet organisme génétiquement modifié, on puisse ainsi déduire les fonctions du gène invalidé. Le KO s'appuie premièrement sur le mécanisme de **recombinaison homologue** qui se déroule naturellement lors de la méiose notamment, et qui correspond à une recombinaison génétique entre deux séquences homologues d'un brin d'ADN. Grâce à ce mécanisme, un gène non fonctionnel porté par un vecteur peut être incorporé à la place d'un gène ciblé du génome de cellules souches, capables de générer toutes les cellules de l'organisme. Après que les cellules souches ayant intégré le gène non fonctionnel à la place du gène ciblé ont été sélectionnées, puis incorporées dans de jeunes embryons en développement, il est possible d'obtenir des souris dites "chimères" dont les tissus sont en partie issus de cellules souches génétiquement modifiées et en partie de cellules souches non modifiées. L'invalidation génique touche les cellules germinales des souris chimères. Ces souris peuvent alors transmettre cette modification lorsqu'elles sont accouplées avec des souris de type sauvage, jusqu'à pouvoir sélectionner des souris homozygotes pour le gène invalidé, c'est-à-dire des souris KO. La génération de souris KO est un processus long et coûteux mais qui a révolutionné la génomique fonctionnelle grâce à la possibilité d'utiliser des mutations expérimentales ciblées plutôt que de

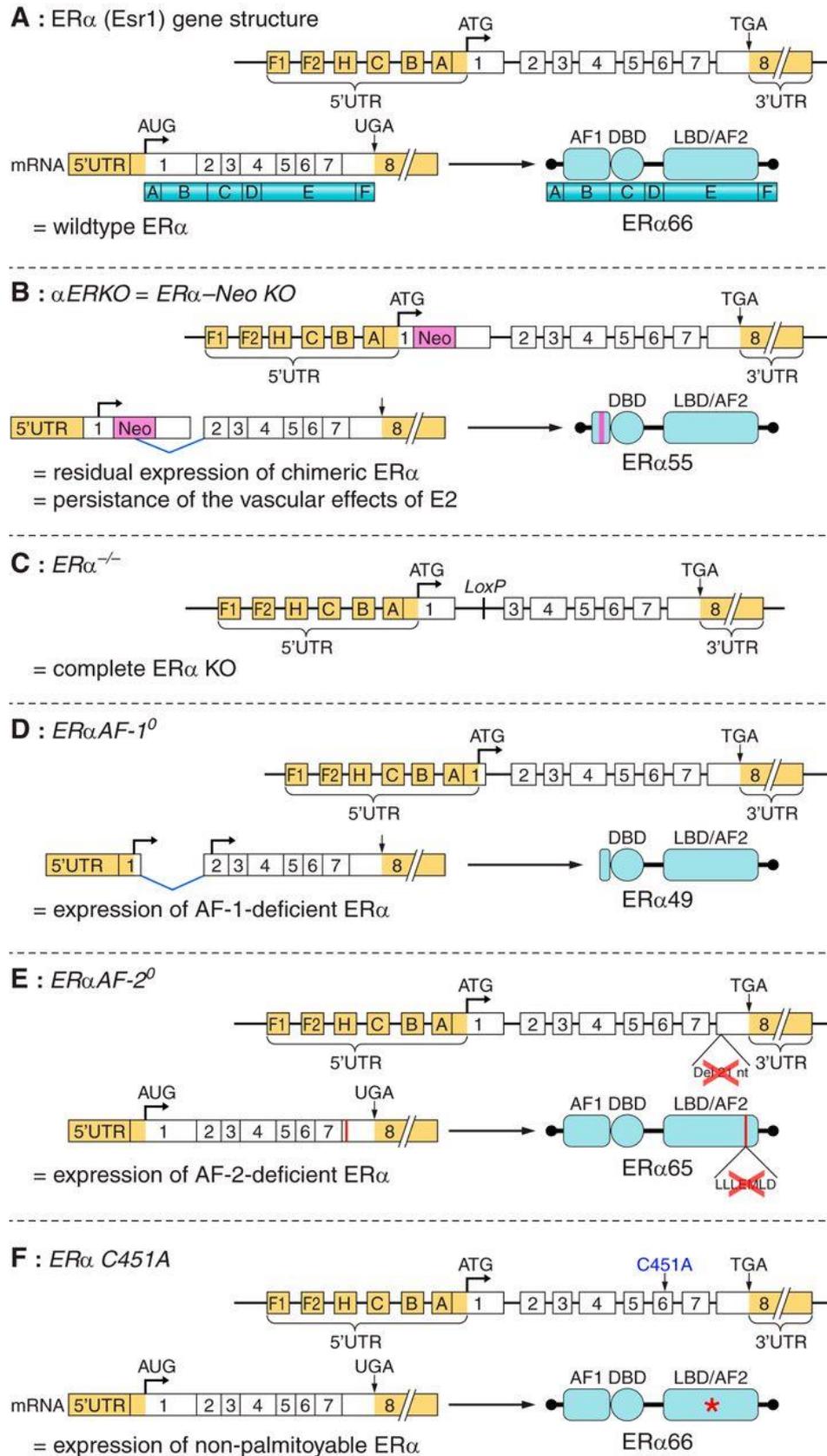
s'appuyer uniquement sur des mutations spontanées pour étudier les fonctions d'un gène. Plusieurs milliers de différentes souris KO ont pu ainsi être générées, ce qui a permis d'améliorer la compréhension des effets de certaines maladies chez l'homme ou le développement et le test de médicaments et thérapies. En pratique toutefois seule une proportion de souris KO présente un phénotype modifié, ce qui probablement illustre la complexité du génome et l'importance des mécanismes assurant la robustesse génétique. Ainsi, l'inactivation génique permet rarement d'identifier clairement les fonctions associées à un gène. Néanmoins la méthodologie employée pour l'inactivation génique a permis de donner naissance à d'autres techniques plus fines. En particulier, la technique de mutagenèse ciblée ou "**knock-in**" (**KI**) consiste à remplacer un gène cible non pas par un gène non fonctionnel mais par un gène issu d'une mutation du gène ciblé. Cette technique préserve alors les mécanismes d'expression et de régulation du gène muté des souris KI. En d'autres termes la mutagenèse ciblée permet d'étudier des fonctions spécifiques d'un gène plutôt que son absence fonctionnelle. Cette technique peut aussi permettre de contrôler dans quels tissus le gène muté est exprimé grâce à l'utilisation du **système Cre/Lox**. Dans la suite de cette partie, je passe en revue les principaux résultats obtenus par différentes manipulations ciblées du gène codant pour le récepteur ER $\alpha$  chez la souris (**Figure 10**).

### **3.2.2 Des modèles déficients pour la totalité du récepteur ER $\alpha$ : $\alpha$ ERKO et ER $\alpha$ <sup>-/-</sup>**

La première construction d'inactivation du gène ESR1 ( **$\alpha$ ERKO** ; **Figure 10B**) par l'insertion conventionnelle a été réalisée par l'équipe de Korach (Lubahn *et al.* 1993, Couse et Korach 1999). Elle a permis d'élucider les rôles physiologiques multiples de l'E2 et du ER $\alpha$  dans une variété de tissus. De plus, l'infertilité patente observée chez ces souris femelles  $\alpha$ ERKO a accéléré les investigations sur le phénotype ovarien. Cependant, la mise en évidence d'une expression résiduelle du récepteur ER $\alpha$  (isoforme de 55 kDa) (Flouriot *et al.* 2000) a révélé que ce modèle n'était pas un véritable knock-out du ER $\alpha$ . Les effets dus à cette « fuite transcriptionnelle » ont été en revanche totalement abolis dans un second modèle murin d'inactivation du gène ESR1 (Dupont *et al.* 2000) et dénommé **ER $\alpha$ <sup>-/-</sup>** (**Figure 10C**). Ce modèle a consisté en l'excision du deuxième exon du gène ER $\alpha$ , codant pour le domaine de liaison du récepteur à l'ADN, et peut être considéré comme un modèle totalement déficient pour ER $\alpha$  (Arnal *et al.* 2013) contrairement au modèle  $\alpha$ ERKO.

**Phénotype reproductif.** Les souris  $\alpha$ ERKO et ER $\alpha$ <sup>-/-</sup> sont infertiles en partie à cause d'un utérus et d'un vagin extrêmement atrophiques (Lubahn *et al.* 1993, Dupont *et al.* 2000). Les souris

$\alpha$ ERKO sont acycliques et leur profil hormonal révèle des taux circulants d'E2, de LH et de testostérone élevés (Couse *et al.* 2003, Emmen et Korach 2003). En revanche, il n'existe pas encore de données précises sur le cycle œstral et le statut hormonal des souris  $ER\alpha^{-/-}$  dans la littérature à ma connaissance. Tout comme les ovaires des souris  $\alpha$ ERKO, les ovaires des souris  $ER\alpha^{-/-}$  à l'âge adulte comportent fréquemment de larges kystes hémorragiques provenant des follicules antraux, un excès de follicules en atresie, et sont dépourvus de corps jaunes (défaut de maturation folliculaire). Pour mieux comprendre l'origine de ces anomalies à l'âge adulte, les souris  $ER\alpha^{-/-}$  pré-pubères ont été soumises à des tests de super-ovulation. La super-ovulation consiste à stimuler, *via* un traitement hormonal, la production d'un nombre élevé de follicules aptes à se développer jusqu'à devenir des follicules pré-ovulatoires. Elle nécessite donc de pouvoir franchir deux étapes clefs : la folliculogénèse et l'ovulation. Ainsi, il a été montré que l' $ER\alpha$  est indispensable à l'étape d'ovulation chez les souris  $ER\alpha^{-/-}$  (Dupont *et al.* 2000). Mais il n'a pas été démontré plus en avant dans cette étude si cet effet du  $ER\alpha$  sur l'ovulation résultait d'un dérèglement central (axe HHG, extra-ovarien) ou périphérique (ovarien) du  $ER\alpha$ . De plus, on ne sait pas quelle est la part des effets nucléaires et des effets membranaires dans les effets observés de ce modèle, d'où l'importance d'avoir élaboré des stratégies de dissociation des effets membranaires et nucléaires du  $ER\alpha$  là aussi basés sur l'emploi de modèles murins transgéniques.



**Figure 10 : Résumé des stratégies de manipulation génétique du récepteur ER $\alpha$ .** [Extrait de Arnal et al. 2017]

### 3.2.3 Des modèles mutés au niveau du domaine de liaison à l'ADN (DBD ou C) du ER $\alpha$ : NERKI et KIKO

Les souris **NERKI** ("Non classical ER Knock-In") constituent le premier modèle de mutation du domaine de liaison à l'ADN du ER $\alpha$ , par l'introduction de deux mutations ponctuelles d'acides aminés (E207A/G208A ou mutation AA) dans le DBD (Jakacka *et al.* 2002). En 2001, il a été montré *in vitro* que cette introduction supprime l'activité transcriptionnelle ERE-dépendante mais conserve l'activité transcriptionnelle de AP1 et Sp1 (voie ERE-indépendante) (Jakacka *et al.* 2001). Néanmoins cela réduit fortement l'activité génomique classique. Toutefois, l'infertilité des souris NERKI à l'état hétérozygote (ER $\alpha^{+/AA}$  ou NERKI $^{+/-}$ ) empêche la génération de mutants homozygotes ER $\alpha^{AA/AA}$ . Pour pallier ces difficultés de fertilité il a alors été réalisé en 2007 un croisement entre souris NERKI et souris ER $\alpha$ KO pour obtenir la souris ER $\alpha^{-/AA}$  ou **KIKO** ("knock-in/knock-out") (O'Brien *et al.* 2006, Glidewell-Kenney *et al.* 2007). Chez ces souris hybrides KIKO, les phénotypes observés étaient supposés associés à la signalisation ERE-indépendante (*i.e.* l'activité AP1, Sp1 et les effets membranaires du ER $\alpha$ ). Cependant, Hewitt *et al.* (2014) ont rapporté récemment que le modèle KIKO ne reflète pas parfaitement la signalisation ERE-indépendante du ER $\alpha$  car le récepteur ER $\alpha$  muté des souris KIKO est toujours capable de se lier directement à des séquences d'éléments de réponse de l'ADN (EREs). Les phénotypes moléculaires NERKI $^{+/-}$  et KIKO sont donc difficiles à interpréter dans la mesure où ils ne différencient pas les contributions des signalisations ERE-dépendantes et ERE-indépendantes du ER $\alpha$ . Ces modèles ne seront pas détaillés davantage ici, que ce soit à propos de leur fertilité, de leur phénotype ovarien ou de leur profil hormonal.

### 3.2.4 Un modèle muté au niveau du domaine de liaison au ligand (LBD ou E) du ER $\alpha$ : ENERKI

L'équipe de Sinkevicius (Sinkevicius *et al.* 2008) a développé un modèle murin présentant une mutation ponctuelle (Glycine 525 en Leucine, G525L) sur le domaine LBD du ER $\alpha$ . Ce modèle est dénommé NERKI ER $\alpha^{G525L}$  ou **ENERKI** ("Estrogen Non responsive Estrogen Receptor alpha Knock-In"). Cette construction génétique réduit la capacité de fixation du ER $\alpha$  à l'E2, et *in fine* réduit les effets transcriptionnels médiés par la liaison de l'E2 au récepteur nucléaire (voie ligand-dépendante : ERE-dépendante ou ERE-indépendante) mais elle n'altère pas la voie ligand-indépendante. Le modèle ENERKI permet donc de distinguer les modes d'action ligand-dépendant et ligand-indépendant du ER $\alpha$  *in vivo*.

**Phénotype reproductif.** Les souris ENERKI adultes sont infertiles. A ma connaissance, aucune information n'est encore disponible sur leur cycle œstral. On a révélé la présence de follicules ovariens kystiques hémorragiques et un défaut de développement de corps jaunes (Sinkevicius *et al.* 2008). Concernant le statut hormonal, les souris ENERKI présentent une forte augmentation des taux circulants de LH et d'E2. En somme, le phénotype des souris ENERKI apparaît similaire à celui des souris  $ER\alpha^{-/-}$ . Ces observations mettent en évidence la nécessité de la signalisation ligand-dépendante du  $ER\alpha$  dans le développement ovarien et le rétrocontrôle négatif de l'E2 sur la sécrétion de LH.

### 3.2.5 Des modèles mutés au niveau de la région de transactivation AF1 (B) ou AF2 (E) du $ER\alpha$ : $ER\alpha$ -AF1° et $ER\alpha$ -AF2°

Comme cela a été évoqué précédemment (*cf.* section 2.1 sur la structure du  $ER\alpha$ ), AF1 et AF2 ont un rôle clef dans l'activité transcriptionnelle du  $ER\alpha$ . Pour explorer directement et de façon isolée les effets de l'E2 médiés par la fonction de transactivation AF1 d'une part, et les effets de l'E2 médiés par la fonction de transactivation AF2 d'autre part, deux modèles murins appelés respectivement  $ER\alpha$ -AF1° et  $ER\alpha$ -AF2° ont été générés à l'aide d'une technique de KI par l'équipe du Professeur Chambon de l'Institut Clinique de la Souris de Strasbourg.

Chez les souris  $ER\alpha$ -AF1°, on a supprimé une séquence de 127 acides aminés (2 à 128) du premier exon du gène *ESR1*, ce qui donne lieu à l'expression d'une isoforme protéique de  $ER\alpha$  raccourcie, de 49 kDa, et dépourvue de la fonctionnalité AF1 (Billon-Galés *et al.* 2009) (**Figure 10D**). Chez les souris  $ER\alpha$ -AF2°, on a supprimé une séquence de 7 acides aminés (543 à 549) du domaine LBD du  $ER\alpha$ , qui correspond à l'hélice 12 (Billon-Galés *et al.* 2011), domaine essentiel à l'activité transcriptionnelle du  $ER\alpha$  induite par l'E2 (Danielian *et al.* 1992) (**Figure 10E**).

**Phénotype reproductif.** Les résultats de Billon-Galés *et al.* (2011) indiquent que les mutants femelles  $ER\alpha$ -AF1° et  $ER\alpha$ -AF2° sont toutes deux infertiles à l'état homozygote. Ils démontrent ainsi que les fonctions de transactivation AF1 et AF2 sont nécessaires pour les effets reproducteurs. A ma connaissance, il n'existe pas encore de résultats publiés sur le phénotype ovarien des souris  $ER\alpha$ -AF1° et  $ER\alpha$ -AF2°. En revanche lorsque les concentrations plasmatiques des stéroïdes sexuels endogènes sont mesurées avec un régime alimentaire riche en graisse, les taux d'E2 et de testostérone sont augmentés pour les deux génotypes, et beaucoup plus prononcés pour le génotype  $ER\alpha$ -AF2° (Handgraaf *et al.* 2013). Cette étude confirme que

les deux fonctions de transactivation AF1 et AF2 sont impliquées dans le rétrocontrôle négatif de l'E2 sur l'axe HHG.

Le mutant ER $\alpha$ -AF2<sup>o</sup> constitue un modèle très intéressant de perte sélective des effets nucléaires du ER $\alpha$ , puisque quasiment aucune réponse transcriptionnelle n'est observée *in vivo* (utérus, foie, aorte) (Billon-Galés *et al.* 2011, Adlanmerini *et al.* 2014) et l'activation de la fonction AF1 est abolie (Billon-Galés *et al.*, 2011 ; Abot *et al.*, 2013).

Il est aussi intéressant de noter qu'en étudiant la contribution respective de AF1 et de AF2 dans les effets vasculoprotecteurs de l'E2, Billon-Galés *et al.* (2011) ont montré que ni AF1 ni AF2 n'étaient nécessaires pour induire des effets rapides de cicatrisation endothéliale par l'E2. Cela suggérait alors l'existence d'effets extra-nucléaires rapides impliquant l'activation de récepteurs aux œstrogènes localisés à la membrane. Par la suite des modèles murins ont été spécifiquement générés pour isoler et évaluer ces effets membranaires du ER $\alpha$ .

### **3.2.6 Un modèle muté pour une surexpression du domaine de liaison au ligand (LBD ou E) du ER $\alpha$ : MOER**

La signalisation membranaire du ER $\alpha$  est encore relativement peu explorée, et par conséquent les modèles murins de découplage des effets membranaires du ER $\alpha$  sont encore peu nombreux. Le modèle **MOER** ("Membrane Only ER") récemment développé par Pedram *et al.* (2009) représente un des tous premiers modèles transgéniques permettant d'évaluer la contribution relative des effets membranaires *in vivo*. Ce modèle de knock-in exprime uniquement le domaine E du ER $\alpha$ , lequel est adressé exclusivement à la membrane plasmique, sur fond génétique ER $\alpha$ <sup>-/-</sup>. De plus, aucune expression du ER $\alpha$  n'est détectable dans le cytoplasme ni dans le noyau. Cette construction consiste en l'amplification, clonage et transgénèse du domaine E du ER $\alpha$  humain *via* un plasmide, dans lequel de multiples sites de palmylation de la protéine neuromoduline clonée permettent l'adressage membranaire. De façon pratique, seules les voies de signalisation ERK et PI3 kinase en réponse à l'E2 sont activées *ex vivo* et non les voies génomiques (Razandi *et al.* 2003), ce qui permet d'étudier les effets membranaires du ER $\alpha$  dans un modèle de déficience du ER $\alpha$ .

**Phénotype reproductif.** Les souris MOER femelles sont infertiles du fait de l'atrophie sévère du vagin et de l'utérus. Elles présentent aussi de multiples kystes hémorragiques ovariens et un défaut de développement de corps jaune, indiquant un défaut d'ovulation et de cycle œstral. Les souris intactes présentent une hyperœstradiolémie sans baisse associée du taux sérique de LH, ce qui indique une absence de rétrocontrôle négatif de l'E2. Après ovariectomie, les valeurs de

LH restent inchangées mais les taux sériques de FSH sont accrus, en accord avec la perte d'inhibine ovarienne et de son rétrocontrôle négatif sur la production de FSH (Pedram *et al.* 2009).

Ainsi, les souris femelles MOER présentent un appareil reproducteur et une régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique altérés, de façon comparable aux souris  $ER\alpha^{-/-}$ . Le modèle MOER et le modèle  $ER\alpha^{-/-}$  présentent donc les mêmes pertes de fonctions. Les effets nucléaires du  $ER\alpha$  semblent donc jouer un rôle critique pour le développement normal, la différenciation et le fonctionnement des organes reproducteurs. A l'inverse les effets membranaires de ce mutant  $ER\alpha$  semblent insuffisants pour exprimer un phénotype reproducteur viable, puisqu'ils ne compensent pas les fonctions perdues chez les  $ER\alpha^{-/-}$ . Toutefois le modèle MOER présente des limites. D'une part, il n'induit qu'une certaine partie de la signalisation membranaire. D'autre part, il ne peut pas mettre en évidence les effets transcriptionnels induits par l'activité membranaire du  $ER\alpha$  (activation indirecte du  $ER\alpha$  nucléaire) car il ne présente aucune expression du  $ER\alpha$  nucléaire. Finalement, la comparaison des phénotypes MOER et  $ER\alpha^{-/-}$  dans l'étude de Pedram *et al.* (2009) ne dissocie pas finement les effets nucléaires et membranaires du  $ER\alpha$  et ne permet pas de conclure clairement sur le rôle physiologique des effets membranaires du récepteur *in vivo*.

A partir de ma revue non-exhaustive des modèles murins ou pharmacologiques créés pour étudier les effets du  $ER\alpha$  *in vivo*, j'ai synthétisé les résultats de phénotypage de la fonction reproductive femelle observés chez les modèles qui me semblent les plus connus et significatifs (**Tableau 2**). Cette synthèse montre que pour la plupart des modèles de nombreux traits phénotypiques sont encore indéterminés. D'autre part, aucune comparaison des modèles actuels ne permet de déduire vraiment la part des effets membranaires et des effets nucléaires du  $ER\alpha$  sur les différentes composantes de la fertilité femelle. En particulier aucune des lignées de souris répertoriées n'a été mutée pour les sites d'adressage membranaire du récepteur aux œstrogènes  $ER\alpha$ . Ainsi la souris  $ER\alpha$ -C451A développée par mon équipe d'accueil (**Figure 10F**) constitue un modèle innovant permettant d'interroger pour la première fois les actions membranaires de l'E2 lié au  $ER\alpha$  *in vivo* à l'échelle d'un organisme animal entier.

**Tableau 2 : Synthèse des différents modèles murins transgéniques de déficience du ER $\alpha$  ou de découplage des effets membranaires et des effets nucléaires du ER $\alpha$  : caractéristiques phénotypiques ovariennes et hormonales [Réalisation personnelle]**

	Modèles murins invalidés pour la totalité du ER $\alpha$		Modèles murins de dissociation des effets membranaires ou nucléaires du ER $\alpha$		
	$\alpha$ ERKO	ER $\alpha$ <sup>-/-</sup>	ENERKI	ER $\alpha$ -AF2 <sup>o</sup>	MOER
<b>Synonymie</b>	ER $\alpha$ NeoKO ▪ neo-ER $\alpha$ KO ▪ neo-ER $\alpha$ <sup>-/-</sup> ▪ ER $\alpha$ -Neo ▪ AERKO ▪ $\alpha$ -ERKO ▪ ER1KO ▪ ER- $\alpha$ ▪ ER $\alpha$ - ▪ ER $\alpha$ KO ▪ ER $\alpha$ -KO ▪ ER $\alpha$ KOCH ▪ ERKO ▪ Esr1 <sup>tm1Ksk</sup> ▪ Esr1 <sup>tm1Ksk</sup> ▪ Esr1 <sup>tm1Unc</sup>	ER $\alpha$ KO ▪ ER $\alpha$ - $\Delta$ 2KO ▪ ER $\alpha$ <sup>flox</sup> ▪ ER $\alpha$ <sup>L2</sup> ▪ Esr1 <sup>fl</sup> ▪ Esr1 <sup>tm1.2Mma</sup>	ER $\alpha$ <sup>G525L</sup> ▪ Esr1 <sup>tm1Geog</sup>	ER $\alpha$ AF-2 <sup>o</sup> ▪ Esr1 <sup>tm1.1Mma</sup>	-
<b>Construction</b>	Invalidation du ER $\alpha$ par insertion d'une cassette néomycine dans le 1 <sup>er</sup> exon du gène ESR1	Invalidation du ER $\alpha$ par excision du 2 <sup>ème</sup> exon du gène ESR1 codant pour le domaine de liaison du récepteur à l'ADN	Mutation du LBD (G525L) empêchant la fixation du ER $\alpha$ à son ligand E2	Invalidation de la fonction AF2 par délétion des acides aminés 539 à 554	Surexpression du domaine E du ER $\alpha$ humain dans des souris ER $\alpha$ <sup>-/-</sup> conduisant à la seule expression du domaine E du ER $\alpha$ à la membrane plasmique
<b>Fertilité femelle</b>	Infertiles	Infertiles	Infertiles	Infertiles	Infertiles
<b>Cycle œstral</b>	Acyclique	?	?	?	?
<b>Phénotype ovarien à l'âge adulte</b>	Absence de corps jaune Présence de follicules kystiques et hémorragiques	Absence de corps jaune Présence de follicules kystiques et hémorragiques	Absence de corps jaune Présence de follicules kystiques et hémorragiques	?	Absence de corps jaune Présence de follicules kystiques et hémorragiques
<b>Profil hormonal (taux plasmatiques) sur souris non ovariectomisées</b>	Forte augmentation d'E2, LH, et testostérone	?	Forte augmentation d'E2 et LH	Forte augmentation d'E2 et testostérone (sous régime alimentaire riche en graisse)	Forte augmentation d'E2 et LH
<b>Rétrocontrôle de l'E2 sur la sécrétion de LH</b>	Absence de rétrocontrôle négatif	?	Absence de rétrocontrôle négatif	?	Absence de rétrocontrôle négatif
<b>Références principales</b>	Lubahn <i>et al.</i> 1993	Dupont <i>et al.</i> 2000	Sinkevicius <i>et al.</i> 2008	Billon-Galés <i>et al.</i> 2011 Handgraaf <i>et al.</i> 2013	Pedram <i>et al.</i> 2009

	Modèles murins invalidés pour la totalité du ER $\alpha$			Modèles murins de dissociation des effets membranaires ou nucléaires du ER $\alpha$		
	$\alpha$ ERKO	ER $\alpha$ <sup>-/-</sup>	ENERKI	ER $\alpha$ -AF2 <sup>o</sup>	MOER	
<b>Apports</b>	Premier modèle murin d'invalidation du ER $\alpha$ Mutation du gène ESR1 non létale Nécessité du ER $\alpha$ dans la fertilité	Vrai knock-out par rapport au modèle $\alpha$ ERKO Nécessité du ER $\alpha$ pour l'ovulation	Mise en évidence de la signalisation ligand-dépendante du ER $\alpha$ dans la fonction ovarienne et le rétrocontrôle négatif d'E2 sur l'axe HHG	Mise en évidence de l'implication de la fonction AF2 dans la fertilité Modèle élégant de perte sélective des effets nucléaires d'ER $\alpha$	Induction d'une partie des effets membranaires du ER $\alpha$	
<b>Limites</b>	Fuite transcriptionnelle Possibles traits phénotypiques dus à l'expression résiduelle d'une isoforme de 55 kDa du ER $\alpha$	Hyperœstradiolémie endogène (compensation possible par liaison d'E2 au ER $\beta$ )	Surexpression du ER $\beta$ dans l'utérus (x14 par rapport aux contrôles) Hyperœstradiolémie endogène (compensation possible par liaison d'E2 au ER $\beta$ )	Hyperœstradiolémie endogène (compensation possible par liaison d'E2 au ER $\beta$ )	Phénotype similaire à ER $\alpha$ <sup>-/-</sup> : pas de restauration des traits phénotypiques Pas d'apports sur la compréhension des effets membranaires du ER $\alpha$ <i>in vivo</i> Adressage membranaire permanent forcé du ER $\alpha$ , et induction partielle de la signalisation MISS : pas de modulation transcriptionnelle permise par les effets MISS Hyperœstradiolémie endogène (compensation possible par liaison d'E2 au ER $\beta$ )	

## PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE

### 1 Introduction

Les œstrogènes ont des actions pléiotropiques sur le développement et l'homéostasie de nombreux tissus reproducteurs et extra-reproducteurs. Ces actions sont orchestrées par les récepteurs ERs au niveau cellulaire (Moggs et Orphanides 2001, Antal *et al.* 2008). Comme l'indiquent les implications multiples des œstrogènes dans la fonction reproductrice (*cf.* section I.1), la fertilité féminine peut dépendre des mécanismes d'action du ER $\alpha$  à plusieurs niveaux (rétrocontrôle des œstrogènes sur l'axe HHG, développement des caractères sexuels secondaires, épaissement de la muqueuse utérine en phase pré-ovulatoire, comportements sexuels et plus particulièrement la lordose favorable à l'accouplement (Micevych *et al.* 2009)).

Comme nous l'avons vu précédemment (*cf.* section 3), la suppression totale de l'expression du ER $\alpha$  chez le modèle muté ER $\alpha^{-/-}$  conduit à l'infertilité (Dupont *et al.* 2000). De plus, les ovaires de ces souris à l'âge adulte comportent fréquemment de larges kystes hémorragiques provenant des follicules antraux, un excès de follicules en atresie, et sont dépourvus de corps jaune (défaut de maturation folliculaire), ce qui confirme la nécessité du ER $\alpha$  pour le cycle ovarien. Toutefois l'origine cellulaire de ce dysfonctionnement (au niveau de l'ovaire ou au niveau de l'axe HHG, ou à ces deux niveaux) restait indéterminée.

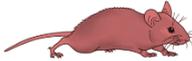
Par ailleurs, bien qu'on ait des preuves *in vitro* de l'existence d'effets membranaires du ER $\alpha$ , à l'échelle de l'organisme, la part de ces effets par rapport à ceux de la voie nucléaire du ER $\alpha$ , en particulier sur la fertilité femelle, demeure inconnue. Chez le modèle ER $\alpha$ -AF2 $^{\circ}$  qui théoriquement n'exprime que les effets membranaires du ER $\alpha$ , l'infertilité observée suggère que les seuls effets MISS ne suffisent pas au fonctionnement reproductif (Billon-Galés *et al.* 2011). Toutefois aucun modèle murin muté ne permettait d'étudier *in vivo* et de manière directe le rôle de ces effets MISS du ER $\alpha$ . C'est pourquoi mon équipe d'accueil a développé le modèle murin ER $\alpha$ -C451A, muté en Alanine sur la Cystéine 451 du ER $\alpha$  (équivalent de la Cystéine 447 humaine). Cette mutation ponctuelle empêche la palmylation du récepteur et donc son adressage membranaire, comme cela a été démontré *in vitro* (Acconcia *et al.* 2005).

Mon équipe d'accueil a validé le modèle ER $\alpha$ -C451A en démontrant que la mutation C451A atténue la localisation à la membrane plasmique du ER $\alpha$  *in vivo*. L'étude du profil d'expression

des gènes dans l'utérus a permis de considérer les modèles ER $\alpha$ -C451A et ER $\alpha$ -AF2 $^\circ$  comme des modèles de perte sélective des effets membranaires du ER $\alpha$  et de perte sélective des effets nucléaires du ER $\alpha$ , respectivement, mais avec préservation du ER $\alpha$  nucléaire et du ER $\alpha$  membranaire, respectivement (Adlanmerini *et al.* 2014).

Après avoir observé le taux de reproduction de notre élevage de souris ER $\alpha$ -C451A, la détermination du cycle œstral et le phénotypage ovarien de la souris ER $\alpha$ -C451A autour de la puberté et à l'âge adulte constituaient le principal objectif expérimental de ma thèse. Afin de dissocier les effets nucléaires et membranaires dans les résultats obtenus, j'ai également étudié en miroir deux autres génotypes mutés, sans effet nucléaire du ER $\alpha$  (ER $\alpha$ -AF2 $^\circ$ ) et totalement déficient pour ER $\alpha$  (ER $\alpha$  $^{-/-}$ ) (**Tableau 3**). Sur le plan méthodologique, un enjeu important du phénotypage était de mettre en place un procédé de comptage folliculaire afin d'évaluer la fonction ovarienne par une approche histologique. Enfin, j'ai abordé l'étude du rôle des effets membranaires du ER $\alpha$  dans le rétrocontrôle négatif des œstrogènes en procédant à des dosages hormonaux et à des ovariectomies.

**Tableau 3 : Modèles murins inclus dans l'étude expérimentale pour dissocier les effets membranaires et nucléaires du ER $\alpha$  dans la fertilité**

		Effets membranaires du ER $\alpha$	
		exprimés	non-exprimés
Effets nucléaires du ER $\alpha$	exprimés	ER $\alpha$ -WT  fertile	ER $\alpha$ -C451A  fertilité ?
		ER $\alpha$ -AF2 $^\circ$  infertile <sup>1</sup> (phénotype ovarien ?)	ER $\alpha$ $^{-/-}$  infertile <sup>2</sup> (phénotype ovarien anormal)
	non-exprimés		

<sup>1</sup>Billon-Gales *et al.* 2011 ; <sup>2</sup>Dupont 2000

## 2 Matériel et méthodes

### 2.1 Animaux et génotypes

La lignée de souris knock-in ER $\alpha$ -C451A et leurs contrôles WT issus de la même portée ont été générés sur fond génétique C57BL/6N à l'Institut Clinique de la Souris (Illkirch, France) (Adlanmerini *et al.* (2014) Figure supplémentaire S1 pour la stratégie de knock-in mise en œuvre). Les souris femelles C57BL/6N WT ont été fournies par "Charles River Laboratories" (L'Arbresle, France). Les souris ER $\alpha$  $^{-/-}$  et ER $\alpha$ -AF2 $^\circ$  et leurs contrôles WT respectifs issus de

la même portée ont été générés sur fond génétique C57BL/6J (Dupont *et al.* 2000, Billon-Galés *et al.* 2011).

Le génotype des souris générées a été déterminé à l'âge de 21 jours en utilisant l'amplification en chaîne par polymérase (**PCR**) de l'ADN à partir d'une biopsie de la queue. En bref, les échantillons de queue ont été solubilisés avec un tampon de lyse contenant des protéinases K. Après l'inactivation des protéinases K, la PCR a été réalisée en utilisant des amorces spécifiques. Les résultats de PCR ont été analysés à l'aide de micropuces à ADN MCE (Shimadzu) (**Annexe 3**).

Pendant l'expérimentation, les animaux ont été maintenus à l'animalerie conventionnelle de la Faculté de Médecine de Rangueil à Toulouse. L'animalerie comprend des portoirs ventilés et fournit des conditions environnementales contrôlées (*i.e.* température de 20°C, humidité 50-60%, cycle nyctéméral de 12h/12h). Les animaux ont reçu un régime alimentaire standard et une eau de boisson *ad libitum*. Toutes les procédures ont été réalisées selon les directives établies à l'INSERM et ont été approuvées par le comité d'éthique de l'INSERM.

Les animaux ont été anesthésiés avec euthanasie terminale (sans réanimation). Une dose non létale de produits anesthésiques a été injectée afin de prélever 500 µL de sang par cardiocentèse pour les dosages hormonaux plasmatiques le jour du sacrifice (*cf.* section 2.5). L'euthanasie des animaux a ainsi été obtenue par exsanguination puis surdosage des agents pharmacologiques ; la dislocation cervicale n'étant pas préconisée pour l'étude du système nerveux central qui a été prélevé et conservé pour d'éventuels futurs travaux.

## **2.2 Fécondité des souris femelles ER $\alpha$ -C451A**

Pour évaluer la fécondité des souris femelles ER $\alpha$ -C451A, nous les avons couplées avec des mâles WT à partir de 3-4 semaines d'âge sur une période continue de 5 mois. A la fin de la période le nombre de petits par portée et le nombre de portées par femelle ont été évalués. Ces mesures ont été comparées à celles obtenues avec des couples de souris du génotype hétérozygote ayant permis de générer les souris ER $\alpha$ -C451A (*i.e.* le couple de parents : ♀ER $\alpha^{\text{WT/C451A}}$  × ♂ER $\alpha^{\text{WT/C451A}}$ ), ainsi qu'à celles obtenues avec les hétérozygotes utilisés pour générer les souris ER $\alpha^{-/-}$  (♀ER $\alpha^{+/-}$  × ♂ER $\alpha^{+/-}$ ).

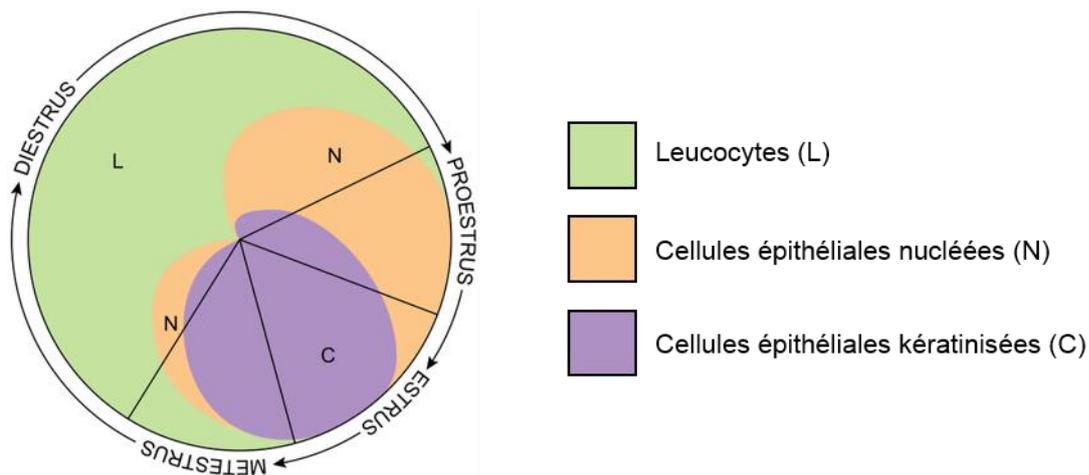
## **2.3 Étude du cycle œstral**

Les souris femelles intactes ont été regroupées par génotype dès leur sevrage (à 3,5 semaines d'âge) avant la puberté, afin de favoriser la synchronisation des cycles œstraux. Pour évaluer leur cyclicité sexuelle, nous avons déterminé quotidiennement la phase du cycle œstral (*i.e.*

proœstrus, œstrus, métœstrus ou diœstrus) dans laquelle se trouvait chacune des souris pendant 18 jours consécutifs à 5 semaines d'âge (ER $\alpha$ -WT, ER $\alpha$ -C451A, ER $\alpha$ -AF2 $^{\circ}$ , ER $\alpha^{-/-}$ ) et à 26 semaines d'âge (ER $\alpha$ -WT, ER $\alpha$ -C451A). Pour cela nous avons utilisé l'analyse cytologique des frottis vaginaux (**Figure E2 ; Encadré 2** de la **Partie I**). Les sécrétions vaginales ont été prélevées chaque matin (entre 9h et 11h) sur chaque souris selon les protocoles de lavage vaginal précédemment décrits (Caligioni 2009, Byers *et al.* 2012). Chaque échantillon de sécrétion vaginale a été dilué dans 20  $\mu$ L de tampon phosphate salin (PBS) puis examiné par microscopie optique (Nikon Eclipse E400, logiciel Morpho Expert). Dans les sécrétions vaginales la proportion entre les leucocytes (principalement granulocytes neutrophiles), les cellules épithéliales kératinisées anucléées et les cellules épithéliales nucléées a permis de déterminer la phase du cycle œstral. Le diagramme d'identification des stades du cycle œstral murin par Byers *et al.* (2012) est un outil très utile auquel je me suis référée (**Figure 11**). Au stade proœstrus, les cellules épithéliales nucléées sont prédominantes. Au stade œstrus on observe des amas de cellules épithéliales kératinisées anucléées. Au stade métœstrus, les trois types cellulaires précédents sont observés. Enfin, au stade diœstrus on observe majoritairement des leucocytes. Les frottis vaginaux réalisés le jour du sacrifice des animaux ont pu être mis en regard de l'histologie du vagin qui a été prélevé lors de la nécropsie (**Figure 12**), confirmant ainsi le stade œstral déterminé à partir de la cytologie. Tous les frottis vaginaux ont été examinés directement (*i.e.* sans coloration spéciale). Chez les rongeurs, des colorations spéciales ont déjà été appliquées à l'analyse de frottis vaginaux : coloration classique de Papanicolaou (Bancroft et Stevens 1996), coloration de Wright (Li et Davis 2007), coloration au violet de gentiane (McLean *et al.* 2012, *cf.* **Encadré 2**, photos B, E, H, K), coloration de Giemsa (Gal *et al.* 2014). Yener *et al.* (2007) et Gal *et al.* (2014) s'accordent à penser que l'examen direct suffit, comparé à des techniques de coloration plus chronophages, moins pratiques et plus coûteuses ; que ce soit par examen direct ou après coloration spéciale, les deux méthodes présentent les mêmes biais. Il convient à l'opérateur de choisir la méthode qui lui convient le mieux. De mon point de vue, l'expérience confirme les observations de Gal *et al.* (2014) à savoir que le plus grand taux de confusion se produit pour les phases de métœstrus et de diœstrus, moins faciles à différencier l'une de l'autre, et de ce fait souvent regroupées en une seule phase par certains auteurs.

Il est généralement plus difficile d'évaluer le stade œstral lors des premiers jours d'analyses cytologiques vaginales car les animaux sont sujets au stress engendré par la contention et le prélèvement. Les 4-5 premiers jours d'évaluation n'ont donc pas été intégrés aux analyses. Une

stimulation vagino-cervicale artificielle mécanique peut induire une pseudogestation chez les rats (Yang *et al.* 2009). Il a été rapporté que les souris sont moins susceptibles que les rats à cet effet, puisque les souris nécessitent surtout la réception de l'éjaculat du mâle pour entrer en pseudogestation (Yang *et al.* 2009). Toutefois j'ai veillé à ce que l'embout de pipette contenant le PBS soit introduit seulement à l'extrémité de l'orifice vaginal, afin de minimiser le caractère invasif de ce geste répété tous les jours.

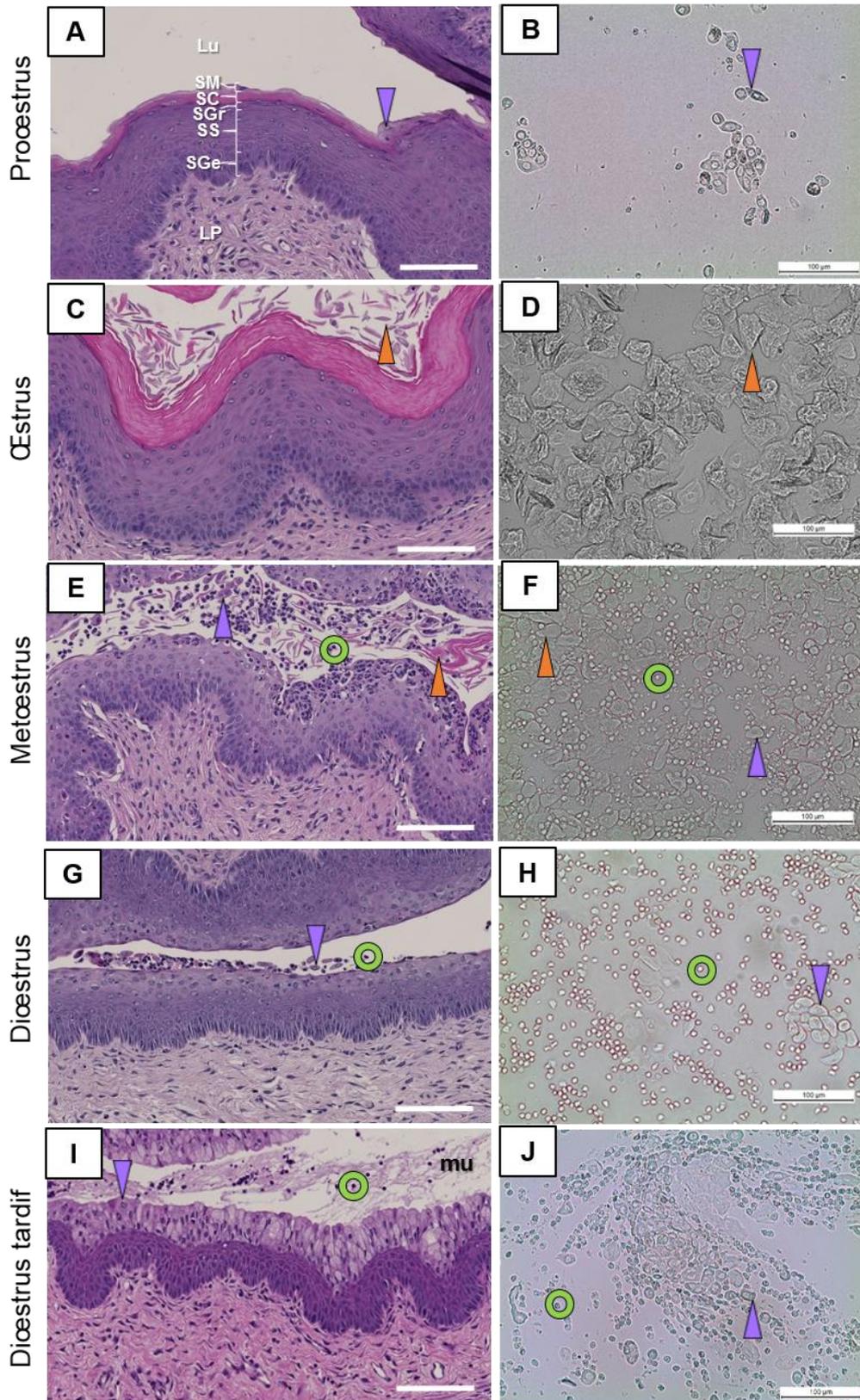


**Figure 11 : Diagramme d'identification du stade œstral murin.** Types cellulaires et proportion relative dans les frottis vaginaux durant les 4 phases du cycle œstral chez la souris. La taille des quadrants n'est pas directement corrélée à la longueur du stade œstral correspondant. [Reproduction et traduction d'après Byers *et al.* 2012 – avec permission de l'auteur]

## 2.4 Histologie, morphométrie et immunohistochimie de l'ovaire

### 2.4.1 Histologie

Les prélèvements d'ovaires *post mortem* ont été réalisés à 12 semaines d'âge (ER $\alpha$ -WT, ER $\alpha$ -C451A, ER $\alpha$ -AF2 $^{\circ}$ , ER $\alpha^{-/-}$ ) selon les recommandations du RITA ("Registry of Industrial Toxicology Animal-data") (Ruehl-Fehlert *et al.* 2003). Après 48 heures de fixation au formol tamponné à 10% (QPath 11699408, Labonord, Templemars, France), les ovaires ont été inclus en blocs de paraffine. D'autres organes ont été prélevés et stockés (peau, glandes mammaires, tissu adipeux, foie, rein, rate, pancréas, poumons, thyroïde, thymus, glande salivaire, surrénale, vessie, urètre, vagin, utérus, os, hypophyse) selon les mêmes recommandations RITA (Ruehl-Fehlert *et al.* 2003, Kittel *et al.* 2004, Morawietz *et al.* 2004).

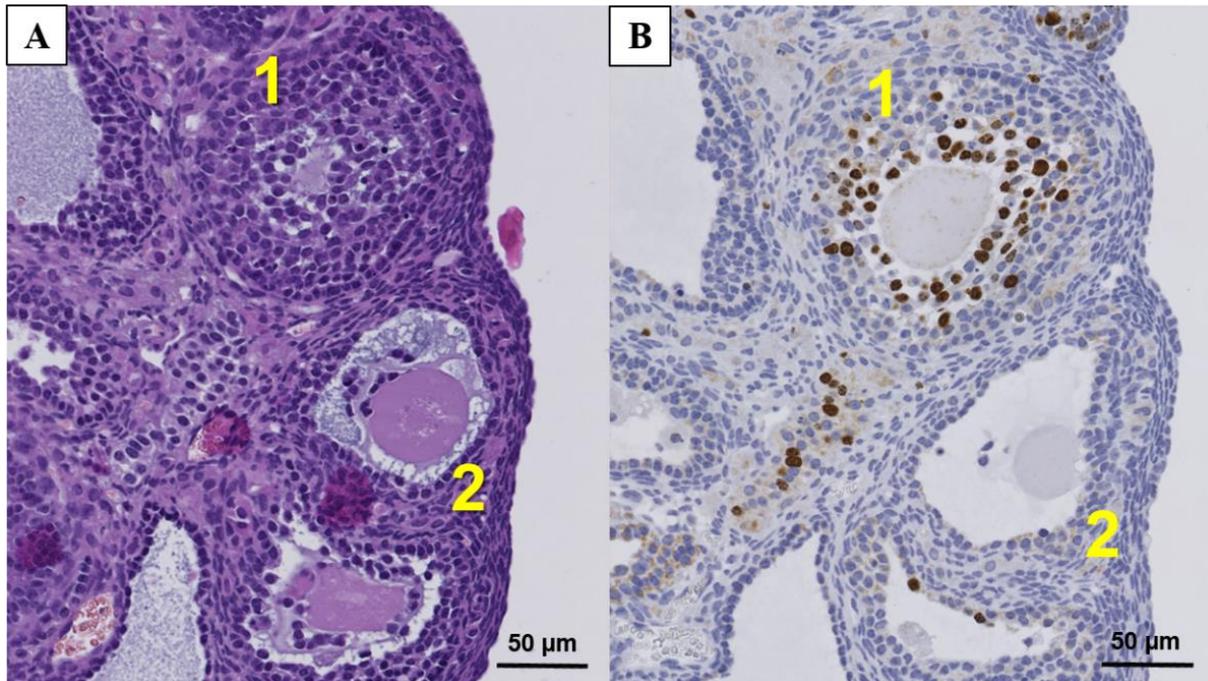


**Figure 12 : Frottis vaginal des souris en regard de l'histologie vaginale au cours du cycle œstral.**  
 Lu = lumière ; SM = *stratum mucification* ; SC = *stratum corneum* ; SGr = *stratum granulosum* ; SS = *stratum spinosum* ; SGe = *stratum germinativum* ; LP = *lamina propria* ; mu = mucus ; cercle vert : leucocyte ; flèche orange : cellule épithéliale kératinisée anucléée ; flèche violette : cellule épithéliale nucléée. Barre d'échelle : 100 µm. [Photographies et réalisation personnelles]

Par ailleurs, nous avons aussi utilisé un stock d'ovaires conservés en bloc de paraffine pour des souris âgées de 4 semaines à partir de prélèvements effectués en 2011–2012 à l'INSERM pour les génotypes ER $\alpha$ -WT, ER $\alpha$ -C451A et ER $\alpha$ <sup>-/-</sup>. Tous les ovaires utilisés (*i.e.* prélevés dans le cadre de l'expérimentation ou issus du stock) ont été coupés à 4  $\mu$ m d'épaisseur et colorés à l'Hématoxyline-Eosine (HE) selon le protocole de routine du laboratoire d'anatomo-pathologie de l'ENVT (**Annexe 1**). A partir d'une section choisie sur lame blanche (section histologique non colorée) correspondant au diamètre le plus large d'un des deux ovaires, j'ai décrit pour chaque souris la composition de la population de follicules observés. Pour cela différentes classifications des follicules sont disponibles mais sont assez hétérogènes (Pedersen et Peters 1968, Bucci *et al.* 1997, Britt *et al.* 2000, Durlinger *et al.* 2002, Kagabu et Umezu 2004, Da Silva-Buttkus *et al.* 2008, Bhardwaj et Sharma 2012, Petculescu-ciochină *et al.* 2012). A partir de ces références j'ai donc établi une classification des follicules (**Tableau 4**) comprenant sept classes (*i.e.* primordial, primaire, secondaire, tertiaire, corps jaune, atreétique et hémorragique/kystique). Les principaux critères que j'ai retenus sont la taille du follicule, les caractéristiques morphologiques des cellules composant le follicule ainsi que la nature de l'espace antral.

#### 2.4.2 Immunohistochimie

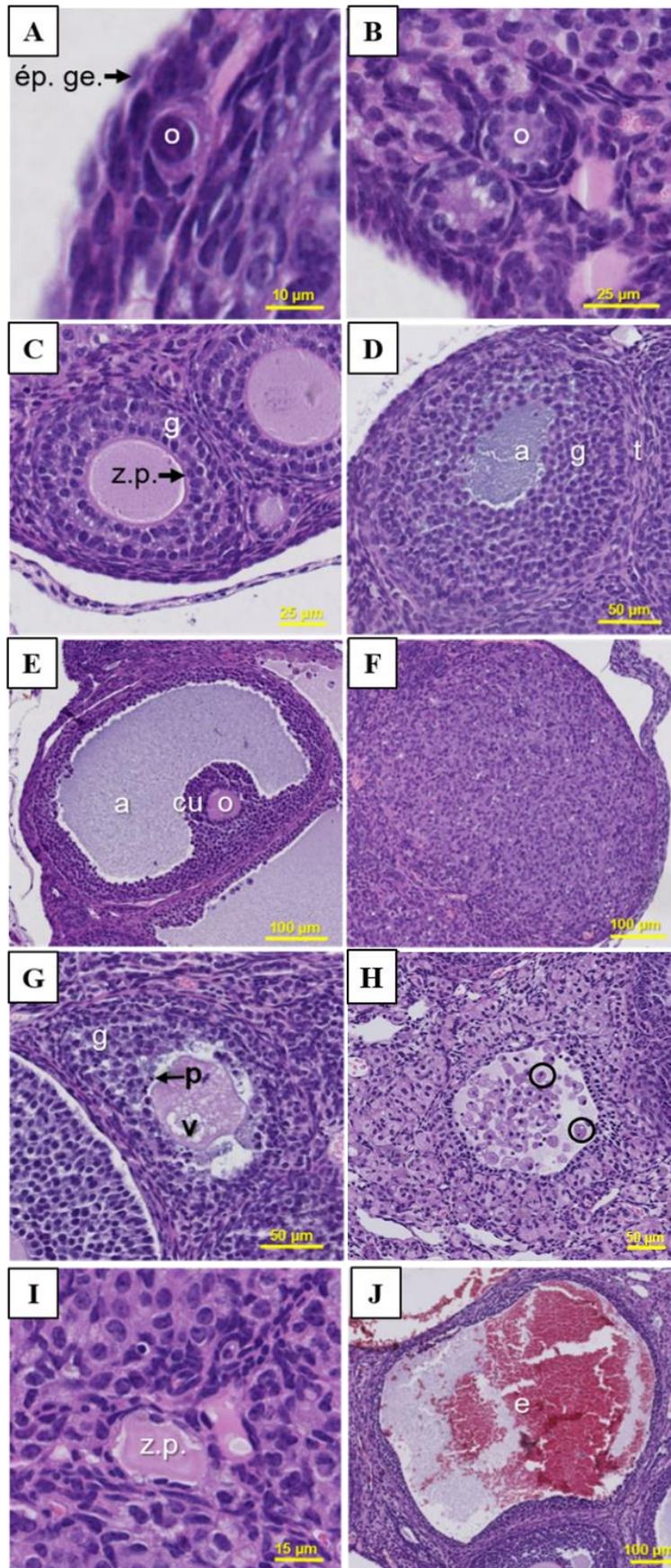
Malgré des critères de classification précis, l'identification des follicules ovariens est parfois problématique en histologie conventionnelle (HE). Les marqueurs de prolifération cellulaire, tels que l'antigène Ki-67 (protéine nucléaire présente dans toutes les phases du cycle de division des cellules mais absente en phase-G0) (Gerdes *et al.* 1984) facilitent l'identification des stades folliculaires comme cela a notamment été suggéré par Kenngott *et al.* (2013) chez la vache. Les cellules positives au Ki-67 permettent d'identifier des follicules sains avec des cellules de la granulosa prolifératives tandis que les follicules atreétiques n'expriment pas ou peu l'épitope Ki-67 dans les cellules de la granulosa (**Figure 13**). Il est important de souligner qu'avec la pratique, les follicules primordiaux sont aisément identifiables et ne nécessitent pas l'appui d'une immunohistochimie Ki-67, d'autant plus qu'un follicule primordial quiescent n'exprime pas l'antigène Ki-67 (Scalercio *et al.* 2015). Le marquage anti-Ki-67 positif peut en revanche être utile pour identifier les follicules primordiaux rentrant dans le cycle de maturation des follicules. Nous avons utilisé l'immunomarquage Ki-67 (RM-9106 ; Thermo-scientific) selon le protocole établi en routine au laboratoire (Abot *et al.* 2013) (**Annexe 2**) et sur des sections ovariennes succédant immédiatement aux coupes utilisées pour la coloration HE. Cela a ainsi permis de superposer les images obtenues (**Figure 13**).



**Figure 13 : Exemple d'identification de follicules sains ou atrétiques par évaluation immunohistochimique de l'épitope Ki-67 sur coupe sériée d'ovaire.** Sections histologiques sériées d'ovaire. Coloration HE (A). Immunohistochimie Ki-67 (B). Les cellules de la granulosa du follicule 1 semblent désorganisées : cette image histologique en HE (A) peut résulter soit de la formation multifocale de petits espaces remplis de liquide folliculaire avec quelques cellules en apoptose, ou bien d'un processus débutant d'atrésie. De plus, l'oocyte de ce follicule semble déformé et la couche de cellules l'entourant discontinue. Un doute persiste donc sur l'image HE quant à la nature saine ou atrétique du follicule 1. La présence de nombreux noyaux positifs au Ki-67 à un niveau de coupe proche (B) permet de lever le doute et de classer le follicule 1 en follicule sain et non atrétique. La coupe sériée environ 8 µm plus loin dans le bloc de paraffine (B) permet aussi d'évaluer pleinement la structure de l'oocyte qui s'avère normale alors que l'effet de coupe de l'image A pouvait prêter à confusion. Le follicule 2 est facilement classé en follicule atrétique sur image HE (A). En effet plusieurs critères d'atrésie sont visualisés : la zone pellucide est détachée de l'oocyte qui « flotte » dans la cavité antrale, les cellules de la granulosa se sont détachées de leur membrane basale et elles ne forment plus un revêtement mural continu. L'absence de marquage prolifératif (B) est un critère de plus qui confirme que le follicule 2 est effectivement en atrésie. [Photographies et réalisation personnelles]

**Tableau 4 : Critères de classification des follicules ovariens de souris.** [Réalisation personnelle]

Stade folliculaire	Caractéristiques morphologiques	Taille du follicule
<b>Primordial</b> (Fig. 14A)	Petit oocyte (o) sphérique entouré d'une couche discontinue ou non de cellules folliculaires pavimenteuses, le plus souvent situé en marge de l'ovaire sous l'épithélium germinatif (ép.ge)	< 20 µm
<b>Primaire</b> (Fig. 14B)	Oocyte (o) entouré d'un cercle complet de cellules folliculaires cuboïdales (si présence de cellules à la fois cuboïdales et pavimenteuses, le follicule est classé au stade primaire quand les cellules cuboïdales prédominent)	20-70 µm
<b>Secondaire (pré-antral)</b> (Fig. 14C)	Oocyte entouré par une zone pellucide (z.p.) bien définie et deux couches de cellules de la granulosa (g), sans antrum visible, ou bien avec un ou deux espaces contenant du liquide folliculaire	70-125 µm
<b>Tertiaire (antral) / Pré-ovulatoire (de De Graaf)</b> (Fig. 14D) (Fig. 14E)	<u>Follicule tertiaire</u> : oocyte entouré par plusieurs couches de cellules de la granulosa (g) avec formation des thèques (t) interne et externe concomitante de l'augmentation d'un espace antral (a) <u>Follicule pré-ovulatoire</u> : oocyte (o) entouré par une couche de cellules dérivées de la granulosa ( <i>corona radiata</i> et <i>cumulus oophorus</i> ) faisant protrusion dans un unique espace antral (a) bien formé et relié à la granulosa par un pédoncule du cumulus (cu), développement maximal des thèques	> 125 µm
<b>Corps jaune (<i>corpus luteum</i>)</b> (Fig. 14F)	Structure circulaire bien vascularisée résultant de l'hypertrophie et de l'hyperplasie des cellules lutéales : larges cellules polygonales rondes comprenant un abondant cytoplasme clair vacuolisé et un gros noyau central avec chromatine décondensée ; cellules organisées en petits cordons autour de vaisseaux anastomosés prolifératifs	-
<b>Atrétiques précoce et tardif</b> (Fig. 14G et 14H) (Fig. 14I)	<u>Atrétique précoce</u> (si au moins deux critères parmi les suivants sont rencontrés sur une même coupe histologique) : - Couches cellulaires de la granulosa (g) désorganisées - Décollement des cellules de la granulosa de la membrane basale - Plus de 10% de noyaux pycnotiques (p) dispersés - Débris cellulaires voire cellules folliculaires de grande taille avec noyaux pycnotiques (cercle) flottant dans la cavité antrale - Absence ou peu de marquage positif au Ki-67 des cellules de la granulosa - Cytoplasme oocytaire très éosinophile avec de multiples vacuolisations (v) optiquement vides - Oocyte avec une couronne de cellules folliculaires discontinue - voie perte de la couronne : oocyte flottant dans l'antrum - Fragmentation de l'ooplasm - Décollement entre la zone pellucide et l'oocyte <u>Atrétique tardif</u> : - Dégénérescence de l'oocyte et de la zone pellucide (z.p.) - Disparition massive des cellules de la granulosa - Persistance de la thèque interne renfermant en son centre la zone pellucide recroquevillée	-
<b>Hémorragique / Kystique</b> (Fig. 14J)	Cavité délimitée par une à quatre couches de cellules cuboïdales de la granulosa reposant sur la membrane basale Matériel pâle éosinophile ou érythrocytes (e) à l'intérieur de la cavité kystique	> diamètre follicule tertiaire ou pré-ovulatoire



**Figure 14 : Illustration des différentes classes de follicules ovariens (cf. Tableau 4 pour description).**  
 [Photographies et réalisation personnelles]

### 2.4.3 Morphométrie

Les lames histologiques ont été numérisées par un scanner de lames NanoZoomer (Hamamatsu ; Réf. 2.0-RS C10730-13). Ce système permet de transcrire des images de lames d'histologie complètes en images digitales d'une résolution d'environ 1.9 billion de pixels de façon rapide (moins de 2 minutes). J'ai ensuite analysé les images ainsi obtenues à l'aide du logiciel NanoZoomer Digital PathologyView 2.0 software (Hamamatsu) au grossissement  $\times 400$ . Pour chaque ovaire, j'ai observé au microscope l'aspect qualitatif de l'ovaire puis j'ai recensé le nombre de follicules aux différents stades, la taille des follicules, les périmètres ovariens et les aires de la surface de la granulosa et de la thèque du follicule tertiaire de plus grand diamètre de la section ovarienne. Les aires ont été déterminées comme dans l'étude de Moore *et al.* (2013). Ces différentes mesures et les annotations correspondantes ont été directement enregistrées sur chaque image virtuelle (**Annexe 4**) puis reportées dans des tableaux (**Annexe 5**). Dans les résultats le nombre de follicules à chaque stade est rapporté en proportion du nombre total de follicules observés par section histologique. Les aires sont aussi exprimées par rapport à l'aire folliculaire totale observée.

## 2.5 Dosages hormonaux

A l'âge de 12 semaines nous avons prélevé environ 500  $\mu\text{L}$  de sang par cardiocentèse sur chaque souris le jour de leur euthanasie. Le sérum a été séparé immédiatement des cellules sanguines par décantation après centrifugation à 13000 x g pendant 15 minutes. Les concentrations sériques de gonadotrophines : hormone lutéinisante (LH) et hormone folliculostimulante (FSH), ont été déterminées par la technologie Multiplex Immunoassay TechnologyXmap (MILLIPLEX, Millipore, S<sup>t</sup> Quentin en Yvelines, France). Les concentrations sériques des hormones stéroïdiennes : progestérone, 17 $\beta$ -œstradiol et testostérone ont été mesurées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) (Liere *et al.* 2000).

Pour évaluer le rétrocontrôle négatif de l'axe hypothalamo-hypophysaire chez les souris ER $\alpha$ -C451A, ER $\alpha$ -AF2<sup>o</sup>, ER $\alpha$ <sup>-/-</sup>, nous avons observé les effets d'une ovariectomie sur les taux de LH. Pour cela des souris de ces 3 génotypes et les WT issues des mêmes portées ont été ovariectomisées à 12 semaines d'âge pour supprimer la production ovarienne d'œstrogènes. Pour la chirurgie, les souris ont été anesthésiées avec produits injectables en intra-péritonéale à la dose de 10 mg/kg de poids corporel pour la kétamine (Merial, Lyon, France) et 1 mg/kg pour la xylazine (SigmaAldrich, Isle d'Abeau Chesnes, France). Après incision cutanée abdominale

et dissection des plans sous-cutanés et musculaires, le péritoine a été incisé et l’ovaire a été saisi délicatement en limitant les tractions sur la corne utérine ipsilatérale. Le ligament suspenseur et l’oviducte ont été ligaturés avec du fil résorbable VICRYL™ 3/0 et sectionnés afin d’enlever l’ovaire. Avec le même fil résorbable, le péritoine et les plans musculaires ont été suturés par un point en « X » et le plan cutané par un surjet simple. Les prélèvements sanguins pour doser la LH ont été réalisés au sinus rétro-orbital peu de temps avant ovariectomie, puis 15 jours après ovariectomie (durée estimée suffisante pour garantir la disparition de l’imprégnation œstrogénique).

## 2.6 Analyses statistiques

Pour chacune des variables de l’étude le nombre d’individus par génotype est résumé dans le **Tableau 5**. Dans les résultats, j’ai rapporté les moyennes des variables analysées avec leur erreur standard (ESM). Etant donné le faible effectif d’animaux par génotype, la normalité des données n’a pu être vérifiée. J’ai alors appliqué des tests statistiques non-paramétriques pour détecter d’éventuelles différences entre génotypes. Pour chacune des variables analysées, j’ai testé un effet du génotype à l’aide d’un test de Kruskal-Wallis. Lorsqu’un effet était détecté j’ai examiné les contrastes entre génotypes à l’aide d’un test post-hoc de Dunn (recommandé pour des comparaisons multiples entre groupes de taille variable comme c’est le cas ici), en appliquant une correction de Bonferroni pour prendre en compte la diminution de la fiabilité du test lors de comparaisons multiples. Les statistiques ont été réalisées sous R version 3.4.1 (R core team. R Foundation for Statistical Computing 2017) avec le package PMCMR (Pohlert 2014).

**Tableau 5 : Effectifs de souris par génotype pour les mesures effectuées à différents âges**

Mesures analysées	Age (semaines)	Génotype			
		 ERα-WT	 ERα-C451A	 ERα-AF2°	 ERα <sup>-/-</sup>
Cycle œstral	4-5	12	5	3	3
	26	3	3	0	0
Comptage folliculaires	4-5	13 <sup>1</sup>	11 <sup>1</sup>	0	6 <sup>1</sup>
	12	17	8	7	6
Aires granulosa / thèque	12	19	10	8	6
Dosages hormonaux (taux sanguins)	12	9 à 23 <sup>2</sup>	6 à 17 <sup>2</sup>	6 à 7 <sup>2</sup>	0 à 9 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> obtenus à partir d’une banque d’ovaires établie en 2011-2012 à l’INSERM

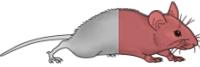
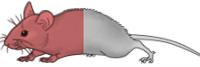
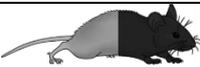
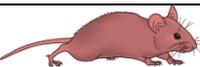
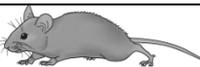
<sup>2</sup> selon les hormones dosées

### 3 Résultats

#### 3.1 Reproduction et cyclicité sexuelle : les souris $ER\alpha$ -C451A sont infécondes et présentent une anomalie du cycle œstral à l'âge adulte, différente des mutants $ER\alpha$ -AF2° et $ER\alpha$ <sup>-/-</sup>

À l'issue de la période d'accouplement de 5 mois avec des mâles WT fertiles, aucune des souris femelles  $ER\alpha$ -C451A n'a produit de souriceaux (**Tableau 6**). Les souris du génotype hétérozygote à partir duquel les  $ER\alpha$ -C451A ont été générées ( $ER\alpha^{+/C451A}$ ) avaient une productivité réduite par rapport aux souris hétérozygotes  $ER\alpha^{+/-}$  utilisées pour générer les souris  $ER\alpha^{-/-}$ . Ceci était lié à un plus petit nombre de portées par femelle ( $p < 0,05$ ) plutôt qu'à des portées de plus petite taille ( $p = 0,23$ ).

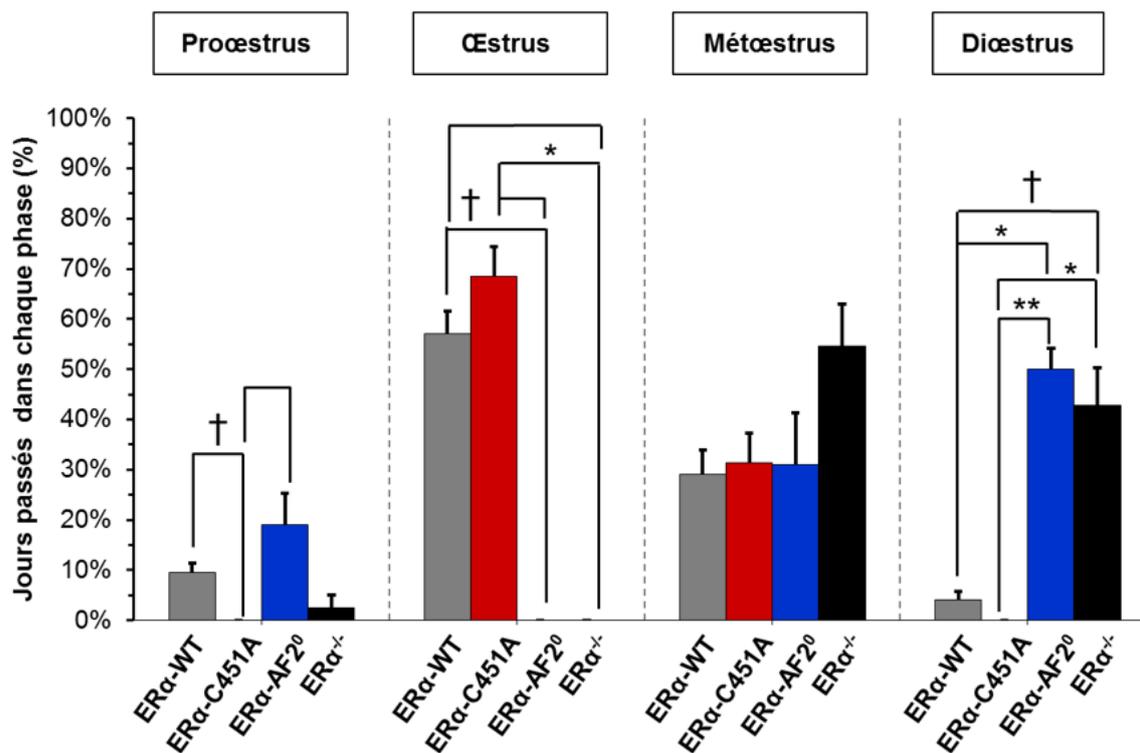
**Tableau 6 : Taux de reproduction des mutants  $ER\alpha^{+/C451A}$ ,  $ER\alpha^{+/-}$ , et  $ER\alpha$ -C451A à l'issue d'une période d'accouplement continue de 5 mois.** ESM = Erreur Standard de la Moyenne

Accouplement		n	Nombre de portées	Nombre total de souriceaux nés	Taille de portée moyenne	Nombre de portées par femelle
♀	♂					
 $ER\alpha^{+/C451A}$	 $ER\alpha^{+/C451A}$	26	49	315	1,63 ESM = 0,2	8,54 ESM = 1,21
 $ER\alpha^{+/-}$	 $ER\alpha^{+/-}$	8	22	141	2,75 ESM = 0,3	12,6 ESM = 0,71
 $ER\alpha$ -C451A	 $ER\alpha$ -WT	8	0	0	0	0

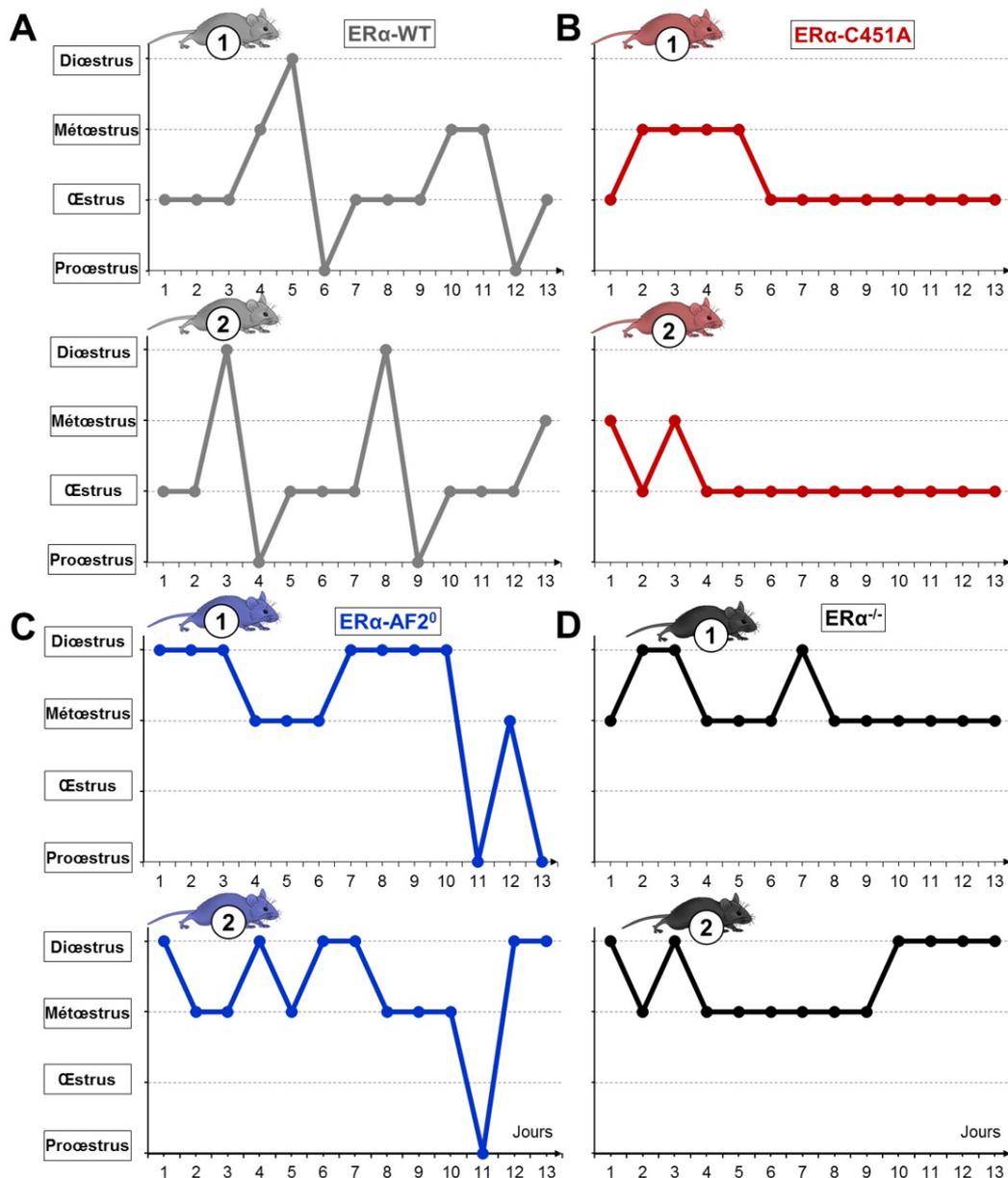
Dans la suite des résultats (excepté pour les dosages hormonaux), les mesures issues des différentes portées WT de chaque lignée mutante ( $ER\alpha$ -C451A,  $ER\alpha$ -AF2°,  $ER\alpha^{-/-}$ ) ont été combinées et associées à un seul génotype contrôle ( $ER\alpha$ -WT) après avoir vérifié l'absence de différences entre ces souches.

Afin de déterminer si la chute du taux de reproduction observée était associée à un dérèglement du cycle œstral, comme précédemment décrit chez le mutant  $\alpha$ ERKO (Couse et Korach 1999), nous avons évalué ce cycle sur chacun des génotypes de notre étude, de manière précoce à 5 semaines et chez des souris adultes de 26 semaines.

À 5 semaines d'âge, les souris contrôles ont présenté un cycle œstral typique de 4-5 jours, passant successivement par les phases de proœstrus, œstrus, métœstrus/diœstrus (**Figure 16**). Contrairement à ces souris ER $\alpha$ -WT, aucune des souris des génotypes ER $\alpha$ -C451A, ER $\alpha$ -AF2 $^{\circ}$  et ER $\alpha^{-/-}$  n'a montré des signes patents de cyclicité œstrale (**Figure 16**). Nous avons détecté des différences de cycles œstraux entre génotypes concernant le pourcentage de jours détectés en proœstrus (test de Kruskal-Wallis ;  $\chi^2$  (3) = 11,2, p = 0,011), en œstrus ( $\chi^2$  (3) = 14,5, p = 0,002) et en diœstrus ( $\chi^2$  (3) = 16,1, p = 0,001). Ces différences correspondaient principalement à une absence d'œstrus et à une augmentation du temps passé en diœstrus chez les souris sans effet nucléaire du ER $\alpha$  (ER $\alpha$ -AF2 $^{\circ}$ ) et chez les souris totalement déficientes pour ER $\alpha$  (ER $\alpha^{-/-}$ ) par rapport aux souris WT (**Figure 15**). Au contraire les souris ER $\alpha$ -C451A n'ont pas présenté de différence significative du temps relatif passé dans chacune des phases par rapport aux souris WT (**Figure 15**). Toutefois, contrairement aux souris WT, au cours des 14 jours de la période d'observation, aucune des souris ER $\alpha$ -C451A n'est passée par les phases de proœstrus et de diœstrus. Le temps passé entre changements de phase est apparu plus long par rapport aux souris WT (**Figure 16**).

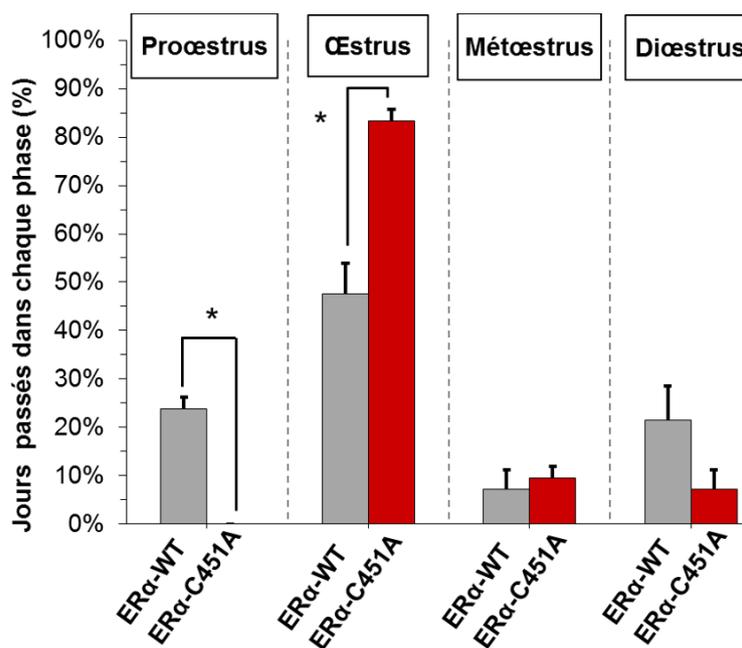


**Figure 15 : Pourcentages moyens de jours passés dans chaque phase du cycle œstral pour les mutants étudiés (ER $\alpha$ -C451A, n = 5 ; ER $\alpha$ -AF2 $^{\circ}$ , n = 3 ; ER $\alpha^{-/-}$ , n = 3), et leurs contrôles (ER $\alpha$ -WT, n = 12) à 5 semaines d'âge.** Les souris ont été observées pendant une période de 14 jours. Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne. Les différences entre génotypes pour lesquelles les valeurs-p (test de Dunn) sont inférieures à 0,1 sont indiquées : † p < 0,1 ; \* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001.



**Figure 16 : Changements de phase du cycle œstral observés pendant 14 jours pour les mutants étudiés (B : ERα-C451A ; C : ERα-AF2<sup>0</sup> ; D : ERα<sup>-/-</sup>) et leurs contrôles (A : ERα-WT) à 5 semaines d'âge.**

À 26 semaines d'âge, les souris ERα-C451A montraient des cycles œstraux différents des souris WT au niveau du temps passé en proœstrus ( $\chi^2(1) = 4,5$  ;  $p = 0.034$ ) et en œstrus ( $\chi^2(1) = 4$  ;  $p = 0.046$ ) (**Figure 17**). A l'instar des souris ERα-AF2<sup>0</sup> et ERα<sup>-/-</sup> qui apparaissaient presque « bloquées » en phases de métœstrus/diœstrus à 5 semaines d'âge, les souris adultes ERα-C451A semblaient aussi « bloquées » mais en phase d'œstrus (**Figure 18**). Ces différences plus marquées à l'âge adulte ont confirmé les changements de phase du cycle œstral précédemment observés à 5 semaines d'âge (**Figure 16B**).



**Figure 17 : Pourcentages moyens de jours passés à chaque phase du cycle œstral pour les mutants ERα-C451A (n = 3) et leurs contrôles (ERα-WT, n = 3) à 26 semaines d'âge.** Les souris ont été observées pendant une période de 14 jours. Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne. Les différences entre génotypes pour lesquelles les valeurs-p (test de Dunn) sont inférieures à 0,1 sont indiquées : † p < 0,1 ; \* p < 0,05

En résumé, les résultats de reproduction et de cyclicité sexuelle ont indiqué que la mutation Cys451A chez la souris ERα-C451A provoque une altération drastique de la fécondité des femelles, et une anomalie du cycle œstral qui, d'après la comparaison du temps passé dans les différentes phases du cycle œstral, se manifeste surtout à l'âge adulte. A l'âge de 5 semaines l'anomalie du cycle œstral des souris ERα-C451A a cependant semblé différente et moins marquée que celle des souris sans effets nucléaires du ERα (ERα-AF2°) et que celle des souris totalement déficientes pour ERα (ERα<sup>-/-</sup>).

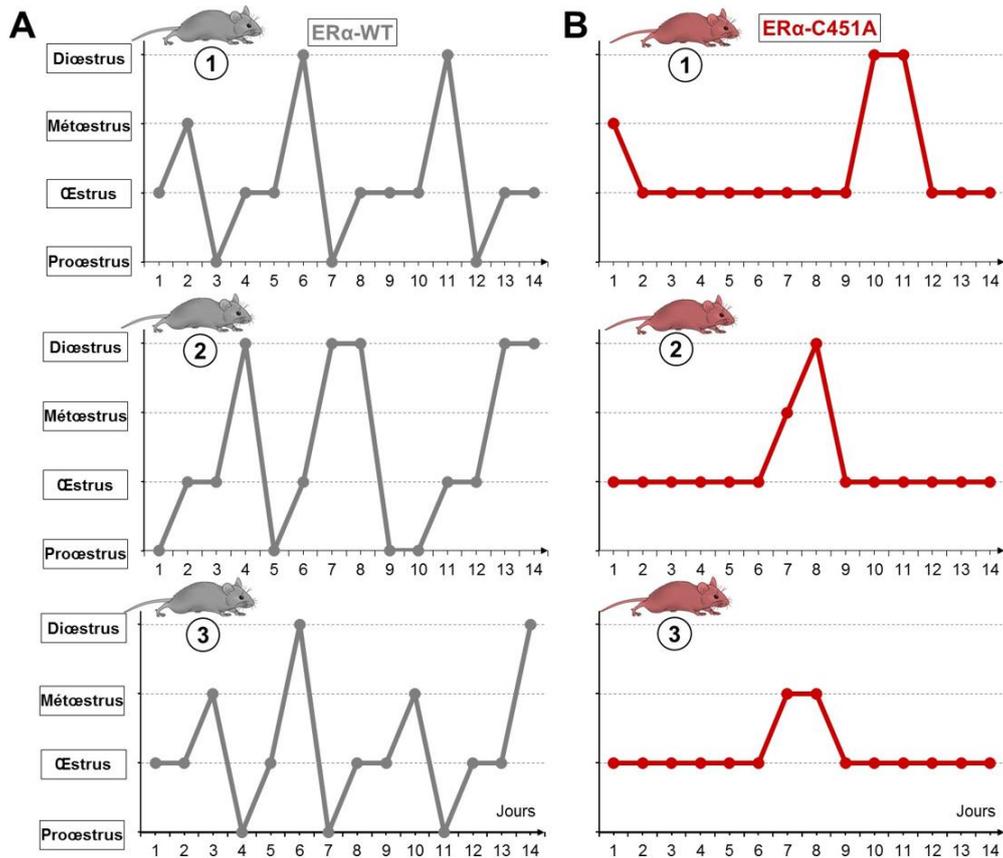
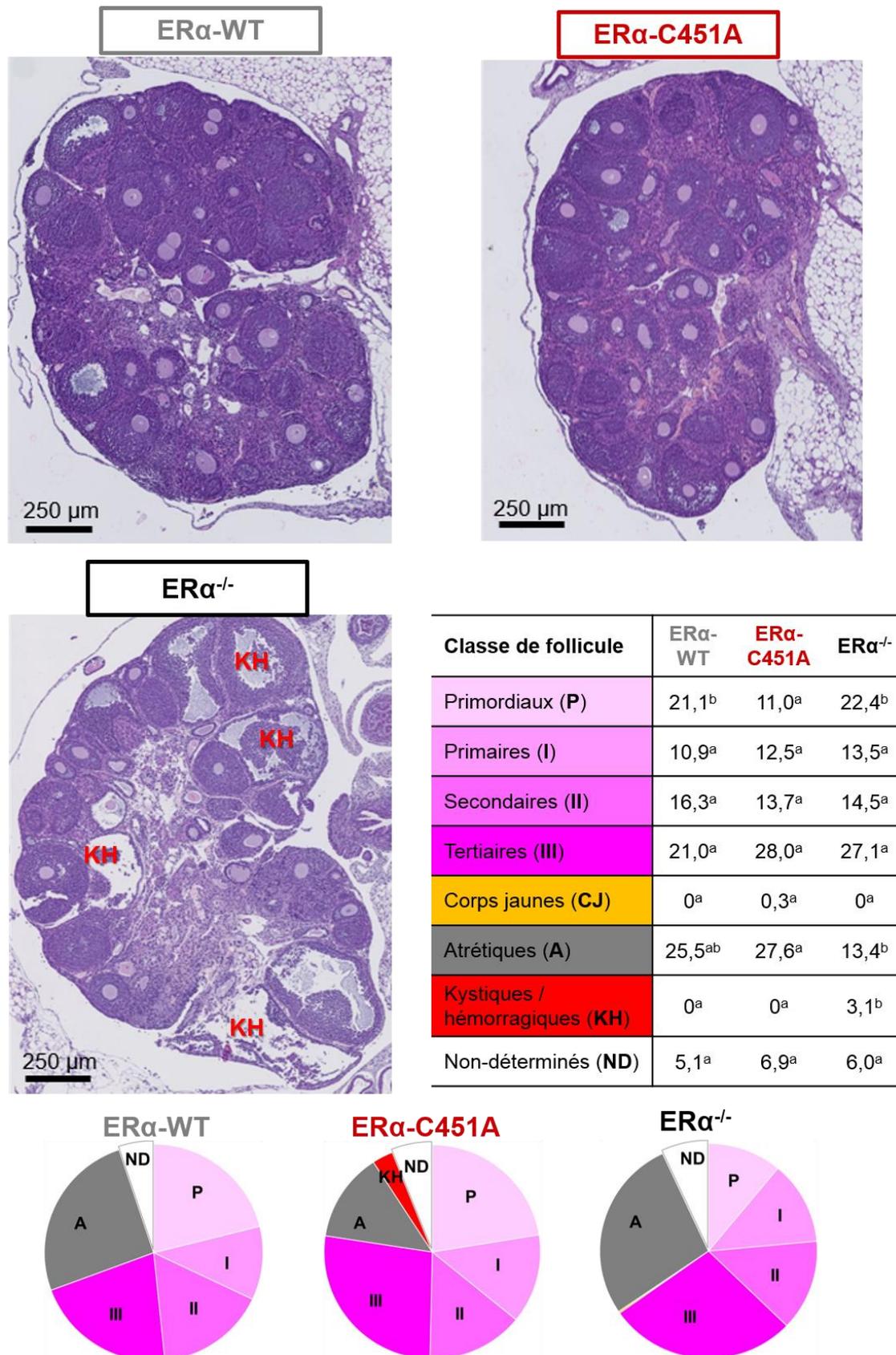


Figure 18 : Changements de phase du cycle œstral observés pendant 14 jours pour les mutants  $ER\alpha$ -C451A (B) et leurs contrôles (A) à 26 semaines d'âge.

### 3.2 Histopathologie et morphométrie de l'ovaire : les souris $ER\alpha$ -C451A présentent une altération de la folliculogénèse, plus tard que les souris $ER\alpha^{-/-}$

Chez les souris âgées de 4 semaines, l'analyse histopathologique des ovaires de souris  $ER\alpha$ -C451A,  $ER\alpha^{-/-}$  et leurs contrôles ( $ER\alpha$ -WT) a révélé des différences notables de proportion de follicules primordiaux ( $\chi^2(2) = 9$  ;  $p = 0,011$ ), de follicules atrétiques ( $\chi^2(2) = 6,4$  ;  $p = 0,040$ ), et de follicules kystiques/hémorragiques ( $\chi^2(2) = 17$  ;  $p < 0,001$ ). Les ovaires des souris  $ER\alpha$ -C451A contenaient moins de follicules primordiaux que ceux des souris  $ER\alpha$ -WT et  $ER\alpha^{-/-}$  (Figure 19). Le pourcentage de follicules primaires, secondaires et tertiaires était comparable pour les trois génotypes. En revanche, à 4 semaines d'âge, les souris  $ER\alpha^{-/-}$  présentaient déjà des follicules kystiques ou hémorragiques élargis contrairement aux femelles  $ER\alpha$ -C451A et  $ER\alpha$ -WT.



**Figure 19 : Sections histologiques d'ovaires et comptages folliculaires pour les mutants ER $\alpha$ -C451A (n = 11), ER $\alpha$ <sup>-/-</sup> (n = 6), et leurs contrôles (ER $\alpha$ -WT, n = 11) à 4 semaines d'âge. Dans le tableau : <sup>a</sup>; <sup>b</sup>; <sup>ab</sup> pour chaque classe de follicule, les valeurs des génotypes partageant une même lettre ne sont pas significativement différentes (p > 0,05 ; test de Dunn).**

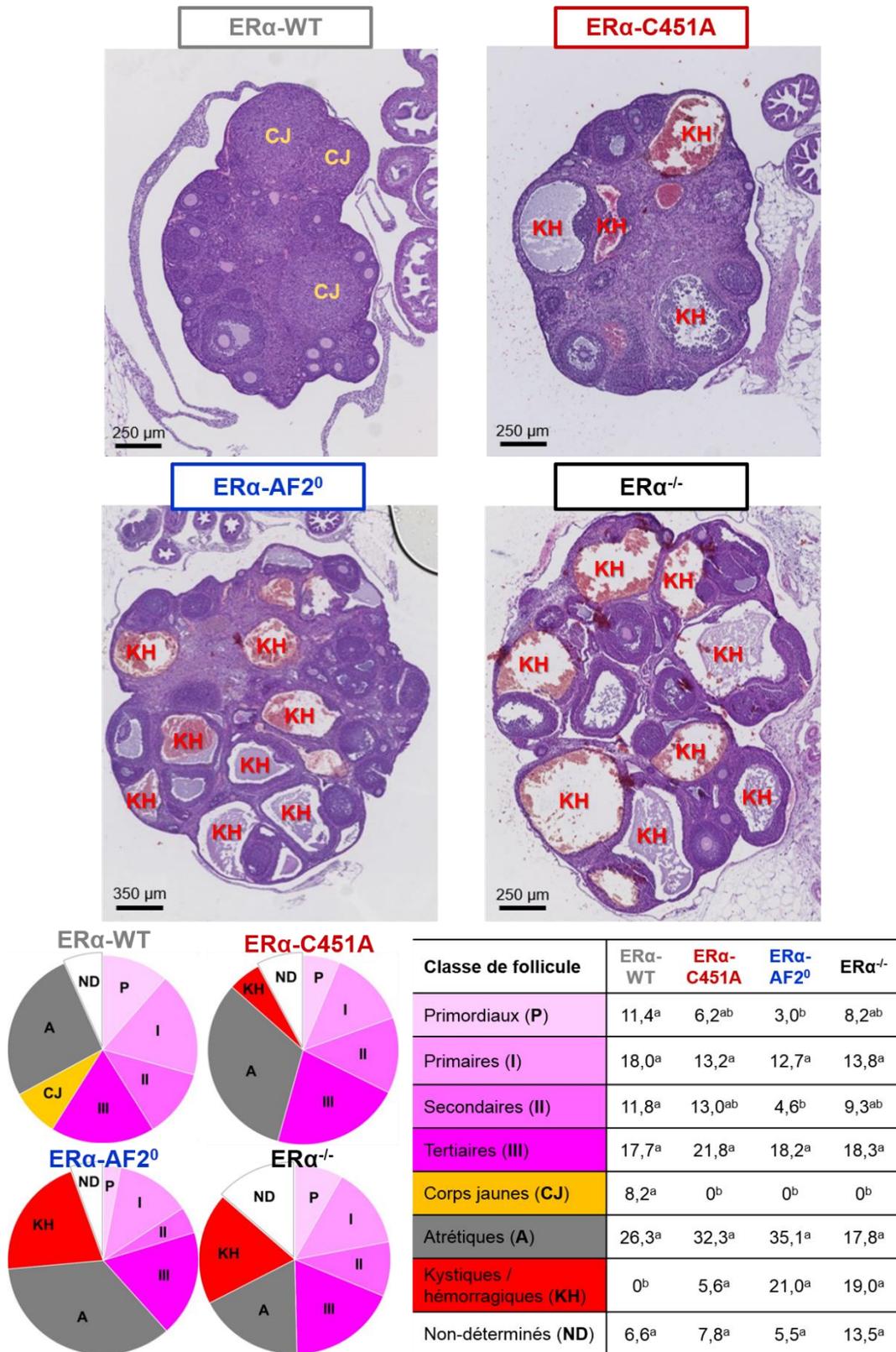
### A l'âge adulte (12 semaines)

Les souris  $ER\alpha$ -WT ont présenté une morphologie ovarienne normale, tandis que plusieurs structures kystiques et hémorragiques faisaient protrusion à la surface des ovaires des souris  $ER\alpha$ -C451A (**Figure 20**).



**Figure 20** : Photographies des ovaires d'une souris contrôlée ( $ER\alpha$ -WT) et d'une mutante  $ER\alpha$ -C451A à 12 semaines d'âge.

En plus des trois génotypes étudiés à l'âge de 4 semaines, les ovaires des souris  $ER\alpha$ -AF2<sup>o</sup> ont aussi été examinés, mais à l'âge adulte. Comme à 4 semaines d'âge, le pourcentage de follicules primaires, secondaires et tertiaires était comparable entre les souris  $ER\alpha$ -C451A,  $ER\alpha^{-/-}$  et leurs contrôles ( $ER\alpha$ -WT) à 12 semaines d'âge, alors que les souris  $ER\alpha$ -AF2<sup>o</sup> présentaient moins de follicules primordiaux et de follicules tertiaires par rapport aux  $ER\alpha$ -WT (**Figure 21**). La faible proportion de follicules primordiaux des souris  $ER\alpha$ -C451A par rapport aux souris  $ER\alpha$ -WT observée à 4 semaines n'a pas été confirmée à l'âge adulte. Contrairement aux femelles  $ER\alpha$ -WT, aucune souris adulte mutante n'a montré la présence de corps jaune. A l'inverse, les trois génotypes mutants ont montré une proportion notable de follicules kystiques et hémorragiques (de grande taille), reflétant une évolution anormale de la maturation tardive des follicules, de l'ovulation et de l'évolution post-ovulatoire des cellules de la thèque et de la granulosa. Certains follicules avaient un aspect dystrophique et de nombreuses images folliculaires se sont avérées plus difficiles à classer.



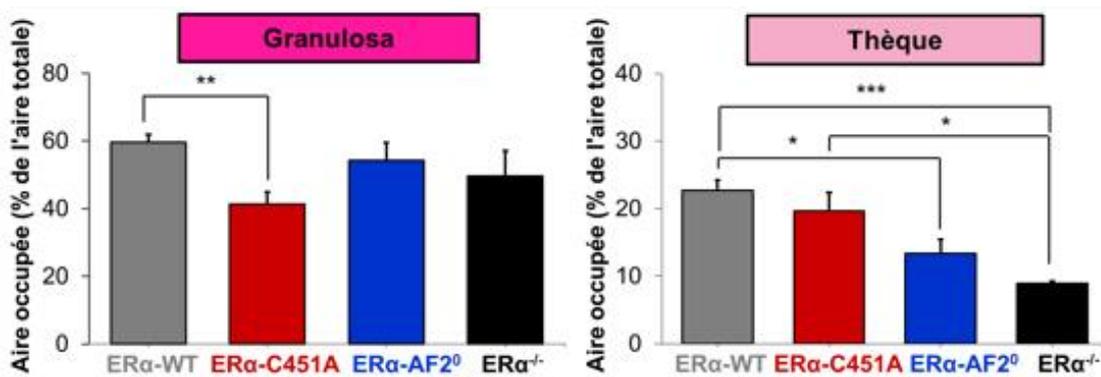
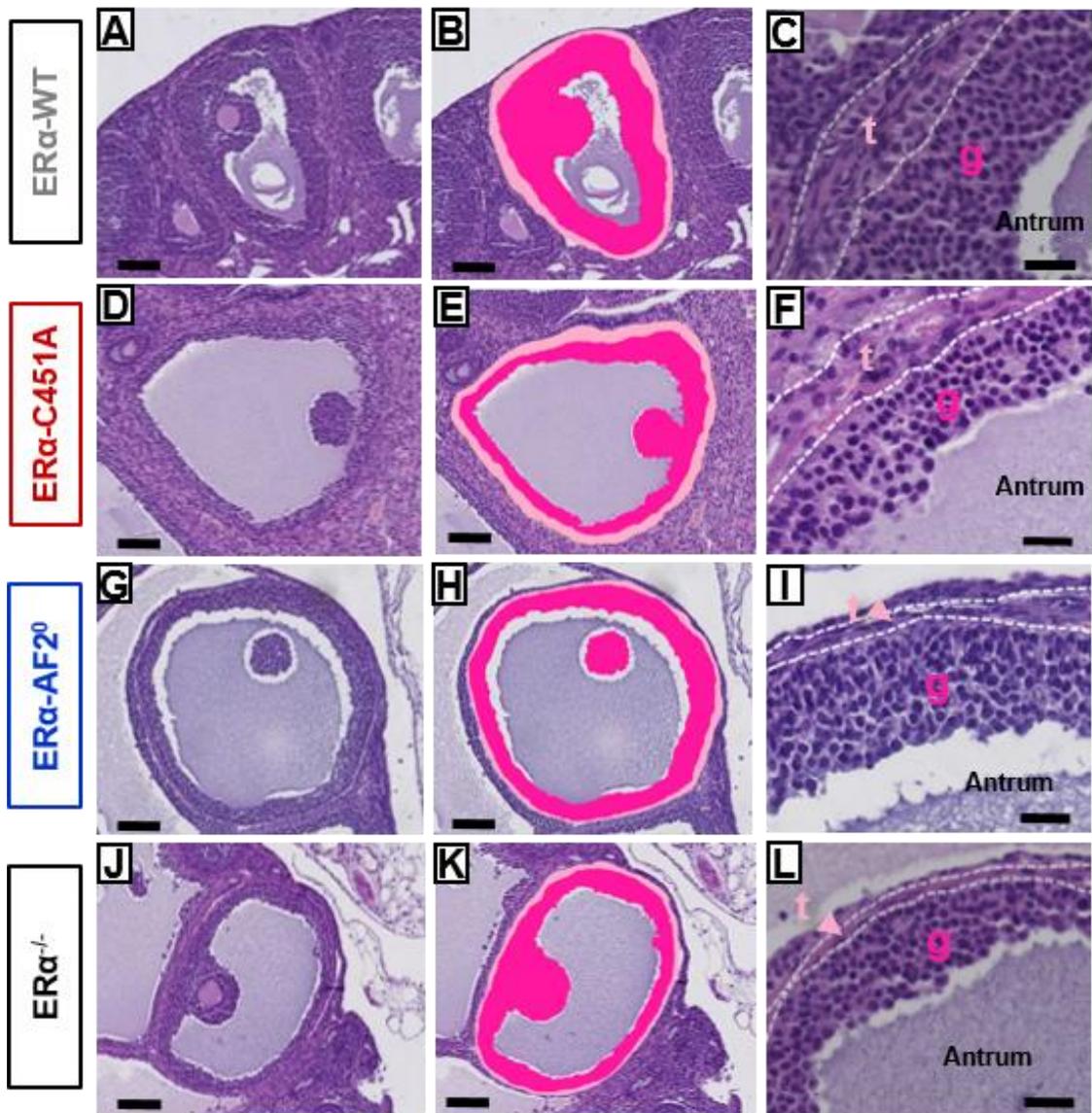
**Figure 21 : Sections histologiques d'ovaires et comptages folliculaires pour les mutants ERα-C451A (n = 8), ERα-AF2<sup>0</sup> (n = 7), ERα<sup>-/-</sup> (n = 6) et leurs contrôles (ERα-WT, n = 17) à 12 semaines d'âge. Dans le tableau : <sup>a</sup>; <sup>b</sup>; <sup>ab</sup> pour chaque classe de follicule, les valeurs des génotypes partageant une même lettre ne sont pas significativement différentes (valeur-p > 0,05 ; test de Dunn).**

L'analyse morphométrique fine des follicules tertiaires a permis de vérifier les aspects de maturation tardive anormale des follicules (**Figure 22**). A l'âge adulte (12 semaines) bien que les résultats précédents indiquaient une proportion de follicules tertiaires comparable entre génotypes (**Figure 21**), la morphométrie de ces follicules s'est avérée sensiblement variable. Les follicules observés des souris ER $\alpha$ -C451A avaient une aire occupée par la granulosa proportionnellement plus petite par rapport aux souris ER $\alpha$ -WT ( $\chi^2(3) = 11,7$  ;  $p = 0,008$ ). En revanche, chez les souris ER $\alpha$ -C451A l'aire proportionnellement occupée par la thèque semblait normale contrairement aux souris ER $\alpha$ -WT et ER $\alpha^{-/-}$  pour lesquelles cette aire était réduite.

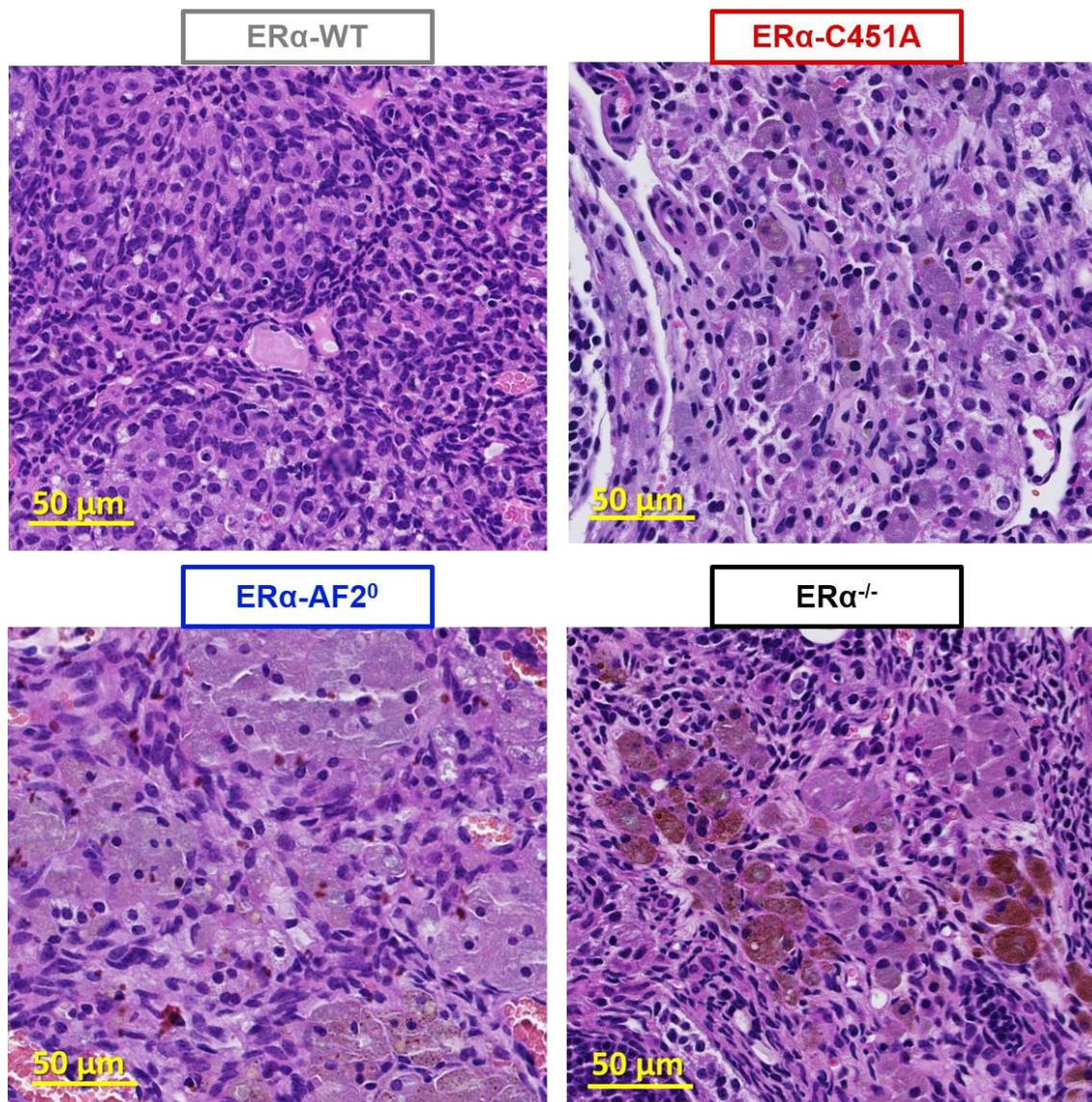
Par ailleurs, les cellules glandulaires interstitielles contenues dans le stroma ovarien des souris ER $\alpha$ -C451A, ER $\alpha$ -AF2° et ER $\alpha^{-/-}$  se sont distinguées de celles des souris ER $\alpha$ -WT par deux aspects morphologiques majeurs (**Figure 23**). D'une part, elles présentaient une hypertrophie cellulaire marquée avec diminution du rapport nucléo-cytoplasmique et une moindre densité cellulaire du fait du volume occupé par ces cellules à l'aspect « dodu ». D'autre part, elles montraient une accumulation intracytoplasmique de substances d'affinité tinctoriale différente repoussant systématiquement le noyau à la périphérie cellulaire :

- substance granuleuse pâle basophile multifocale à diffuse,
- pigments jaune-brun grossièrement ronds d'environ 1 à 3  $\mu\text{m}$  de diamètre, dont le nombre important obstrue parfois le cytoplasme et masque le noyau (pigments de lipofuscine le plus probablement),
- petites enclaves optiquement vides bien délimitées, parfois coalescentes (vacuoles lipidiques le plus probablement).

Cette apparence caractéristique du stroma ovarien peut être qualifiée de « stroma lutéinisé ». Globalement l'architecture des cellules glandulaires interstitielles en cordons ou en nids, communément observé chez les ER $\alpha$ -WT, a été observée chez les trois génotypes mutés.



**Figure 22 : Aires relatives des couches des cellules de la granulosa et de la thèque dans les follicules tertiaires pour les mutants ERα-C451A (n = 10), ERα-AF2° (n = 8), ERα<sup>-/-</sup> (n = 6) et leurs contrôles (ERα-WT, n = 19) à 12 semaines d'âge. Planche : vues globales des follicules A, B, D, E, G, H, J et K (barre d'échelle 100 μm), fuchsia = granulosa, rose clair = thèque ; vues agrandies C, F, I et L (barre d'échelle 25 μm) ; g = granulosa : t = thèque. Histogrammes : les barres représentent l'erreur standard de la moyenne. Les différences entre génotypes pour lesquelles les valeurs-p (test de Dunn) sont inférieures à 0,1 sont indiquées : \* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001**



**Figure 23 : Aspect histologique représentatif des glandes interstitielles du stroma ovarien pour les mutants  $ER\alpha$ -C451A,  $ER\alpha$ -AF2°,  $ER\alpha$ -/- et leurs contrôles ( $ER\alpha$ -WT).**

Les analyses histopathologique et morphométrique des ovaires ont montré que les souris  $ER\alpha$ -C451A présentent un phénotype caractéristique d'ovaires polykystiques avec une absence de corps jaune et une diminution de la qualité des follicules tertiaires. Ces observations reflètent un défaut de maturation folliculaire chez les souris  $ER\alpha$ -C451A, un trouble de l'ovulation et du développement des corps jaunes. Ces modifications de la morphologie ovarienne se sont produites également en partie chez les souris  $ER\alpha$ -/- mais de manière plus précoce comme l'indiquait la présence de follicules kystiques/hémorragiques dès l'âge de 4 semaines.

### 3.3 Régulation de la fonction ovarienne : les souris ER $\alpha$ -C451A présentent une altération partielle du rétrocontrôle négatif des œstrogènes

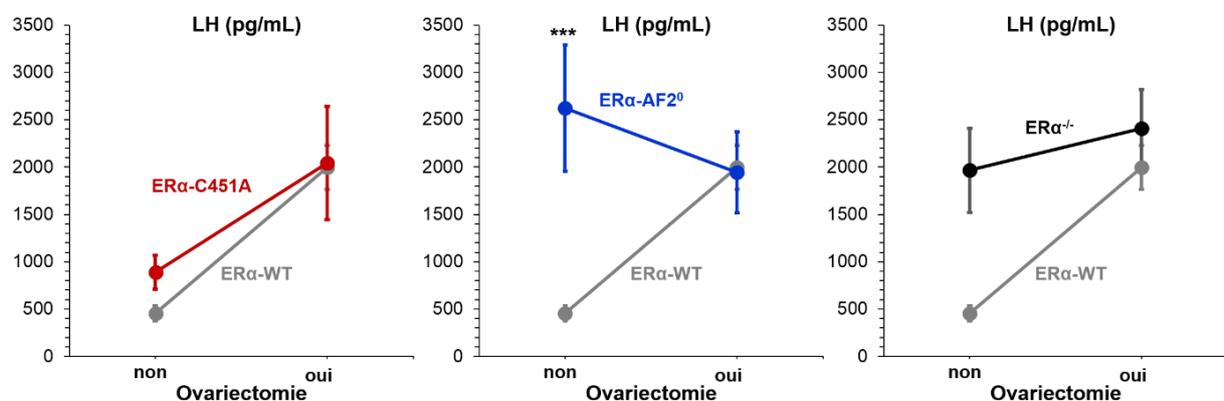
Afin de caractériser le statut hormonal associé à chacun des mutants du ER $\alpha$ , les hormones ovariennes (progestérone, 17 $\beta$ -œstradiol, testostérone) et les hormones gonadotropes (hormone lutéinisante (LH) et hormone folliculo-stimulante (FSH)) ont été mesurées chez des femelles mutantes à 12 semaines. Ces hormones varient au cours du cycle œstral, chaque lignée mutante a été comparée à son contrôle ER $\alpha$ -WT synchronisé dans la même phase du cycle œstral (**Tableau 7**). Le génotype ER $\alpha$ -C451A intact en phase d'œstrus est caractérisé par un taux élevé de LH par rapport aux souris ER $\alpha$ -WT ( $\chi^2$  (1) = 10 ; p = 0,002). C'est aussi le cas pour les génotypes mutés ER $\alpha$ -AF2 $^\circ$  et ER $\alpha$  $^{-/-}$  en phase métœstrus/diœstrus ( $\chi^2$  (2) = 10,6 ; p = 0,005) avec de plus larges écarts par rapport aux ER $\alpha$ -WT (environ  $\times$  10). Au contraire la FSH n'a varié chez aucun des mutants par rapport aux ER $\alpha$ -WT dans une même phase du cycle œstral. Les concentrations sériques de 17 $\beta$ -œstradiol et de testostérone disponibles pour les souris ER $\alpha$ -C451A, ER $\alpha$ -AF2 $^\circ$ , et leurs contrôles, ont varié dans le même sens que pour la LH, c'est-à-dire une augmentation plus marquée chez les souris ER $\alpha$ -AF2 $^\circ$  que chez les souris ER $\alpha$ -C451A. On a également détecté un taux bas de progestérone chez les souris ER $\alpha$ -C451A ( $\chi^2$  (2) = 12 ; p < 0,001) mais pas chez les souris ER $\alpha$ -AF2 $^\circ$  ( $\chi^2$  (1) = 2,5 ; p = 0,12).

**Tableau 7 : Moyennes (avec erreur standard) des taux d'hormones chez les différents génotypes de souris à 12 semaines d'âge.**

Hormone (pg/mL)	Phase d'œstrus		Phase de métœstrus / diœstrus		
	ER $\alpha$ -WT	ER $\alpha$ -C451A	ER $\alpha$ -WT	ER $\alpha$ -AF2 $^\circ$	ER $\alpha$ $^{-/-}$
LH	171,2 (40,8) n = 5	890,9 (179,4)** n = 12	199,5 (47,5) n = 5	2148,6 (389,6)** n = 6	2011,9 (350,1)* n = 8
FSH	526,2 (150,1) n=5	716,9 (77,7) n = 12	869,6 (115) n = 4	712,7 (165,9) n = 6	685,5 (147,5) n = 9
17 $\beta$ -œstradiol	2,06 (1,21) n = 5	16,56 (2,95)** n = 10	5,83 (2,30) n = 7	43,07 (5,48)** n = 7	-
Progestérone	1452,6 (269,1) n = 17	348,9 (52,3)*** n = 17	1606,2 (421) n = 6	990,6 (428,9) n = 7	-
Testostérone	17,28 (5,07) n = 6	39,95 (4,80)* n = 6	21,76 (10,16) n = 8	1374,8 (129,4)** n = 7	-

Les différences significatives (valeurs-p < 0,05 ; test de Dunn) entre chaque génotype et ER $\alpha$ -WT pour une même phase du cycle œstrale sont indiquées : \* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001

**Pour évaluer la régulation négative de l'axe hypothalamo-hypophysaire chez les souris ER $\alpha$ -C451A, nous avons observé l'influence de l'ovariectomie sur les taux de LH (Figure 24).** En effet, l'augmentation de LH précédemment observée suggérait une absence de rétrocontrôle négatif des hormones ovariennes (17 $\beta$ -œstradiol) sur les sécrétions hypothalamo-hypophysaires de LH, en particulier chez les mutants ER $\alpha$ -AF2 $^\circ$  et ER $\alpha$  $^{-/-}$ . Chez les souris ER $\alpha$ -WT, l'ovariectomie a supprimé le rétrocontrôle négatif endogène et a donc induit une augmentation du taux de LH qui est devenu près de 4,5 fois supérieur pour les femelles ovariectomisées par rapport à l'état intact (453 pg/mL, SEM = 81 *versus* 1996 pg/mL, SEM = 233). Chez les souris ER $\alpha$ -C451A qui présentaient déjà un taux modérément élevé de LH à l'état intact (891 pg/mL, SEM = 179), l'ovariectomie a aussi été associée à un plus fort taux de LH (2043 pg/mL, SEM = 597). A l'inverse, l'ovariectomie n'a pas induit d'augmentation du taux de LH chez les mutants ER $\alpha$ -AF2 $^\circ$  et ER $\alpha$  $^{-/-}$  qui présentaient un taux basal de LH déjà très élevé (2622 pg/mL, SEM = 665, et 1964 pg/mL, SEM = 444, respectivement). Ces résultats préliminaires suggèrent que le rétrocontrôle négatif de l'œstradiol sur les sécrétions hypothalamo-hypophysaires de LH est fonctionnel uniquement chez le mutant ER $\alpha$ -C451A et absent chez les mutants ER $\alpha$ -AF2 $^\circ$  et ER $\alpha$  $^{-/-}$ .



**Figure 24 : Réponses du taux sérique de LH à l'ovariectomie pour les mutants ER $\alpha$ -C451A, ER $\alpha$ -AF2 $^\circ$ , ER $\alpha$  $^{-/-}$  et leurs contrôles (ER $\alpha$ -WT) à 12 semaines d'âge. n = 6 à 23 selon les groupes. Les différences des mutants par rapport aux contrôles dans un même état (intact ou ovariectomisé) sont indiquées : \*\*\* p < 0,001 (2 way-ANOVA).**

## 4 Discussion générale et perspectives

Le récepteur ER $\alpha$  est absolument nécessaire à la fertilité femelle (Dupont *et al.* 2000) mais l'importance des mécanismes cellulaires en jeu, en particulier la contribution relative des effets nucléaires et membranaires du ER $\alpha$  restait à établir. L'infécondité des souris ER $\alpha$ -AF2 $^{\circ}$  (Billon-Galés *et al.* 2011) indiquait la nécessité des effets nucléaires à la fertilité femelle. Ici, nous avons validé l'hypothèse centrale de notre étude selon laquelle ces seuls effets nucléaires ne suffisent pas à la fertilité femelle et donc, que les effets membranaires du ER $\alpha$  sont également nécessaires. Cependant, bien que les souris des trois génotypes ER $\alpha$ -C451A, ER $\alpha$ -AF2 $^{\circ}$ , et ER $\alpha$  $^{-/-}$  soient toutes infécondes, notre caractérisation de la fonction ovarienne à différents niveaux (ovaire, follicule, cycle œstral, profil hormonal) a révélé que la perte sélective des effets membranaires du ER $\alpha$  chez les souris ER $\alpha$ -C451A se traduit par des anomalies différentes de celles observées chez les souris sans effet nucléaire du ER $\alpha$  (ER $\alpha$ -AF2 $^{\circ}$ ) ou totalement déficientes pour ER $\alpha$  (ER $\alpha$  $^{-/-}$ ) (**Tableau 8**). En effet tous les mutants présentent une anomalie de la cyclicité œstrale, de la folliculogénèse, de la composition de la paroi des follicules antraux et de la régulation hormonale, mais les mutants ER $\alpha$ -C451A se distinguent des mutants ER $\alpha$ -AF2 $^{\circ}$  et ER $\alpha$  $^{-/-}$  à la fois par (i) un « blocage » en phase d'œstrus (alors que les ER $\alpha$ -AF2 $^{\circ}$  et ER $\alpha$  $^{-/-}$  apparaissent « bloqués » en phase de métœstrus/dicœstrus), (ii) une présence de follicules kystiques/hémorragiques dans une moindre proportion et uniquement à l'âge adulte, (iii) une altération inverse des aires de la thèque et de la granulosa, et (iv) une élévation apparemment moins prononcée du taux de LH. A partir de cette caractérisation différentielle à plusieurs niveaux il est possible d'émettre de nouvelles hypothèses quant aux rôles particuliers et complémentaires des effets nucléaires et membranaires du ER $\alpha$  dans la fertilité femelle.

**Tableau 8 : Synthèse du phénotypage des mutants murins évalués dans cette thèse.** Les résultats reportés sont exprimés par rapport au phénotype normal (ER $\alpha$ -WT).

Mesures analysées	Age (semaines)	Génotype		
		 ER $\alpha$ -C451A	 ER $\alpha$ -AF2 <sup>o</sup>	 ER $\alpha$ <sup>-/-</sup>
<b>Fécondité</b>	4-24	Nulle	Nulle <sup>1</sup>	Nulle <sup>2</sup>
<b>Cycle œstral</b>	4-5	Absence de proœstrus et diœstrus Longues périodes en œstrus	Absence d'œstrus Augmentation du temps relatif en diœstrus ( $\approx + 40-50\%$ )	
	26	Absence de proœstrus Augmentation du temps relatif en œstrus ( $\approx + 35\%$ )		
	4-5	Faible proportion relative de follicules primordiaux ( $\approx - 10\%$ )	Présence ( $\approx 3\%$ ) de follicules kystiques / hémorragiques	
<b>Comptages folliculaires</b>	Absence de corps jaune			
	12	Présence ( $\approx 5-6\%$ ) de follicules kystiques / hémorragiques	Présence ( $\approx 19-20\%$ ) de follicules kystiques / hémorragiques	
		Proportions normales de follicules primordiaux et secondaires	Faibles proportions relatives de follicules primordiaux et secondaires ( $\approx - 7-8\%$ )	Proportions normales de follicules primordiaux et secondaires
<b>Aires granulosa / thèque</b>	12	Granulosa réduite ( $\approx - 18\%$ )	Granulosa normale	
		Thèque normale	Thèque réduite ( $\approx - 9-14\%$ )	
<b>Dosages hormonaux (taux sanguins)</b>	12	LH augmenté ( $\approx 5 \times$ supérieur) Augmentation après ovariectomie	LH augmenté ( $\approx 10 \times$ supérieur) Pas d'effet de l'ovariectomie	
		FSH comparables		
		17 $\beta$ -œstradiol augmenté ( $\approx 7-8 \times$ supérieur, mais valeur des contrôles des ER $\alpha$ -AF2 <sup>o</sup> 3 $\times$ supérieure à celle des contrôles des ER $\alpha$ -C451A)		
		Progestérone diminué ( $\approx 4 \times$ inférieur)	Progestérone comparable	
		Testostérone augmenté ( $\approx 2 \times$ supérieur)	Testostérone augmenté ( $\approx 63 \times$ supérieur)	

<sup>1</sup>Billon-Galés *et al.* 2011 ; <sup>2</sup>Dupont *et al.* 2000

#### 4.1 A propos de l'acyclicité œstrale

La rupture du cycle œstral observée à la fois chez les souris ER $\alpha$ -C451A et ER $\alpha$ -AF2<sup>o</sup> indique qu'aucune des deux voies de signalisation du ER $\alpha$  n'est suffisante pour assurer la cyclicité œstrale *in vivo*. Les anomalies du cycle œstral n'étaient pas les mêmes entre mutants et nous pouvions dès lors suspecter que ces variations soient directement liées à différents dérèglements

du cycle ovarien. L'absence de différence qualitative entre les populations folliculaires ovariennes n'a pas confirmé cette hypothèse. Pour tous les génotypes mutants, le dérèglement du cycle ovarien semble se produire après la formation du follicule tertiaire, et il se manifeste par la présence de follicules kystiques et hémorragiques et par l'absence de corps jaune. La prédominance de la phase d'œstrus détectée par cytologie vaginale quotidienne chez les mutants ER $\alpha$ -C451A est conforme à l'élévation du taux de 17 $\beta$ -œstradiol (E2) puisque que l'E2 stimule la cornification des cellules vaginales. Pourtant chez les souris ER $\alpha$ -AF2<sup>o</sup> qui présentent également une élévation du taux d'E2, aucune phase d'œstrus n'a été détectée. Les différences d'acyclicité œstrale observées au niveau des cellules vaginales pourraient alors être provoquées par d'autres signaux. Il conviendrait néanmoins d'affiner la détermination du cycle œstral pour confirmer nos résultats. En particulier, il est possible que plus d'un changement de phase œstrale se produise en 24h. Des frottis plus fréquents permettraient de ne pas manquer certaines phases du cycle qui sont très courtes, comme celle du proœstrus. Enfin l'analyse statistique du temps relatif passé dans chaque phase du cycle œstral pourrait aussi être perfectionnée. En particulier, en raison de la prédominance de la phase d'œstrus chez nos souris ER $\alpha$ -WT normalement cyclées, l'anomalie de cyclicité chez les souris ER $\alpha$ -C451A (bloquées en œstrus) peut être sous-estimée. A l'inverse, un blocage dans une phase qui est normalement plus longue (*e.g.* le diœstrus chez ER $\alpha$ -AF2<sup>o</sup> et ER $\alpha$ <sup>-/-</sup>) pourrait être surestimé. Pour pouvoir comparer la sévérité des anomalies de cycle œstral entre génotypes mutants, il serait donc utile de tenir compte de la durée normalement observée pour chaque phase.

## 4.2 A propos du défaut de folliculogénèse

Dans la littérature, l'évaluation qualitative et/ou les dénombrements folliculaires se font communément sur les classes de follicules problématiques (*e.g.* follicules kystiques). J'ai dans cette thèse proposé une méthode de comptage folliculaire permettant d'estimer la composition de la population entière de follicules ovariens. Cette méthode est apparue assez robuste comme l'indiquent les compositions folliculaires similaires entre les différentes souches de souris ER $\alpha$ -WT (**Annexe 6**). Cependant, d'un point de vue méthodologique, il serait souhaitable de multiplier les opérateurs pour les comptages folliculaires, car il n'y a eu qu'un seul opérateur (moi-même) alors que des variations interindividuelles de comptage peuvent exister. Par ailleurs, nous avons supposé que l'ovaire droit et l'ovaire gauche étaient identiques. Or il semble que l'ovaire droit soit plus propice à l'ovulation que le gauche chez la femme (Fukuda *et al.* 2000) et d'après mon expérience personnelle (données non publiées), ce phénomène pourrait aussi avoir lieu chez la souris (souche CD-1 Swiss). Ainsi, si cette différence

d'ovulation entre ovaires droit et gauche est avérée, il semblerait préférable de prélever soit les deux ovaires par animal, soit l'un des deux mais en veillant à prélever les mêmes proportions de droit et de gauche.

Pour tous les génotypes mutants, nos résultats indiquent un défaut de folliculogénèse se produisant après la formation du follicule tertiaire. La première phase de la folliculogénèse, peu dépendante des gonadotrophines, ne semble donc pas altérée. Les ovaires des souris adultes ER $\alpha$ -C451A ne présentent pas de corps jaune mais affichent un nombre élevé de follicules kystiques et hémorragiques, montrant que la maturation des follicules en corps jaune (lutéinisation) est perturbée. Ce phénotype est cependant moins marqué et moins précoce chez les ER $\alpha$ -C451A que chez les ER $\alpha^{-/-}$  et *a fortiori* les ER $\alpha$ KO qui confirment le phénotype déjà observé par ailleurs (Couse and Korach 1999, Schomberg et al. 1999). Comme l'évaluation quantitative ne s'est faite que sur une seule section histologique d'ovaire (*cf.* section 2.4.1), nous n'avons pas pu différencier les follicules antraux des follicules pré-ovulatoires. Ainsi ces deux classes de follicules sont confondues dans la classe des follicules tertiaires de ma classification (*cf.* Tableau 4). En effet, l'identification précise d'un follicule pré-ovulatoire nécessite que l'unique plan de coupe passe par le *cumulus oophorus* (critère d'identification du follicule pré-ovulatoire). Il est possible qu'un plan de coupe puisse passer par l'antrum sans passer par le niveau du cumulus (follicule alors classé au stade antral) tandis que la section sériée suivante passe par le cumulus, et nous conduise finalement à classer ce follicule au stade pré-ovulatoire. La réalisation de coupes sériées permettrait donc de différencier ces deux sous-classes (*i.e.* discriminer les follicules antraux des follicules pré-ovulatoires).

D'autre part, les coupes sériées sont nécessaires pour évaluer de façon rigoureuse le nombre de follicules primordiaux. Clairement, le comptage des follicules primordiaux sur une seule section histologique peut difficilement être considéré comme une mesure fiable et représentative du pool de follicules primordiaux dans l'ovaire. Les différentes tendances que nous avons observées sur cette classe doivent donc être interprétées avec beaucoup de précaution. D'un point de vue méthodologique, nous préconiserions l'emploi d'une méthode de comptage spécifique pour cette classe avec des facteurs de correction. Une évaluation quantitative précise des follicules primordiaux serait intéressante dans le prolongement de notre étude car il apparaît que ER $\alpha$  est directement impliqué dans la formation des follicules primordiaux (Chen *et al.* 2009). De manière intéressante cette étude a montré que l'E2 couplé à de la BSA (outil pharmacologique n'activant que le récepteur membranaire du ER $\alpha$ , *cf.* section 3.1) est capable d'inhiber la formation des follicules primordiaux. Les souris ER $\alpha$ -

C451A pourraient donc présenter une régulation anormale des processus de recrutement de ces follicules primordiaux.

Les phénotypes des mutants nucléaires et membranaires du ER $\alpha$  se manifestent à l'échelle du follicule ovarien par des changements inversés des aires de la thèque et de la granulosa du follicule tertiaire. Les souris ER $\alpha$ -C451A présentent un rapport thèque/granulosa augmenté alors que les souris ER $\alpha$ -AF2 $^\circ$  et ER $\alpha^{-/-}$  présentent un rapport thèque/granulosa diminué. Ces changements inverses pourraient traduire une modulation de la stéroïdogénèse folliculaire. En effet, parmi les mutants, nous avons observé des différences d'épaisseur relatives des tissus impliqués dans la stéroïdogénèse folliculaire (*i.e.* les couches des cellules de la granulosa et de la thèque). Parallèlement, nous avons trouvé des profils d'hormones stéroïdiennes contrastés entre les souris ER $\alpha$ -C451A et les souris ER $\alpha$ -AF2 $^\circ$  (*i.e.* une augmentation spectaculaire du taux de testostérone chez ER $\alpha$ -AF2 $^\circ$ , une diminution notable de la progestérone chez ER $\alpha$ -C451A). La diminution générale du taux de progestérone chez les mutants (par rapport aux souris ER $\alpha$ -WT) est conforme à l'absence de corps jaune, qui constitue une source majeure de progestérone. En revanche concernant la testostérone, un rôle du ER $\alpha$  dans le rétrocontrôle négatif de la synthèse d'androgènes (androstènedione et testostérone) a été démontré *in vitro*. En effet, ER $\alpha$  réprime l'expression de Cyp17a1, une enzyme nécessaire à la biosynthèse de ces stéroïdes dans les cellules de la thèque (Taniguchi *et al.* 2007). Ainsi l'E2 synthétisé à partir des cellules de la granulosa pourrait moduler la stéroïdogénèse des cellules de la thèque *via* une boucle de rétrocontrôle négatif au sein du follicule ovarien. Comme l'indique l'augmentation modérée du taux de testostérone chez les souris ER $\alpha$ -C451A comparée aux souris ER $\alpha$ -AF2 $^\circ$ , le rétrocontrôle négatif de l'E2 sur la synthèse de testostérone ovarienne pourrait surtout dépendre des effets nucléaires du ER $\alpha$ . A l'échelle de l'ovaire, il conviendrait de déterminer la relation de causalité entre les taux de testostérone et la proportion de follicules kystiques hémorragiques chez les différents génotypes. Dans un sens, les taux élevés de testostérone pourraient traduire une production excessive liée aux nombreux follicules kystiques (*i.e.* hyperandrogénie fonctionnelle de l'ovaire polykystique (Pugeat 1998)). A l'inverse les follicules kystiques pourraient traduire une influence néfaste de la testostérone elle-même sur la maturation folliculaire. Curieusement, les souris ER $\alpha$ -AF2 $^\circ$  sont connues pour être hyper-insulinémique en raison de leur mutation du domaine AF2 qui intervient dans le rôle protecteur de l'E2 contre la résistance à l'insuline (Handgraaf *et al.* 2013). Or, l'insuline affecte directement la stéroïdogénèse ovarienne *in vitro* en stimulant la synthèse d'androgènes par la thèque (Barbierit *et al.* 1986). Ainsi l'hyper-insulinémie des souris ER $\alpha$ -AF2 $^\circ$  pourrait

exacerber leur taux de testostérone plasmatique. Il serait alors intéressant de comparer les taux d'insuline entre les mutants. Enfin, pour mieux comprendre le défaut de fonction ovarienne chez les souris ER $\alpha$ -C451A, ER $\alpha$ -AF2 $^{\circ}$  et ER $\alpha$  $^{-/-}$ , il serait bénéfique d'analyser l'expression des gènes de la stéroïdogénèse spécifiquement régulés dans l'ovaire, comme l'ont fait notamment Taniguchi *et al.* (2007).

L'absence de corps jaune suggère *a priori* l'absence d'ovulation. Cependant des follicules kystiques/hémorragiques peuvent également résulter d'un défaut de lutéinisation post-ovulatoire. Ainsi l'absence d'évènement ovulatoire attendu en cas de dérèglement de l'axe HHG reste à confirmer dans notre étude. Il serait utile de quantifier la capacité d'ovulation des différentes souris transgéniques en réalisant un test de super-ovulation qui permet parfois de s'affranchir du défaut ovulatoire (Hogan *et al.* 1994).

De façon intéressante, nous avons observé chez tous les génotypes mutants un stroma lutéinisé correspondant à une augmentation de la taille des cellules glandulaires interstitielles (hypertrophie) chez les souris ER $\alpha$ -C451A, ER $\alpha$ -AF2 $^{\circ}$  et ER $\alpha$  $^{-/-}$ , dans des proportions semblables pour ces trois modèles murins. Cependant cette observation qualitative nécessiterait de réaliser une analyse morphométrique plus fine de ce stroma pour éventuellement détecter différents degrés de sévérité de cette lésion. Dupont *et al.* (2000) avaient déjà évoqué l'aspect modifié de ce stroma ovarien chez les souris ER $\alpha$  $^{-/-}$ . Toutefois, contrairement à leurs résultats, nous n'avons pas particulièrement observé (sur section histologique HE) d'augmentation du nombre de mastocytes accompagnant l'hypertrophie des cellules glandulaires interstitielles ni d'œdème du stroma ovarien.

A partir de travaux réalisés sur des ovaires polykystiques de rates, Lombardi *et al.* (2012) ont émis l'hypothèse selon laquelle les cellules glandulaires interstitielles hypertrophiées proviendraient des kystes ovariens, suite à la dégénérescence des cellules de la granulosa et à la différenciation des cellules de la thèque interne. Selon les mêmes auteurs, l'élévation des taux sériques de testostérone et d'E2 chez ces rats serait due à l'augmentation significative de l'activité glandulaire des cellules interstitielles. De façon comparable, dans notre étude les profils hormonaux des souris ER $\alpha$ -C451A, ER $\alpha$ -AF2 $^{\circ}$  et ER $\alpha$  $^{-/-}$  coïncident bien avec l'augmentation des follicules kystiques et l'hypertrophie des cellules glandulaires interstitielles au sein du stroma ovarien. Il serait alors judicieux de se pencher sur les structures folliculaires kystiques lutéinisées (*cf.* Figure 14 H ; Dixon *et al.* (2014) pour une description histologique) et d'ajouter cette dénomination en sous-classe dans la catégorie des follicules en

dégénérescence/atrésie de notre classification ou dans celle des structures kystiques (*cf.* Tableau 4).

Enfin, l'étude de Jakacka *et al.* (2002) offre des pistes de réflexion intéressantes à propos du stroma ovarien des animaux de génotype  $NERKI^{+/-}$  (*cf.* section 3.2.3) qui présentent également des cellules avec vacuolisations lipidiques abondantes au sein du stroma ovarien. Dans cette étude, chez les souris  $NERKI^{+/-}$  les niveaux d'expression de la protéine StAR ("steroidogenic acute regulatory protein") mesurés par RT-PCR et Western Blot ont montré une réduction de moitié par rapport aux souris WT. Chez les souris WT les plus forts taux d'expression de StAR se situaient dans le corps jaune. Ainsi ces résultats suggéraient qu'une absence de corps jaune, et *a fortiori* un défaut d'ovulation, conduisaient à une diminution de l'expression de StAR et à des troubles des voies de signalisation intracellulaire du cholestérol, responsable de l'aspect typique des cellules glandulaires interstitielles de ces souris mutées au niveau du domaine de liaison à l'ADN du  $ER\alpha$ .

### **4.3 A propos du dérèglement de la fonction ovarienne**

Parmi les causes primitives des différences d'acyclicité œstrale observées parmi les génotypes mutants deux hypothèses principales (non-exclusives) pouvaient être émises : 1) un dysfonctionnement périphérique, en particulier au niveau de l'ovaire, et 2) un dysfonctionnement central, au niveau de l'axe HHG. Cette seconde hypothèse est confortée par les taux élevés de LH malgré les taux élevés d'E2 censés inhiber la sécrétion de LH et de GnRH par l'hypothalamus. En outre, l'élévation plus modeste de LH observée chez les souris  $ER\alpha$ -C451A par rapport aux souris  $ER\alpha$ -AF2<sup>o</sup> et  $ER\alpha^{-/-}$  suggère que les effets membranaires du  $ER\alpha$  sont moins essentiels au rétrocontrôle négatif de l'ovaire sur l'hypothalamus que ne le sont les effets nucléaires du  $ER\alpha$ . D'ailleurs, nos résultats d'ovariectomie ont mis en évidence la persistance de ce rétrocontrôle chez les souris  $ER\alpha$ -C451A car comme chez les souris contrôles ( $ER\alpha$ -WT), la suppression de la sécrétion d'E2 endogènes ovariens semble se traduire par une désinhibition de la sécrétion de LH. Ces résultats combinés à ceux de Couse *et al.* (2003) – montrant à partir des souris  $\alpha$ ERKO que le  $ER\alpha$  est indispensable au maintien du rétrocontrôle – indiquent assez clairement le rôle principal tenu par les effets nucléaires du  $ER\alpha$  dans la régulation centrale de la fonction ovarienne.

Il restait toutefois à savoir si la dérégulation de ce rétrocontrôle pouvait expliquer les anomalies constatées au niveau du cycle ovarien (*i.e.* présence de follicules kystiques et hémorragiques, absence de corps jaune). Ainsi, en complément des travaux réalisés au cours de cette thèse, mon

équipe d'accueil a procédé ensuite à une transplantation réciproque d'ovaires entre les souris ER $\alpha$ -WT d'une part, et les souris ER $\alpha$ -AF2 $^{\circ}$ , ER $\alpha^{-/-}$ , et ER $\alpha$ -C451A d'autre part. Ces travaux ont montré qu'une fois greffés chez des souris ER $\alpha$ -WT, les ovaires dysfonctionnels des souris mutantes ont retrouvé un phénotype apparemment normal (*i.e.* absence de follicules kystiques et hémorragiques, présence de corps jaunes). A l'inverse, les ovaires fonctionnels des souris ER $\alpha$ -WT ont développé des follicules kystiques et hémorragiques une fois greffés sur les mutants. Cela suggère très fortement que dans les cellules de l'ovaire, ER $\alpha$  n'a tout simplement aucune influence sur le déroulement du cycle ovarien. Cette suggestion est également renforcée par des résultats obtenues chez les souris  $\alpha$ ERKO pour lesquelles l'administration prolongée d'antagoniste du GnRH prévient la formation du phénotype ovarien kystique et hémorragique (Couse *et al.* 1999, Schomberg *et al.* 1999). Sous cette hypothèse, les anomalies de phénotype ovarien, moins marquées chez les souris ER $\alpha$ -C451A que chez les souris ER $\alpha$ -AF2 $^{\circ}$  et ER $\alpha^{-/-}$ , seraient principalement liées au plus faible dérèglement du rétrocontrôle négatif chez les premières.

#### **4.4 Implications cliniques**

Parmi les anomalies observées chez les souris ER $\alpha$ -AF2 $^{\circ}$  et ER $\alpha$ -C451A, plusieurs d'entre elles (*i.e.* irrégularité du cycle œstral, ovaires polykystiques, taux plasmatiques élevés de LH et de testostérone) correspondent aux symptômes cardinaux du syndrome des ovaires polykystiques (**SOPK** ou anciennement syndrome de Stein-Leventhal). Le SOPK est une endocrinopathie complexe fréquemment rencontrée chez la femme en âge de se reproduire, affectant 6 à 10% de la population mondiale selon les critères retenus du National Institute of Health (conférence tenue en 1990) (Goodarzi *et al.* 2011), voire davantage selon les critères plus généraux établis par un groupe de travail international (The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group 2004). Ce syndrome se caractérise par un hirsutisme, une hyperandrogénie, des ovaires polykystiques, une oligo- ou anovulation chronique et une diminution de la fertilité ; tous ces symptômes n'étant pas toujours présents. Ainsi chez la femme on recense actuellement pas moins de 15 phénotypes différents du SOPK (Goodarzi *et al.* 2011). Les souris ER $\alpha$ -AF2 $^{\circ}$  et ER $\alpha$ -C451A présentent chacune un tableau clinique qui correspond à un des phénotypes du SOPK, parmi tous les phénotypes possibles recensés chez la femme. Toutefois on notera que les souris ER $\alpha$ -AF2 $^{\circ}$  développent en plus et spontanément un phénotype dysmétabolique (obésité, intolérance au glucose) (Handgraaf *et al.* 2013) et de l'hirsutisme (résultat non montré mais observé macroscopiquement chez nos mutants). Or le SOPK est fortement associé à un nombre de comorbidités telles que l'obésité et le diabète de

type 2, soulignant un trouble métabolique sous-jacent (Moore *et al.* 2013). Par ailleurs, la présence au niveau du stroma ovarien d'amas de cellules interstitielles qui semblent lutéinisées chez les souris ER $\alpha$ -AF2 $^{\circ}$  et ER $\alpha$ -C451A, ainsi que l'augmentation de l'aire occupée par les cellules de la thèque des follicules ovariens chez les souris ER $\alpha$ -AF2 $^{\circ}$  rappellent le phénomène d'hyperthécose ovarienne observé chez certaines femmes atteintes du SOPK (Hedrick Ellenson et Pirog 2014). L'étiologie précise du SOPK est méconnue et le rôle du ER $\alpha$  dans la pathophysiologie de ce syndrome reste encore à élucider. Dans ce contexte, nos observations différentielles sur les souris ER $\alpha$ -AF2 $^{\circ}$  et ER $\alpha$ -C451A laissent penser que de nouvelles considérations thérapeutiques du SOPK pourraient être envisagées selon la voie de signalisation membranaire ou nucléaire du ER $\alpha$  impliquée.

Les perturbateurs endocriniens pourraient conduire à une aggravation du SOPK. En effet, des cas de SPOK avec des taux sériques élevés de bisphénol A (**BPA**) ont été détectés, ce qui pourrait indiquer un rôle du BPA dans la pathogénèse du syndrome (Barrett et Sobolewski 2014). L'impact sur la fertilité des perturbateurs endocriniens présents dans notre environnement est un sujet de recherche qui connaît actuellement un essor considérable et s'inscrit parmi les principaux enjeux de santé publique de notre siècle. En outre, chez des rongeurs femelles exposés au BPA des altérations importantes des fonctions ovarienne et utérine ont été détectées, tant sur le plan morphologique (poids des ovaires, utérus, lésions pré-néoplasiques, kystes ovariens, endométriose) que sur la cyclicité, la folliculogénèse, la puberté et les taux hormonaux (œstradiol, LH, progestérone) (INSERM 2011a). Par l'intermédiaire de sa liaison au ER $\alpha$  le BPA pourrait agir à la manière d'un SERM qui sélectionnerait des effets indésirables. En particulier, des effets rapides (quelques minutes) excluent une action médiée par le pool de récepteurs nucléaires ER $\alpha$  et indiquent une implication probable des formes membranaires du ER $\alpha$  (INSERM 2011b).

## Conclusion

L'enjeu global de cette thèse était de contribuer à démêler les liens entre d'une part, des mécanismes d'action du ER $\alpha$  (identifiés à l'échelle moléculaire par des études *in vitro*), et d'autre part, des composantes phénotypiques de la fertilité femelle, en particulier à l'échelle de l'ovaire. A partir d'une approche intégrative de données de phénotypage, cette étude a mobilisé un plan factoriel complet (*i.e.* des modèles d'inactivation soit des effets membranaires (ER $\alpha$ -C451A), soit des effets nucléaires (ER $\alpha$ -AF2 $^\circ$ ), ou totalement déficients pour ER $\alpha$  (ER $\alpha$  $^{-/-}$ )) afin d'évaluer la contribution des voies membranaires et nucléaires du ER $\alpha$ . Le constat surprenant d'infertilité à l'état homozygote du nouveau modèle ER $\alpha$ -C451A avait déjà en soi suffi à montrer l'importance physiologique des effets membranaires du ER $\alpha$ , validant ainsi l'hypothèse centrale de notre étude selon laquelle les seuls effets nucléaires ne suffisent pas à la compétence reproductrice femelle. Nos résultats ont ensuite démontré la nécessité des deux voies de signalisation, membranaire et nucléaire, à quatre niveaux différents (cycle œstral, ovaire, follicule, et profil hormonal lié à l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique HHG), car à chacun de ces niveaux les modèles mutants ont systématiquement développé des anomalies caractéristiques du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK). Toutefois, la perte sélective des effets membranaires du ER $\alpha$  chez les souris ER $\alpha$ -C451A s'est manifestée par des dysfonctionnements distincts de ceux observés chez les souris sans effets nucléaires du ER $\alpha$  (ER $\alpha$ -AF2 $^\circ$ ) ou totalement déficientes pour ER $\alpha$  (ER $\alpha$  $^{-/-}$ ). Ces variations de phénotypes reproducteurs entre mutants suggèrent des causes sous-jacentes différentes. Néanmoins ces causes sont probablement toutes d'origine extra-ovarienne, et liées à un rôle central du ER $\alpha$  dans le rétrocontrôle négatif des œstrogènes sur l'axe HHG. Dans l'ensemble, mon travail de thèse a donc permis d'approfondir nos connaissances sur le découplage des actions nucléaires et membranaires du ER $\alpha$  *in vivo*, et d'initier un projet d'étude comparative de la régulation de l'axe HHG chez les mutants ER $\alpha$ -C451A et ER $\alpha$ -AF2 $^\circ$ .

La démonstration de l'implication directe des effets membranaires du ER $\alpha$  dans la fertilité femelle pourrait avoir des implications cliniques importantes. On peut notamment suspecter que certains cas d'hypofertilité féminine (*e.g.* SOPK) ou de pathologies liées aux perturbateurs endocriniens soient liés à des altérations de la signalisation membranaire du ER $\alpha$ . Le nouveau modèle de souris ER $\alpha$ -C451A utilisé dans cette thèse est également prometteur pour étudier le rôle des effets membranaires des œstrogènes médiés par ER $\alpha$  dans d'autres tissus de

l'organisme. Il pourra aussi être utilisé pour mieux connaître la façon dont les effets membranaires interagissent avec les effets transcriptionnels du ER $\alpha$  dans différentes conditions physiologiques et pathologiques. Ainsi, il pourrait apporter des éléments de réponse à des questions posées par la communauté scientifique depuis de nombreuses années.

Ce travail a fait l'objet d'un mémoire de Master II « Biologie Intégrative et Toxicologie » à l'Université Toulouse III Paul Sabatier en cotutelle avec l'ENVT. J'ai également valorisé la poursuite de ces travaux dans le cadre de cette thèse en réalisant un poster présenté au congrès "Mouse Models of Disease: Using pathology techniques to enhance phenotyping outcomes" (**Annexe 7**), en contribuant à une publication scientifique dans PNAS (**Annexe 8**) et à la préparation d'un second article (en soumission). Il est intéressant de souligner qu'une équipe nord-américaine a développé et publié peu de temps après nos travaux, un modèle de souris appelé NOER ("Nuclear-Only ER $\alpha$ ") (Pedram *et al.* 2014) présentant une construction génétique similaire à notre modèle ER $\alpha$ -C451A (*i.e.* substitution de la Cystéine 451 du ER $\alpha$  en Alanine). Les observations obtenues sur la lignée NOER sont venues corroborer nos résultats tant sur l'altération de la fertilité et du phénotype ovarien que sur le dérèglement du rétrocontrôle négatif des œstrogènes sur la sécrétion d'hormone lutéinisante. Des données préliminaires *in vivo* récemment publiées sur le modèle murin H2NES (Stefkovich *et al.*, sous presse) – issu d'un modèle *in vitro* déjà décrit en 2011 (Burns *et al.* 2011) – laissent présager des avancées scientifiques importantes dans ce domaine de recherche très prolifique que sont les effets membranaires des œstrogènes médiés par ER $\alpha$ . D'un point de vue plus appliqué, les similitudes remarquables entre les modèles murins transgéniques du ER $\alpha$  et les patients atteints du syndrome de résistance aux œstrogènes réaffirment la pertinence de l'emploi des modèles murins pour la compréhension et la recherche de nouvelles voies thérapeutiques de maladies humaines. Avec un nombre croissant de cas de mutations du ER $\alpha$  identifiés chez l'Homme, on peut imaginer que de nouveaux modèles murins plus spécifiques et ciblés ainsi que des outils pharmacologiques plus précis seront bientôt disponibles.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussignée, **Isabelle RAYMOND-LETRON**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Lucile SAUTIER** intitulée «**Dissocier les effets membranaires et nucléaires du récepteur aux œstrogènes Era sur la fonction ovarienne et la fertilité : une approche expérimentale à partir du premier modèle de souris transgénique inactivé pour les effets membranaires de l'Era**» et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 6 décembre 2017  
**Professeur Isabelle RAYMOND-LETRON**  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



**Vu :**  
**Le Président du jury :**  
**Professeur Jean-François ARNAL**



Lucie SAUTIER  
a été admis(e) sur concours en : 2007  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 21/06/2012  
a validé son année d'approfondissement le : 26/09/2013  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

**Vu :**  
**La Directrice de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse**  
**Isabelle CHMITELIN**



**Vu et autorisation de l'impression :**  
**Président de l'Université  
Paul Sabatier**

**Monsieur Jean-Pierre VINEL**  
Le Président de l'Université Paul Sabatier  
par délégation,  
La Vice-Présidente de la CFVU  
  
**Régine ANDRE-OBRECHT**

## Références bibliographiques

- Abot, A. et al. 2013. The AF-1 activation function of estrogen receptor  $\alpha$  is necessary and sufficient for uterine epithelial cell proliferation in vivo. - *Endocrinology* 154: 2222–2233.
- Acconcia, F. et al. 2005. Palmitoylation-dependent estrogen receptor  $\alpha$  membrane localization regulation by 17  $\beta$ -estradiol. - *Mol. Biol. Cell* 16: 231–237.
- Adlanmerini, M. et al. 2014. Mutation of the palmitoylation site of estrogen receptor in vivo reveals tissue-specific roles for membrane versus nuclear actions. - *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111: E283–E290.
- Antal, M. C. et al. 2008. Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ERbeta-null mutant. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 2433–2438.
- Arnal, J. F. et al. 2013. In vivo dissection of the estrogen receptor alpha: Uncoupling of its physiological effects and medical perspectives. - *Ann. Endocrinol. (Paris)*. 74: 82–89.
- Arnal, J.-F. et al. 2017. Membrane and Nuclear Estrogen Receptor Alpha Actions: From Tissue Specificity to Medical Implications. - *Physiol. Rev.* 97: 1045–1087.
- Auricchio, F. et al. 1996. Protein tyrosine phosphorylation and estradiol action. - *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 784: 149–172.
- Bancroft, J. D. and Stevens, A. 1996. *Theory and Practice of Histological Techniques*. - Churchill Livingstone Inc.
- Barbierit, R. L. et al. 1986. Insulin stimulates androgen accumulation in incubations of ovarian stroma obtained from women with hyperandrogenism. - *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62: 904–910.
- Barrett, E. S. and Sobolewski, M. 2014. Polycystic ovary syndrome: Do endocrine-disrupting chemicals play a role? - *Semin. Reprod. Med.* 32: 166–176.
- Bernard, V. et al. 2016. Familial multiplicity of estrogen insensitivity associated with a loss-of-function ESR1 mutation. - *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 102: 93–99.
- Beshay, V. E. and Carr, B. R. 2013. Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis and Control of the Menstrual Cycle. - In: Falcone, T. and Hurd, W. W. (eds), *Clinical Reproductive Medicine and Surgery: A Practical Guide*. Springer, pp. 31–43.
- Bhardwaj, J. K. and Sharma, R. K. 2012. Apoptosis and Ovarian Follicular Atresia in Mammals. - In: García, M.-D. (ed), *Zoology*. InTech, pp. 185–206.
- Billon-Galés, A. et al. 2009. The transactivating function 1 of estrogen receptor alpha is dispensable for the vasculoprotective actions of 17beta-estradiol. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 2053–2058.
- Billon-Galés, A. et al. 2011. Activation function 2 (AF2) of estrogen receptor-alpha is required for the atheroprotective action of estradiol but not to accelerate endothelial healing. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 13311–13316.
- Björnström, L. and Sjöberg, M. 2005. Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes. - *Mol. Endocrinol.* 19: 833–842.
- Bouabe, H. and Okkenhaug, K. 2013. Gene Targeting in Mice: a Review Hicham. - *Virus-Host Interact. Methods Protoc.* 1064: 315–336.

- Britt, K. L. et al. 2000. An Age-Related Ovarian Phenotype in Mice with Targeted Disruption of the Cyp 19 (Aromatase) Gene. - *Endocrinology* 141: 2614–2623.
- Brown, T. 2015. 100 Best-Selling, Most Prescribed Branded Drugs Through March [consulté le 15/10/2015]. Disponible sur < <https://www.medscape.com/viewarticle/844317> >
- Bucci, T. J. et al. 1997. Influence of sampling on the reproducibility of ovarian follicle counts in mouse toxicity studies. - *Reprod. Toxicol.* 11: 689–696.
- Burns, K. A. et al. 2011. Selective mutations in estrogen receptor  $\alpha$  D-domain alters nuclear translocation and non-estrogen response element gene regulatory mechanisms. - *J. Biol. Chem.* 286: 12640–12649.
- Byers, S. L. et al. 2012. Mouse estrous cycle identification tool and images. - *PLoS One* 7: 1–5.
- Caligioni, C. 2009. Assessing Reproductive Status/Stages in Mice. - *Curr. Protoc. Neurosci.* 4: Appendix 4I.
- Chambliss, K. et al. 2010. Non-nuclear estrogen receptor  $\alpha$  signaling promotes cardiovascular protection but not uterine or breast cancer growth in mice. - *J. Clin. Invest.* 120: 2319–2330.
- Champlin, A. K. et al. 1973. Determining the Mouse the Stage by the of the Estrous Cycle in Appearance of the Vagina mice. - *Biol. Reprod.* 8: 191–194.
- Chen, Y. et al. 2009. Estrogen can signal through multiple pathways to regulate oocyte cyst breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary. - *J. Endocrinol.* 202: 407–417.
- Christakou, C. et al. 2014. The benefit-to-risk ratio of common treatments in PCOS: effect of oral contraceptives versus metformin on atherogenic markers. - *Hormones* 13: 488–497.
- Christian, C. A. et al. 2008. Classical estrogen receptor  $\alpha$  signaling mediates negative and positive feedback on gonadotropin-releasing hormone neuron firing. - *Endocrinology* 149: 5328–5334.
- Collins, P. and Webb, C. 1999. Estrogen hits the surface. - *Nat. Med.* 5: 1130–1.
- Couse, J. F. and Korach, K. S. 1999. Estrogen Receptor Null Mice: What Have We Learned and Where Will They Lead Us? - *Endocr. Rev.* 20: 358–417.
- Couse, J. F. et al. 1997. Tissue Distribution and Quantitative Analysis of Estrogen Receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and Estrogen Receptor- $\beta$  (ER $\beta$ ) Messenger Ribonucleic Acid in the Wild-Type and ER $\alpha$ -Knockout Mouse. - *Endocrinology* 138: 4613–4621.
- Couse, J. F. et al. 1999. Prevention of the polycystic ovarian phenotype and characterization of ovulatory capacity in the estrogen receptor- $\alpha$  knockout mouse. - *Endocrinology* 140: 5855–5865.
- Couse, J. F. et al. 2003. Characterization of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in Estrogen Receptor (ER) Null Mice Reveals Hypergonadism and Endocrine Sex Reversal in Females Lacking ER $\alpha$  But Not ER $\beta$ . - *Mol. Endocrinol.* 17: 1039–1053.
- Da Silva-Buttkus, P. et al. 2008. Effect of cell shape and packing density on granulosa cell proliferation and formation of multiple layers during early follicle development in the ovary. - *J. Cell Sci.* 121: 3890–3900.
- Danielian, P. S. et al. 1992. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. - *EMBO J.* 11: 1025–1033.
- de Roux, N. et al. 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. - *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 10972–10976.

- Dixon, D. et al. 2014. Review Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Rat and Mouse Female Reproductive System. - *J. Toxicol. Pathol.* 27: 1S.
- Dos Santos Silva, I. et al. 2009. Ovulation-stimulation drugs and cancer risks: a long-term follow-up of a British cohort. - *Br. J. Cancer* 100: 1824–1831.
- Doyle, A. et al. 2012. The Construction of Transgenic and Gene Knockout/Knockin Mouse Models of Human Disease Alfred. - *Transgenic Res.* 21: 327–349.
- Dupont, S. et al. 2000. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. - *Development* 127: 4277–4291.
- Durlinger, A. L. et al. 2002. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. - *Reproduction* 124: 601–609.
- Eddy, E. M. et al. 1996. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. - *Endocrinology* 137: 4796–4805.
- Edwards, R. G. et al. 1977. Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat and human ovaries. - *J. Reprod. Fertil.* 51: 237–263.
- Emmen, J. M. A. and Korach, K. S. 2003. Estrogen receptor knockout mice: phenotypes in the female reproductive tract. - *Gynecol. Endocrinol.* 17: 169–176.
- Endoh, H. et al. 1997. Rapid Activation of MAP Kinase by Estrogen in the Bone Cell Line. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235: 99–102.
- Feigerlova, E. et al. 2016. Syndrome de résistance aux estrogènes : une nouvelle mutation dans le domaine AF-2 du gène ESR1 responsable de l'abolition de l'activité transcriptionnelle du récepteur ER $\alpha$ . - *Ann. Endocrinol. (Paris)*. 77: 251.
- Flouriou, G. et al. 2000. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. - *EMBO J.* 19: 4688–4700.
- Fukuda, M. et al. 2000. Right-sided ovulation favours pregnancy more than left-sided ovulation. - *Hum. Reprod.* 15: 1921–1926.
- Gal, A. et al. 2014. Vaginal fold histology reduces the variability introduced by vaginal exfoliative cytology in the classification of mouse estrous cycle stages. - *Toxicol. Pathol.* 42: 1212–1220.
- Gerdes, J. et al. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. - *J. Immunol.* 133: 1710–1715.
- Glidewell-Kenney, C. et al. 2007. Nonclassical estrogen receptor alpha signaling mediates negative feedback in the female mouse reproductive axis. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 8173–8177.
- Goodarzi, M. O. et al. 2011. Replication of association of a novel insulin receptor gene polymorphism with polycystic ovary syndrome. - *Fertil. Steril.* 95: 1736–1741.
- Gorski, J. 1987. The nature and development of steroid hormone receptors. - *Experientia* 53: 67–78.
- Green, E. L. 1941. *Biology of the Laboratory Mouse*, by the Staff of the Jackson Laboratory. - Dover Publications.
- Green, S. et al. 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. - *Nature* 324: 227–231.
- Gu, Q. and Moss, R. L. 1996. 17 beta-Estradiol potentiates kainate-induced currents via activation of

- the cAMP cascade. - *J. Neurosci.* 16: 3620–3629.
- Gupta, P. D. et al. 1989. Keratinization of rat vaginal epithelium. III. Effect of estradiol on keratinization. - *Biol. Cell* 65: 281–289.
- Handgraaf, S. et al. 2013. Prevention of obesity and insulin resistance by estrogens requires era activation function-2 (ERaAF-2), whereas ERaAF-1 is dispensable. - *Diabetes* 62: 4098–4108.
- Harrington, W. R. et al. 2006. Estrogen Dendrimer Conjugates that Preferentially Activate Extranuclear, Nongenomic Versus Genomic Pathways of Estrogen Action. - *Mol. Endocrinol.* 20: 491–502.
- Hayashi, T. et al. 1995. Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214: 847–855.
- Heape, W. 1900. The “sexual season” of mammals and the relation of the “pro-oestrus” to menstruation. - *Q. J. Microsc. Sci.* 44: 1–70.
- Hedrick Ellenson, L. and Pirog, E. C. 2014. The Female Genital Tract. - In: Kumar, V. et al. (eds), *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. 9th ed.n. Elsevier, pp. 991–1042.
- Heldring, N. et al. 2007. Estrogen Receptors : How Do They Signal and What Are Their Targets. - *Physiol. Rev.* 87: 905–931.
- Herbison, A. E. 2005. Physiology of the gonadotropin-releasing hormone neuronal network. - In: Neill, J. D. (ed), *Knobil and Neill’s physiology of reproduction*. 3rd ed.n. Elsevier, pp. 1415–1482.
- Herrington, D. M. and Klein, K. P. 2001. Invited review: Pharmacogenetics of estrogen replacement therapy. - *J. Appl. Physiol.* 91: 2776–2784.
- Hewitt, S. C. et al. 2014. Novel DNA Motif Binding Activity Observed In Vivo With an Estrogen Receptor  $\alpha$  Mutant Mouse. - *Mol. Endocrinol.* 28: 899–911.
- Hewitt, S. C. et al. 2016. What’s new in estrogen receptor action in the female reproductive tract. - *J. Mol. Endocrinol.* 56: R55–R71.
- Hogan, B. et al. 1994. *Manipulating the mouse embryo : a laboratory manual*. - Cold Spring Harbor.
- Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm) 2011a. Études chez les animaux femelles. - In: *Reproduction et environnement. Synthèse. Collection. Les Editions INSERM*, pp. 273–284.
- Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm) 2011b. Mécanismes d’action. - In: *Reproduction et environnement. Synthèse. Collection. Les Editions INSERM*, pp. 309–317.
- Jakacka, M. et al. 2001. Estrogen Receptor Binding to DNA Is Not Required for Its Activity through the Nonclassical AP1 Pathway. - *J. Biol. Chem.* 276: 13615–13621.
- Jakacka, M. et al. 2002. An Estrogen Receptor (ER) $\alpha$  Deoxyribonucleic Acid-Binding Domain Knock-In Mutation Provides Evidence for Nonclassical ER Pathway Signaling in Vivo. - *Mol. Endocrinol.* 16: 2188–2201.
- Jensen, E. V and DeSombre, E. R. 1973. Estrogen-Receptor Interaction. - *Science* (80-. ). 182: 126–134.
- Jensen, E. V et al. 2010. Estrogen action: a historic perspective on the implications of considering alternative approaches. - *Physiol. Behav.* 99: 151–162.
- Kagabu, S. and Umezu, M. 2004. Histological analysis of the “critical point” in follicular development in mice. - *Reprod. Med. Biol.*: 141–145.

- Kato, S. 2001. Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways. - *Breast Cancer* 8: 3–9.
- Kenngott, R. A. M. et al. 2013. The role of ovarian surface epithelium in folliculogenesis during fetal development of the bovine ovary: A histological and immunohistochemical study. - *Sex. Dev.* 7: 180–195.
- Kerr, J. B. et al. 2006. Quantification of healthy follicles in the neonatal and adult mouse ovary: evidence for maintenance of primordial follicle supply. - *Reproduction* 132: 95–109.
- Kittel, B. et al. 2004. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice - Part 2: A joint publication of the RITA and NACAD groups. - *Exp. Toxicol. Pathol.* 55: 413–431.
- Krust, A. et al. 1986. The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. - *EMBO J.* 5: 891–897.
- Le Romancer, M. et al. 2011. Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. - *Endocr. Rev.* 32: 597–622.
- Lenfant, F. et al. 2012. Dissection in vivo du Récepteur des Œstrogènes en vue d'une optimisation de sa modulation en clinique. - *Ref. Gynecol. Obstet.* 14: 1–9.
- Li, S. and Davis, B. 2007. Evaluating rodent vaginal and uterine histology in toxicity studies. - *Birth defects Res. part B Dev. Reprod. Toxicol.* 80: 246–252.
- Liere, P. et al. 2000. Validation of an analytical procedure to measure trace amounts of neurosteroids in brain tissue by gas chromatography-mass spectrometry. - *J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl.* 739: 301–312.
- Lombardi, L. A. et al. 2012. Morphology of the interstitial cells of rat polycystic ovaries: an experimental study. - *Rev. Bras. Ginecol. e Obs.* 34: 323–328.
- Lubahn, D. B. et al. 1993. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. - *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 11162–11166.
- Madak-Erdogan, Z. et al. 2008. Nuclear and Extranuclear Pathway Inputs in the Regulation of Global Gene Expression by Estrogen Receptors. - *Mol. Endocrinol.* 22: 2116–2127.
- Madak-Erdogan, Z. et al. 2016. Design of pathway-preferential estrogens that provide beneficial metabolic and vascular effects without stimulating reproductive tissues. - *Sci. Signal.* 9: ra53.
- McDevitt, M. A. et al. 2008. New Insights into the Classical and Non-classical Actions of Estrogen: Evidence from Estrogen Receptor Knock Out and Knock In Mice. - *Mol. Cell. Endocrinol.* 290: 24–30.
- McEwen, B. S. et al. 1978. Steroid hormone action in the neuroendocrine system: when is the genome involved? - *Res. Publ. Res. Nerv. Ment. Dis.* 56: 255.
- McLean, A. C. et al. 2012. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. - *J. Vis. Exp.* 67: 1–6.
- Mermelstein, P. G. et al. 1996. Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor. - *J. Neurosci.* 15: 595–604.
- Micevych, P. et al. 2009. Physiology of Membrane Estrogen Receptor Signaling in Reproduction. - *J. Neuroendocrinol.* 21: 249–256.
- Mirkin, S. and Komm, B. S. 2013. Tissue-selective estrogen complexes for postmenopausal women. -

- Maturitas 76: 213–220.
- Moggs, J. G. and Orphanides, G. 2001. Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. - *EMBO Rep.* 2: 775–781.
- Monniaux, D. et al. 2013. To cite this version : Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. in press.
- Moore, A. M. et al. 2013. Estradiol negative and positive feedback in a prenatal androgen-induced mouse model of polycystic ovarian syndrome. - *Endocrinology* 154: 796–806.
- Morawietz, G. et al. 2004. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 3: A joint publication of the RITA and NACAD groups. - *Exp. Toxicol. Pathol.* 55: 433–449.
- Morley, P. et al. 1992. A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. - *Endocrinology* 131: 1305–1312.
- O'Brien, J. E. et al. 2006. Estrogen-induced proliferation of uterine epithelial cells is independent of estrogen receptor  $\alpha$  binding to classical estrogen response elements. - *J. Biol. Chem.* 281: 26683–26692.
- Pedersen, T. and Peters, H. 1968. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. - *J. Reprod. Fertil.* 17: 555–557.
- Pedram, A. et al. 2007. A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. - *J. Biol. Chem.* 282: 22278–22288.
- Pedram, A. et al. 2009. Developmental phenotype of a membrane only estrogen receptor  $\alpha$  (MOER) mouse. - *J. Biol. Chem.* 284: 3488–3495.
- Pedram, A. et al. 2011. DHHC-7 and DHHC-21 Are Palmitoyl Acyltransferases for Estrogen and Progesterone Receptors. - *Endocr. Soc. 93rd Annu. Meet. Expo*
- Pedram, A. et al. 2014. Membrane-localized estrogen receptor  $\alpha$  is required for normal organ development and function. - *Dev. Cell* 29: 482–490.
- Petculescu-ciochină, L. et al. 2012. Morphological Aspects in Corpus Luteum Formation in Mice. - *Sci. Pap. Anim. Sci. Biotechnol.* 45: 193–196.
- Plant, T. M. 2015. The hypothalamo-pituitary-gonadal axis. - *J. Endocrinol.* 226: T41–T54.
- Pohlert, T. 2014. The Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR). in press.
- Ponglikitmongkol, M. et al. 1988. Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. - *EMBO J.* 7: 3385–3388.
- Pugeat, M. 1998. Le syndrome des ovaires polykystiques: De la physiopathologie à la thérapeutique. - *Ann. Endocrinol. (Paris)*. 59: 305–309.
- Quaynor, S. D. et al. 2013. Delayed Puberty and Estrogen Resistance in a Woman with Estrogen Receptor  $\alpha$  Variant. - *N. Engl. J. Med.* 369: 164–171.
- R core team. R Foundation for Statistical Computing 2017. R: A language and environment for statistical computing. in press.
- Razandi, M. et al. 1999. Cell Membrane and Nuclear Estrogen Receptors (ERs) Originate from a Single Transcript: Studies of ER $\alpha$  and ER $\beta$  Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells. - *Mol. Endocrinol.* 13: 307–319.

- Razandi, M. et al. 2003. Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane. - *Mol. Cell. Biol.* 23: 1633–46.
- Rendi, M. H. et al. 2012. Female Reproductive System. - In: Dintzis, S. M. et al. (eds), *Comparative Anatomy and Histology - A Mouse and Human Atlas*. Elsevier I. pp. 253–284.
- Ruehl-Fehlert, C. et al. 2003. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 1: A joint publication of the RITA and NACAD groups. - *Exp. Toxicol. Pathol.* 55: 91–106.
- Russo, J. and Russo, I. H. 2006. The Role of Estrogen in the Initiation of Breast Cancer. - *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 102: 89–96.
- Safe, S. and Kim, K. 2008. Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. - *J. Mol. Endocrinol.* 41: 263–275.
- Scalercio, S. R. R. A. et al. 2015. Immunolocalization of growth, inhibitory, and proliferative factors involved in initial ovarian folliculogenesis from adult common Squirrel Monkey (*Saimiri collinsi*). - *Reprod. Sci.* 22: 68–74.
- Schomberg, D. W. et al. 1999. Targeted disruption of the estrogen receptor- $\alpha$  gene in female mice: Characterization of ovarian responses and phenotype in the adult. - *Endocrinology* 140: 2733–2744.
- Seminara, S. B. et al. 2004. The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. - *Obstet. Gynecol. Surv.* 59: 351–353.
- Singer, C. A. et al. 1999. The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. - *J. Neurosci.* 19: 2455–2463.
- Sinkevicius, K. W. et al. 2008. An estrogen receptor- $\alpha$  knock-in mutation provides evidence of ligand-independent signaling and allows modulation of ligand-induced pathways in vivo. - *Endocrinology* 149: 2970–2979.
- Smith, E. P. et al. 1994. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. - *New Engl. J. Med.* 331: 1056–1061.
- Smith, J. T. et al. 2005. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. - *Endocrinology* 146: 3686–3692.
- Stefkovich, M. et al. Experimental models for evaluating non-genomic estrogen signaling. - *Steroids* in press.
- Stevis, P. E. et al. 1999. Differential effects of estradiol and estradiol-BSA conjugates. - *Endocrinology* 140: 5455–5458.
- Szego, C. M. and Davis, J. S. 1967. Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 58: 1711–8.
- Taguchi, Y. et al. 2004. Binding of estrogen receptor with estrogen conjugated to bovine serum albumin (BSA). - *Nucl. Recept.* 2: 5.
- Taniguchi, F. et al. 2007. Estrogen receptor- $\alpha$  mediates an intraovarian negative feedback loop on thecal cell steroidogenesis via modulation of CYP17A1 (cytochrome P450, steroid 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20 lyase) expression. - *he FASEB J.* 21: 586–595.
- The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group 2004. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. - *Fertil. Steril.* 81: 19–25.

- Thomas, P. et al. 2010. Conserved estrogen binding and signaling functions of the G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in mammals and fish. - *Steroids* 75: 595–602.
- Tora, L. et al. 1989. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. - *Cell* 59: 477–487.
- White, R. et al. 1987. Structural Organization and Expression of the Mouse Estrogen Receptor. - *Mol. Endocrinol.* 1: 735–744.
- Wood, G. A. et al. 2007. Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. - *Reproduction* 133: 1035–1044.
- Yang, J. J. et al. 2009. Mating-Induced Neuroendocrine Responses During Pseudopregnancy in the Female Mouse. - *J. Neuroendocrinol.* 21: 30–39.
- Yener, T. et al. 2007. Determination of oestrous cycle of the rats by direct examination: how reliable? - *Anat. Histol. Embryol.* 36: 75–77.
- Ylikomi, T. et al. 1992. Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. - *EMBO J.* 11: 3681–3694.

## Annexes

### **Annexe 1. Protocole de coloration histologique à l'Hémalun-Eosine**

**Objectif** : L'Hémalun-Eosine est une coloration bichrome qui permet de colorer en rose les composants protéiques et en violet les acides nucléiques présents sur les lames tissulaires.

#### **Préparation des lames :**

##### Première étape : Déparaffinage

Les lames sont immergées pendant 5 minutes dans le toluène.

##### Seconde étape : Réhydratation

Les lames sont d'abord immergées successivement :

- 5 minutes dans un bain d'alcool absolu
- 5 minutes dans un bain d'alcool à 95
- 5 minutes dans un bain d'eau du robinet afin de bien les rincer.

Les lames sont ensuite délicatement séchées sur la face inférieure à l'aide de papier essuie-tout.

##### Troisième étape : Coloration et montage des lames

La lame est plongée pendant une minute dans le colorant Hémalun (Hémalun de Mayer, réf 320550-2500, RAL diagnostic), puis un rinçage est réalisé avec de l'eau. Trois gouttes d'ammoniaque sont additionnées au bain d'eau courante. Les lames sont délicatement séchées sur la face inférieure à l'aide de papier essuie-tout.

La lame est ensuite plongée 20 secondes dans l'Eosine (solution aqueuse à 3%) que l'on rince avec plusieurs bains successifs rapides d'eau.

Un passage plus ou moins rapide dans un bain d'alcool à 95° permet de décolorer l'Eosine si la coloration est trop marquée.

Enfin les lames sont passées dans un bain d'alcool absolu puis de toluène.

Le montage des lames s'effectue avec du baume.

**Résultats** : A l'observation microscopique, les cellules sont visualisées grâce à la coloration bleue (basophile) des noyaux et la coloration rose (éosinophile) des cytoplasmes.

## Annexe 2. Fiche technique pour l'immunohistochimie Ki-67



### Laboratoire d'histopathologie expérimentale et comparée

Nom de l'anticorps	Ki67 clone sp6 /	
Référence	RM-9106-S ( thermo-scientific )	
Lot	9106S1308J	Date réception :
Temps d'utilisation		
- Espèce	monoclonal lapin	
- Mono ou poly		
Technique	- Déparaffinage	Ptlink low pH réfK8005-DAKO 30 min
	- Démasq _ Ag	en même temps Ptlink
	- Sérum normal	aucun
	- Acs I	- Nature : lapin - Dilution : 1/200 - Temps d'incubation : 50 min TA
	- Acs II	- Nature : a-lapin biot réfABK125-MICROM - Dilution : RTU - Temps d'incubation : 25 min TA
	- HRP	- Dilution : 1/500 réfP0397-DAKO - Temps d'incubation : 25 min TA
	révélation	- Chronogène utilisé : DAB530-DIAGOMICS - Temps d'incubation : 10 min TA
Témoins	+	- Réf. / espèce :
	⊖	- Réf. / espèce :
Commentaire		

## Annexe 3. Génotypage des lignées de souris transgéniques

### 1. Digestion de l'échantillon de queue

#### Tampon de lyse :

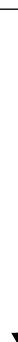
Composition	Pour 200 mL
10 mmol/L Tris-HCL pH 8.4	2 mL Tris-HCL 1M
50 mmol/L KCl	10 mL KCL 1M
0.45 % NP40	900 µL NP40
0.45% Tween 20	900 µl Tween 20
	Eau stérile exempte de nucléases (PCR-grade Water), QSP 200 mL

- Préparer un mélange tampon de lyse / Protéinase K pour la quantité d'échantillons de queues à digérer (150 µL/tube) ; stock Protéinase K à 20 mg/mL et concentration finale de 0,2 mg/mL
- Digestion thermobloc avec agitation à 60°C (1h30-2h00) ou toute la nuit dans une étuve à 56°C
- Inactivation de la protéinase K : 45 min à 85°C sans agitation
- Pour la PCR, on prélèvera 1 µl du lysat de queue.

### 2. Protocole PCR

#### - Mélange PCR (1 réaction) :

Composition	Volume (µL)
H <sub>2</sub> O (PCR-grade Water)	13,8
Tampon 10X	2
dNTPs 10 µM	0,4
Primer S 10µM	1
Primer AS 10 µM	1
Template (lysat queue)	1
Enzyme EconoTaq® DNA Polymerase (Lucigen®)	0,2
DMSO	0,6



Composition Tampon 10X PCR		
Solutions Stock	concentration	pour 100 mL, 10X
1 M Tris-HCl, pH 8.8	100 mM	10 mL
1 M MgCl <sub>2</sub>	15 mM	1,5 mL
1 M KCl	0,5 M	50 mL
		PCR-grade Water, QSP 100 mL

**Programme thermocycleur (Bio-Rad® France) :**

Programme PCR	Température	Durée	
étape 1	95°C	3 min	
étape 2	94°C	20 s	
	63°C - 58°C	20 s	incréméntation - 1°C à chaque cycle
	72°C	45 s	X 5 cycles
étape 3	94°C	20 s	
	58°C	20 s	
	72°C	72 s	X 30 cycles
étape 4	72°C	5 min	
	15°C	inf	

**Séquences des amorces PCR :**

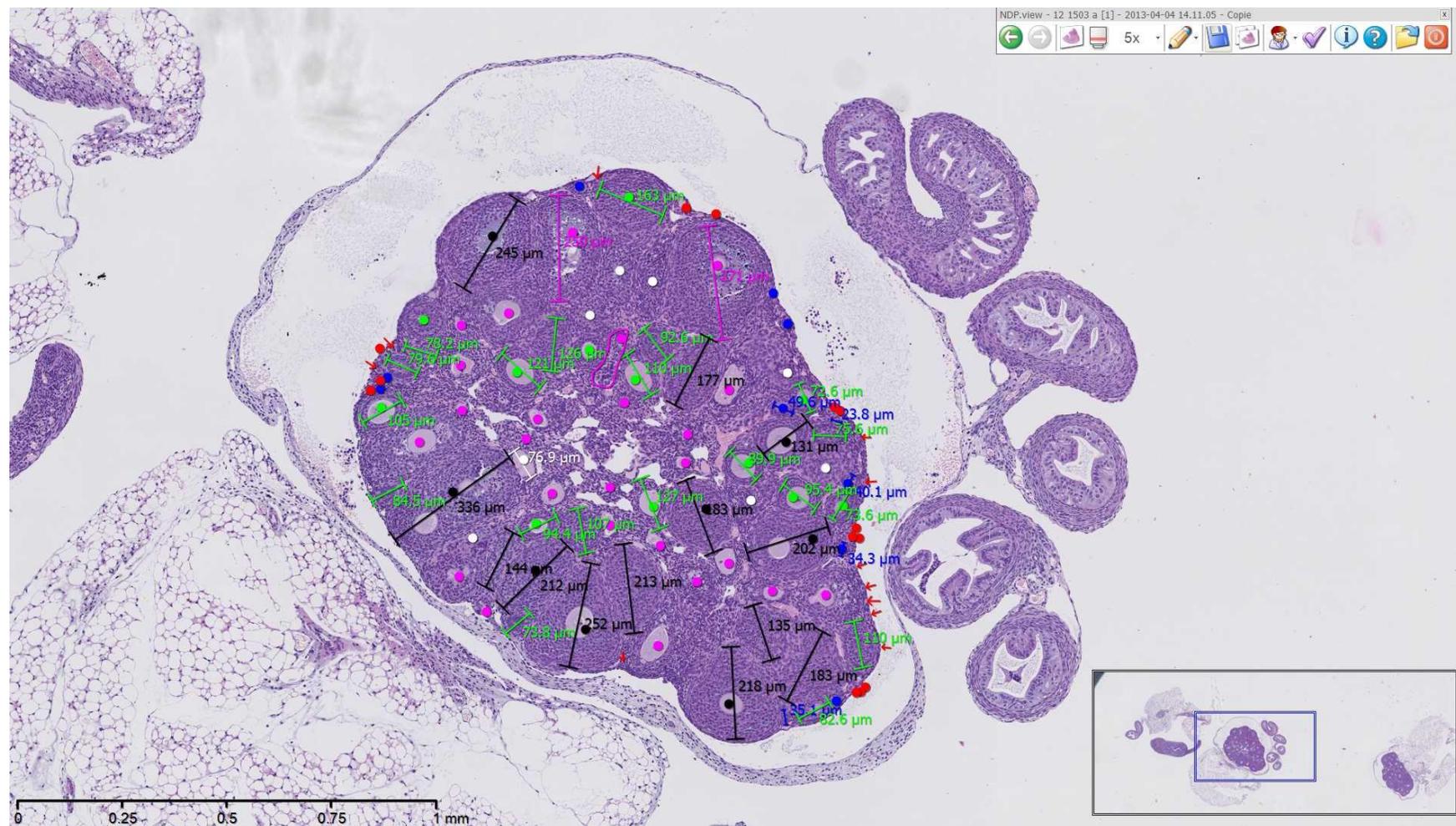
Génotype	Nom de l'amorce	Séquence 5' ____ 3' Sens (S) puis Antisens (AS)
Souris ER $\alpha$ <sup>-/-</sup>	P4 S	GCTTTCCTGAAGACCTTTCATATGGTG
	P3 AS	GGCATTACCACTTCTCCTGGGAGTCT
	mESR1 Ex2 S1	CAATCGACGCCAGAATGGCCGAG
Souris ER $\alpha$ -AF2°	mESR1 AF2 S3	TCCAGTAACAAAGGCATGGAGC
	mESR1 AF2 AS2	TGTAAGGAATGTGCTGAAGTGGAG
Souris ER $\alpha$ -C451A	Palmito 4772 S	GCACATATTTAAAATGGACCTAGACCAGG
	Palmito 4773 AS	GCTTCAGTGGCTCCTAGTCATCTTAAC

**3. Résultats obtenus avec l'unité d'électrophorèse pour laboratoire MCE®-202 MultiNA, Shimadzu Europa**

PCR ER $\alpha$ <sup>-/-</sup>	PCR ER $\alpha$ -AF2°	PCR ER $\alpha$ -C451A
WT : 360 pb KO : 260 pb	WT : 257 pb KI : 158 pb	WT : 360 pb KI : 260 pb

#### Annexe 4. Exemple d'image digitale de coupe histologique d'ovaire de souris avec annotations morphométriques

Utilisation des formes libres, des cercles et des mesures linéaires pour dénombrer les différentes classes de follicules, sur un ovaire de souris ER $\alpha$ -WT âgée de 4 semaines (identification sur NDP View: 12-1503 a [1] - 2013-04-04 14.11.05 - Copie, cf. **Annexe 5**). Chaque classe de follicules présents ici est différenciée par un code couleur: primordial (rouge), primaire (bleu), secondaire (vert), tertiaire (noir), atreétique (rose), non déterminé (blanc).



**Annexe 5. Exemple de tableau de données brutes de dénombrement folliculaire ovarien.** Ce tableau présente les nombres réels absolus de follicules et la part relative de chacun des types folliculaires parmi le total de ces follicules sur des souris ER $\alpha$ -WT, ER $\alpha$ -C451A et ER $\alpha$ <sup>-/-</sup> âgées de 4 semaines.

Génotype	Age	Identification sur NDP View	Primordial		Primaire		Secondaire		Antral		Corps jaune		Atrétique		Kystique / Hémorragique		Non Déterminé		Total
			absolu	relatif (%)	absolu	relatif (%)	absolu	relatif (%)	absolu	relatif (%)	absolu	relatif (%)	absolu	relatif (%)	absolu	relatif (%)	absolu	relatif (%)	
ER $\alpha$ -WT (contrôles des ER $\alpha$ -/-)	4 semaines	12-1503 a • ovaire ①	24	23,5294118	11	10,7843137	21	20,5882353	13	12,745098	0	0	25	24,5098039	0	0	8	7,84313725	102
		12-1503 a • ovaire ②	19	29,6875	7	10,9375	13	20,3125	15	23,4375	0	0	9	14,0625	0	0	1	1,5625	64
		12-1503 b • ovaire ①	8	15,6862745	2	3,92156863	12	23,5294118	12	23,5294118	0	0	14	27,4509804	0	0	3	5,88235294	51
		12-1503 b • ovaire ②	13	27,0833333	3	6,25	6	12,5	7	14,5833333	0	0	14	29,1666667	0	0	5	10,4166667	48
		12-1503 b • ovaire ③	3	3,8961039	7	9,09090909	13	16,8831169	18	23,3766234	0	0	29	37,6623377	0	0	7	9,09090909	77
ER $\alpha$ -/-	4 semaines	12-1503 b • ovaire ④	16	15,5339806	17	16,5048544	19	18,4466019	25	24,2718447	0	0	20	19,4174757	0	0	6	5,82524272	103
		12-1503 c • ovaire ①	30	30,9278351	13	13,4020619	3	3,09278351	14	14,4329897	0	0	30	30,9278351	3	3,09278351	4	4,12371134	97
		12-1503 c • ovaire ②	5	20	2	8	5	20	12	48	0	0	0	0	0	0	1	4	25
		12-1503 c • ovaire ③	8	9,1954023	14	16,091954	13	14,9425287	29	33,3333333	0	0	7	8,04597701	0	0	16	18,3908046	87
		12-1503 c • ovaire ④	9	23,6842105	7	18,4210526	6	15,7894737	8	21,0526316	0	0	4	10,5263158	4	10,5263158	0	0	38
ER $\alpha$ -WT (contrôles des ER $\alpha$ -C451A)	4 semaines	12-1503 d • ovaire ①	20	29,4117647	12	17,6470588	9	13,2352941	8	11,7647059	0	0	15	22,0588235	1	1,47058824	3	4,41176471	68
		12-1503 d • ovaire ②	12	21,4285714	4	7,14285714	11	19,6428571	19	33,9285714	0	0	5	8,92857143	2	3,57142857	3	5,35714286	56
		12-482 a • ovaire ①	24	23,3009709	11	10,6796117	11	10,6796117	23	22,3300971	0	0	32	31,0679612	0	0	2	1,94174757	103
		12-482 a • ovaire ②	12	12,371134	8	8,24742268	11	11,3402062	30	30,9278351	0	0	31	31,9587629	0	0	5	5,15463918	97
		12-482 a • ovaire ③	11	40,7407407	3	11,1111111	1	3,7037037	7	25,9259259	0	0	5	18,5185185	0	0	0	0	27
ER $\alpha$ -C451A	4 semaines	12-679 a • ovaire ①	16	23,1884058	10	14,4927536	15	21,7391304	12	17,3913043	0	0	13	18,8405797	0	0	3	4,34782609	69
		12-679 a • ovaire ②	11	15,0684932	11	15,0684932	10	13,6986301	13	17,8082192	0	0	24	32,8767123	0	0	4	5,47945205	73
		12-679 b • ovaire ①	25	26,0416667	12	12,5	11	11,4583333	18	18,75	0	0	23	23,9583333	0	0	7	7,29166667	96
		12-679 b • ovaire ②	10	18,1818182	7	12,7272727	15	27,2727273	10	18,1818182	0	0	12	21,8181818	0	0	1	1,81818182	55
		12-680 a • ovaire ①	22	28,9473684	17	22,3684211	7	9,21052632	14	18,4210526	0	0	12	15,7894737	0	0	4	5,26315789	76
		12-680 a • ovaire ②	6	8,10810811	7	9,45945946	8	10,8108108	23	31,0810811	0	0	22	29,7297297	0	0	8	10,8108108	74
		12-680 a • ovaire ③	6	12,7659574	9	19,1489362	3	6,38297872	8	17,0212766	0	0	19	40,4255319	0	0	2	4,25531915	47
		12-680 a • ovaire ④	13	14,4444444	14	15,5555556	15	16,6666667	23	25,5555556	0	0	21	23,3333333	0	0	4	4,44444444	90
		12-680 b	11	15,942029	12	17,3913043	6	8,69565217	20	28,9855072	0	0	16	23,1884058	0	0	4	5,79710145	69
		12-680 c • ovaire ①	2	3,7037037	4	7,40740741	11	20,3703704	21	38,8888889	0	0	11	20,3703704	0	0	5	9,25925926	54
12-680 c • ovaire ②	4	5,88235294	4	5,88235294	16	14,7058824	18	26,4705882	0	0	25	36,7647059	0	0	7	10,2941176	68		
12-680 d • ovaire ①	5	5,10204082	3	3,06122449	10	16,3265306	30	30,6122449	0	0	39	39,7959184	0	0	5	5,10204082	98		
12-680 e • ovaire ①	3	4,47761194	8	11,9402985	13	19,4029851	19	28,358209	0	0	17	25,3731343	0	0	7	10,4477612	67		
12-680 e • ovaire ②	4	6,4516129	7	11,2903226	9	14,516129	18	29,0322581	0	0	20	32,2580645	0	0	4	6,4516129	62		

**Annexe 6. Résultats des comparaisons entre souches de souris WT permettant de les combiner en un seul génotype "ER $\alpha$ -WT"**

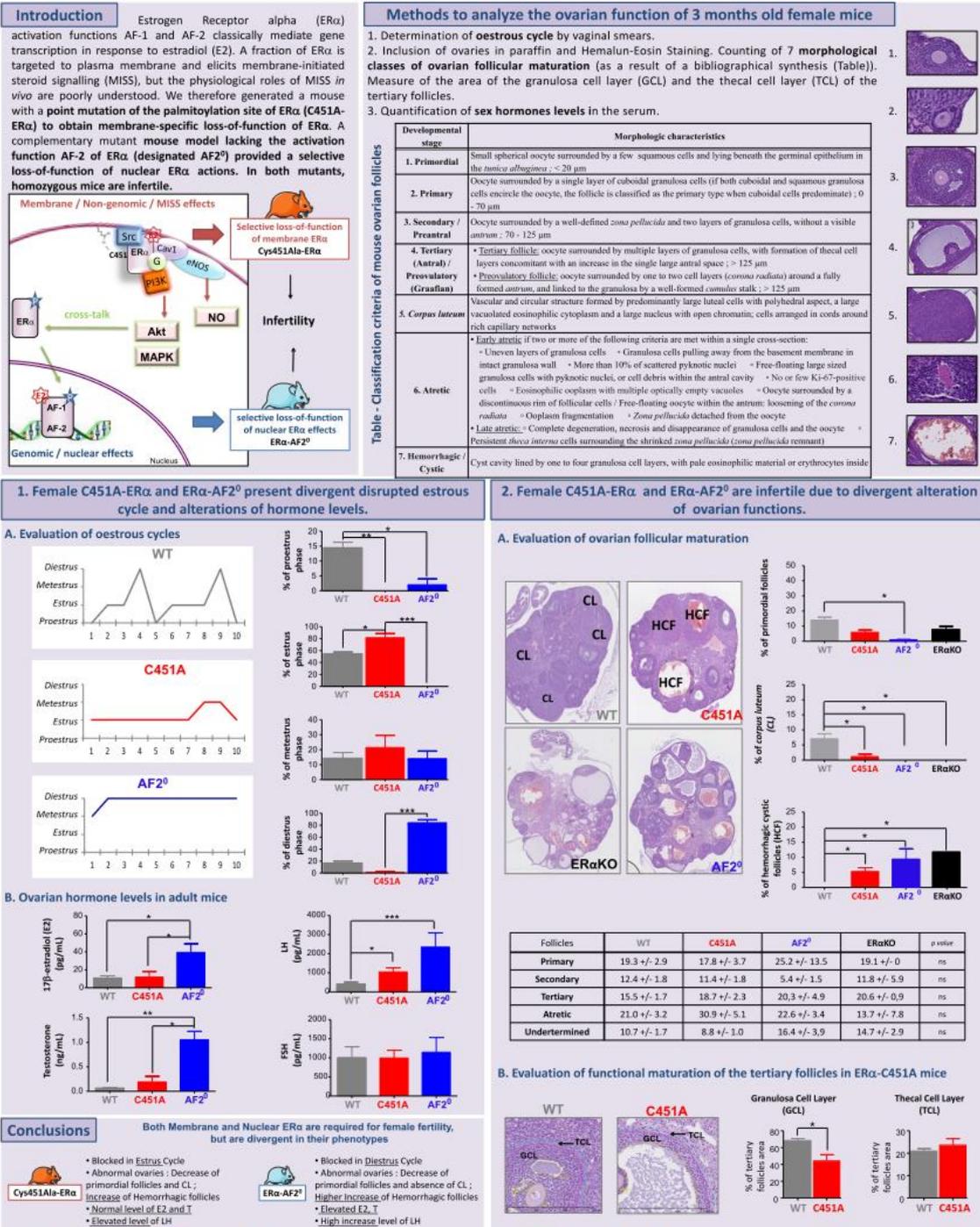
Mesures analysées	Statistiques de test de Kruskal-Wallis		
	$\chi^2$	d.d.l <sup>1</sup>	p
Cycle œstral à 5 semaines (proportion du temps passé par phase)			
- Proœstrus	0,20	2	0,90
- Œstrus	0,25	2	0,88
- Métœstrus	0,65	2	0,72
- Diœstrus	2,9	2	0,23
Comptage folliculaire à 4 semaines (proportion de chaque type de follicule)			
- Primordiaux	0	1	1
- Primaires	1,65	1	0,20
- Secondaires	1,65	1	0,20
- Tertiaires	0,02	1	0,88
- Corps jaunes	-	-	-
- Atrétiques	0	1	1
- Kystiques / hémorragiques	-	-	-
- Non déterminés	3,4	1	0,06
Aires granulosa / thèque 12 semaines (en proportion de l'aire totale du follicule)			
- Granulosa	1,2	2	0,54
- Thèque	4,7	2	0,10

<sup>1</sup>d.d.l = degrés de liberté, égal à nombre de souches WT – 1

# Annexe 7. Poster présenté au congrès "Mouse Models of Disease: Using pathology techniques to enhance phenotyping outcomes", Wellcome Trust genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, Royaume-Uni, Février 2014

## Mutation of the palmitoylation site of estrogen receptor ER $\alpha$ in vivo reveals the crucial role of membrane effects of estrogens in female fertility.

Lucile Sautier<sup>1b\*</sup>, Marine Adlanmerini<sup>2\*</sup>, Anne Abot<sup>3</sup>, Aurélie Fabre<sup>3</sup>, Frédéric Boudou<sup>3</sup>, Marie-José Fouque<sup>3</sup>, Coralie Fontaine<sup>3</sup>, Jean-François Arnal<sup>3</sup>, Françoise Lenfant<sup>3</sup>, Isabelle Raymond-Letron<sup>b</sup>. \*equally contributed; <sup>1</sup>INSERM U1048, I2MC, Université de Toulouse, CHU Toulouse, BP 84225, 31 432 Toulouse cedex 04, France; <sup>2</sup>Université de Toulouse, UPS-INP-ENV & INSERM UMS006, Laboratoire d'histopathologie, F-31076 Toulouse, France



## Annexe 8. Résumé de l'article publié dans PNAS

### **Mutation of the palmitoylation site of estrogen receptor $\alpha$ in vivo reveals tissue-specific roles for membrane versus nuclear actions.**

Adlanmerini M1, Solinhac R, Abot A, Fabre A, Raymond-Letron I, Guihot AL, Boudou F, **Sautier L**, Vessières E, Kim SH, Lière P, Fontaine C, Krust A, Chambon P, Katzenellenbogen JA, Gourdy P, Shaul PW, Henrion D, Arnal JF, Lenfant F.

Estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) activation functions AF-1 and AF-2 classically mediate gene transcription in response to estradiol (E2). A fraction of ER $\alpha$  is targeted to plasma membrane and elicits membrane-initiated steroid signaling (MISS), but the physiological roles of MISS in vivo are poorly understood. We therefore generated a mouse with a point mutation of the palmitoylation site of ER $\alpha$  (C451A-ER $\alpha$ ) to obtain membrane-specific loss of function of ER $\alpha$ . The abrogation of membrane localization of ER $\alpha$  in vivo was confirmed in primary hepatocytes, and it resulted in female infertility with abnormal ovaries lacking corpora lutea and increase in luteinizing hormone levels. In contrast, E2 action in the uterus was preserved in C451A-ER $\alpha$  mice and endometrial epithelial proliferation was similar to wild type. However, E2 vascular actions such as rapid dilatation, acceleration of endothelial repair, and endothelial NO synthase phosphorylation were abrogated in C451A-ER $\alpha$  mice. A complementary mutant mouse lacking the transactivation function AF-2 of ER $\alpha$  (ER $\alpha$ -AF2<sup>0</sup>) provided selective loss of function of nuclear ER $\alpha$  actions. In ER $\alpha$ -AF2<sup>0</sup>, the acceleration of endothelial repair in response to estrogen-dendrimer conjugate, which is a membrane-selective ER ligand, was unaltered, demonstrating integrity of MISS actions. In genome-wide analysis of uterine gene expression, the vast majority of E2-dependent gene regulation was abrogated in ER $\alpha$ -AF2<sup>0</sup>, whereas in C451A-ER $\alpha$  it was nearly fully preserved, indicating that membrane-to-nuclear receptor cross-talk in vivo is modest in the uterus. Thus, this work genetically segregated membrane versus nuclear actions of a steroid hormone receptor and demonstrated their in vivo tissue-specific roles.

#### KEYWORDS:

fertility; genomic actions; nongenomic effects; vascular effects

Accessible à <http://www.pnas.org/content/111/2/E283.lon>