

Université de Montréal

Étude de la fonction ovarienne chez les souris déficientes des enzymes
hyaluronidases

Par

Karine Dumaresq-Doiron

Programme des Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M. Sc.) en Sciences Biomédicales

Août 2008

© Karine Dumaresq-Doiron, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Étude de la fonction ovarienne chez les souris déficientes des enzymes
hyaluronidases

Présenté par :
Karine Dumaresq-Doiron

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Patrick J. Devine, Ph. D.
Euridice Carmona, Ph. D.
François Dubé, Ph. D.

Président-rapporteur
Directrice de recherche
Membre du jury

Résumé

Les mammifères femelles naissent avec un très grand nombre de follicules ovariens primordiaux (10^4 - 10^6); par contre, la grande majorité (99%) de ces follicules n'atteignent jamais la maturité et subissent l'atrésie, principalement par l'apoptose des cellules de la granulosa. Notre laboratoire a démontré que les hyaluronidases des mammifères induisent l'apoptose des cellules de la granulosa et sont impliquées dans l'atrésie des follicules mais que cet effet apoptotique ne serait pas dû à leur activité enzymatique. Notre modèle propose que les hyaluronidases aient un rôle dans les follicules non destinés à ovuler. Le but de la présente étude est d'évaluer la folliculogénèse et la fertilité des souris déficientes de ces enzymes. Les résultats montrent que la délétion de Hyal-3 ne semble pas affecter la fonction ovarienne des souris mais qu'il pourrait y avoir un effet compensatoire par Hyal-1 chez les souris déficientes de Hyal-3 étant donné que son expression est augmentée chez ces souris. La délétion de Hyal-1 a pour effet d'augmenter le nombre des follicules primordiaux, primaires et secondaires, particulièrement chez les souris de bas âge, et de diminuer le niveau d'apoptose des cellules de la granulosa. Afin d'évaluer la fonction de Hyal-1, -2 et -3 sans effet compensatoire entre elles, nous avons voulu créer une souris déficiente des ces 3 hyaluronidases spécifiquement dans les gonades en utilisant le système Cre/loxP. Un vecteur contenant la séquence Cre sous le contrôle du promoteur de Inhibin- α , qui conduit l'expression des gènes en aval chez les cellules somatiques des gonades, a été construit avec succès. En conclusion, cette étude nous révèle que Hyal-3 ne semble pas affecter la fonction ovarienne mais que la délétion de Hyal-1 augmente la folliculogénèse et diminue l'apoptose des cellules de la granulosa.

Mots clés : hyaluronidase, folliculogénèse, atrésie des follicules, souris déficientes des Hyals, apoptose, système Cre/loxP

Abstract

Female mammals are born with a large number of ovarian primordial follicles, though the vast majority of these never reach the preovulatory stage and undergo atresia, mainly through granulosa cell apoptosis. Our laboratory has established that mammalian hyaluronidases induce apoptosis of ovarian granulosa cells and that they are involved in follicular atresia but that their apoptotic effect is not due to their enzymatic activity. Our model suggests that mammalian hyaluronidases might have a role in follicles not destined to ovulate. The aim of this study was to evaluate the folliculogenesis and fertility of mice devoid of these enzymes. Our results showed that Hyal-3 KO mice have normal folliculogenesis, which could be explained by a compensatory effect of Hyal-1 since its expression is upregulated in these mice. In contrast, Hyal-1 KO mice had increased numbers of primordial, primary and secondary follicles, particularly in young mice, and lower levels of granulosa cell apoptosis. In order to investigate the effect of the three hyaluronidases, Hyal-1, -2 and -3, without a compensatory effect by one another, we decided to create a transgenic mouse deficient in all these three hyaluronidases but only in the gonads by using the Cre/loxP system. We successfully created a plasmid containing the Cre sequence under the control of Inhibin- α promoter, which conducts gene expression in somatic cells of the gonads. In conclusion, the present work demonstrates that Hyal-3 does not have any effect on ovarian function, but that deletion of Hyal-1 in mice promotes increased folliculogenesis and lowers granulosa cell apoptosis.

Key words: hyaluronidase, folliculogenesis, follicular atresia, Hyal deficient mice, apoptosis, Cre/loxP system

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	iv
Table des matières	v
Liste des Tableaux et Figures	vii
Liste des abréviations et des sigles	ix
Remerciements.....	xii
1. Introduction	1
1.1. La folliculogénèse	1
1.1.1. Recrutement initial et recrutement cyclique	3
1.1.2. Sélection négative et positive amenant à la dominance	5
1.1.3. Ovulation	7
1.2. L'acide hyaluronique (hyaluronan)	10
1.2.1. Hyaluronan synthases	10
1.2.2. L'acide hyaluronique dans la matrice péricellulaire.....	12
1.3. Les hyaluronidases	15
1.3.1. Classification.....	15
1.3.2. Structure génomique des hyaluronidases des mammifères	16
1.3.3. Distribution et caractéristiques des hyaluronidases des mammifères.	18
1.3.4. Fragments de HA générés par les hyaluronidases	21
1.3.5. Modèles de souris déficientes des enzymes hyaluronidases	23
1.4. Notre étude sur les rôles des hyaluronidases dans l'ovaire	25
1.5. Objectifs du projet de recherche	28
2. Matériel et méthodes	30
2.1. Animaux :	30
2.2. Détermination du génotype des souris déficientes de Hyal-3 et Hyal-1 : ..	30
2.2.1. Extraction de l'ADN génomique des queues de souris	30
2.2.2. Analyse du génotype par réaction de polymérase en chaîne (PCR) ..	31
2.3. Histologie des ovaires	33
2.4. Induction de l'atrésie	34
2.4.1. Récolte des cellules de la granulosa	35

2.4.2. Évaluation du niveau d'apoptose des cellules de la granulosa	35
2.5. Induction de l'ovulation	36
2.6. Analyse d'expression	36
2.6.1. Extraction de l'ARN.....	36
2.6.2. PCR quantitative.....	36
2.7. Clonage moléculaire	37
2.7.1. Vecteurs	37
2.7.2. Milieux de culture bactérienne	37
2.7.3. Préparation d'ADN.....	38
2.7.3.1. MiniPrep phénol/chloroforme à partir d'une culture bactérienne ..	38
2.7.3.2. Midi Prep	39
2.7.3.3. Purification d'ADN à partir de gel d'agarose.....	39
2.7.4. Digestions.....	39
2.7.5. Ligations	39
2.7.6. Transformations.....	40
2.7.7. Analyse des colonies.....	40
2.7.8. Analyse du génotype de l'éventuelle souris transgénique CRE-Inhibin α	41
2.8. Quantification d'acides nucléiques.....	41
2.9. Séquençage.....	41
2.10. Analyses statistiques	42
3. Résultats	43
3.1. Fonction ovarienne chez les souris déficientes de Hyal-3	43
3.2. Fonction ovarienne chez les souris déficientes de Hyal-1	49
3.3. Construction d'un plasmide contenant le gène <i>Cre</i> sous le contrôle du promoteur de l' <i>Inhibin-α</i>	55
4. Discussion.....	62
4.1. Applications et perspectives.....	69
4.2. Conclusion	72
5. Bibliographie:	74

Liste des Tableaux et Figures

Figure 1. Schéma de la folliculogénèse. (5).....	2
Tableau I: Résumé des différents régulateurs positifs et négatifs dans le développement des follicules ovariens.....	7
Figure 2: Représentation d'une répétition du dissaccharide -D-acide glucuronique- β 1,3-N-acétyl-D-glucosamine- β 1,4-.....	10
Figure 3 : Synthèse des chaînes de HA par les HA synthases de classe I.....	11
Figure 4: Modèle de l'interaction de α 1 et de TSG-6 avec les chaînes d'acide hyaluronique dans la matrice extracellulaire.....	14
Figure 5 : Arrangement chromosomique des différents gènes de hyaluronidases chez l'humain et la souris.	17
Figure 6 : Représentation des différents domaines protéiques des hyaluronidases.	17
Tableau II : Caractéristiques des différentes hyaluronidases.....	21
Figure 7 : Schéma de la dégradation de HA.	22
Figure 8. Stratégie pour la délétion de Hyal-1, Hyal-2 et Hyal-3.	29
Tableau III. Séquences des différents oligonucléotides utilisés comme amorces et la taille attendue de chaque produit pour les différentes amplifications par PCR et PCR en temps réel.....	32
Figure 9. Photographie d'une coupe d'ovaire de souris représentant les différents types de follicules ovariens.....	34
Figure 10. Photographie de cellules de la granulosa marquées au Hoechst. ..	35
Figure 11. Décompte des follicules ovariens chez les souris déficientes de Hyal-3.....	44
Figure 12. Analyse de l'apoptose des cellules de la granulosa chez les souris déficientes de Hyal-3.....	45
Figure 13. Analyse du nombre d'ovocytes produits chez les souris déficientes de Hyal-3.....	47
Figure 14. Analyse du niveau d'expression des gènes <i>Hyal1</i> et <i>Hyal2</i> chez les souris déficientes du gène <i>Hyal3</i> par PCR en temps réel.	48
Figure 15. Décompte des follicules ovariens chez les souris déficientes de Hyal-1.....	50

Figure 16. Analyse de l'apoptose des cellules de la granulosa chez les souris déficientes de Hyal-1.....	52
Figure 17. Analyse du nombre d'ovocytes produits chez les souris déficientes de Hyal-1.....	53
Figure 18. Construction de pBlueCRE.....	56
Figure 19. Construction de pBlueCRE-InhibinProm.....	58
Figure 20. Représentation schématique du résultat du clonage de CRE sous le contrôle du promoteur Inhibin- α	60
Figure 21. Test de détermination du génotype de la souris transgénique avec les amorces CRE Trans F et CRE Trans R.....	61

Liste des abréviations et des sigles

°C :	degré Celsius
% :	pourcentage
ADN :	acide désoxyribonucléique
ADNc :	acide désoxyribonucléique complémentaire
AMH :	anti-Mullerian hormone
AMPc :	adénosine monophosphate cyclique
ARN :	acide ribonucléique
BMP:	bone morphogenic protein
BSA :	bovine serum albumine
Ch et ChS :	chondroïtine et sulfate de chondroïtine
COC :	complexe ovocyte-cumulus
dNTP :	2'-désoxyribonucléotide-5'-triphosphate
eCG :	equine chorionic gonadotropin
EDTA :	ethylenediamine tetraacetic acid
EGF:	epidermal growth factor
EtOH :	éthanol
FBS :	fetal bovine serum
FGF :	fibroblast growth factor
<i>g</i> :	force centrifuge relative
GAG :	glycosaminoglycan
GPI:	glycosylphosphatidyl-inositol
HA :	acide hyaluronique ou hyaluronan
HAS:	hyaluronan synthase
hCG :	human chorionic gonadotropin
h :	heure
Hyal-1:	hyaluronidase 1
Hyal-2:	hyaluronidase 2
Hyal-3:	hyaluronidase 3
Hyal-4:	hyaluronidase 4

Hyal-5:	hyaluronidase 5
I α I :	inter-alpha trypsin inhibitor
IGF :	insuline-like growth factor
KL:	kit ligand
LB:	Luria Broth
LH :	luteinizing hormone
LIF:	leukemia inhibitory factor
MDa:	méga Dalton (10^6 Da)
MEC:	matrice extracellulaire
min :	minute
mM :	millimolaire
pb :	paire de bases
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PCR :	polymerase chain reaction ou réaction de polymérase en chaîne
pg:	picogramme (10^{-12} g)
pmol :	picomole (10^{-12} mole)
PMSG :	pregnant mare serum gonadotropin
PTX3 :	pentraxin 3
rpm:	rotations par minute
RT-PCR :	reverse transcriptase polymerase chain reaction
sec:	secondes
Spam1:	sperm adhesion molecule 1
TGF- β :	transforming growth factor- β
TIM :	triose phosphate isomérase
TSG-6 :	tumor necrosis factor-stimulated gene 6
U :	unité
UDP:	uracil diphosphate
μ g:	microgramme (10^{-6} g)
μ L :	microlitre (10^{-6} L)

A ma grand-mère, Rosalie, et à mon grand-père, Alfred, qui nous a quittés vers un monde meilleur le 13 avril 2008, qui m'ont toujours apporté un support moral et spirituel.

A ma mère, Guénette, qui m'a supportée et encouragée tout au long de mes études

A mon père, Edouard, qui même de loin, m'a toujours encouragée à faire de mon mieux.

A ma sœur, Christine, qui a toujours cru en moi.

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier ma directrice, Dre Euridice Carmona, pour m'avoir acceptée comme étudiante dans son laboratoire. J'ai eu la chance de faire mes études de maîtrise dans un environnement enrichissant et valorisant et Dre Carmona a toujours été là pour me supporter dans les bons moments comme dans les moins bons. Dre Carmona m'a appris à développer mes aptitudes scientifiques et techniques et à faire preuve d'autonomie et de jugement. Je me sentirai toujours privilégiée d'avoir fait partie de son laboratoire pendant les dernières années.

Je veux remercier aussi Adriana Mari Orimoto, ma collègue de laboratoire, avec qui ce fut un plaisir de travailler. Merci de m'avoir aidée dans mon travail et pour m'avoir écoutée quand j'en avais besoin.

Je veux également remercier Dr Patrick J. Devine qui m'a appris à faire les techniques entourant l'histologie des ovaires. Merci pour votre patience et le temps que vous m'avez accordé.

Je ne pourrais remettre ce mémoire sans prendre le temps de remercier Dr Yves Paquette qui a été une référence incomparable. Il a toujours pris le temps de m'écouter lorsque j'avais des problèmes techniques et s'est toujours fait un plaisir de m'aider à les résoudre.

1. Introduction

1.1. La folliculogénèse

La fonction principale des gonades femelles est la différenciation et la relâche d'ovocytes matures pour la fécondation et la propagation efficace de l'espèce. De plus, l'ovaire produit des stéroïdes qui permettent le développement des caractères sexuels secondaires et supportent la grossesse. Dans les ovaires des mammifères, les follicules individuels sont constitués d'un ovocyte entouré de cellules de la granulosa et de couches externes de cellules theca (1). La folliculogénèse est un processus hautement régulé dans lequel différents facteurs endocrines, paracrines et autocrines agissent de façon temporelle et spatiale afin de réguler et coordonner la croissance et le développement de l'ovocyte et des couches de cellules de la granulosa et theca avoisinantes (2). Les follicules se développent en passant par différents stades, soit primordial, primaire et secondaire avant d'acquérir une cavité antrale (1) (figure 1).

L'ovaire contient une grande réserve de follicules primordiaux inactifs qui contiennent des ovocytes non croissants et des cellules pré-granulosa aplaties (squameuses) ne se divisant pas et entourées d'une lamina basale. Après l'entrée dans le pool des follicules croissants, les cellules pré-granulosa squameuses se transforment en une simple couche de cellules de la granulosa cuboïdes entourant un ovocyte croissant. Les cellules de la granulosa prolifèrent pour former plusieurs couches de cellules, un processus qui nécessite l'expansion de la lamina basale. Dans les follicules possédant plusieurs couches de cellules de la granulosa, la couche de cellules theca est recrutée par le stroma afin d'entourer la lamina basale. Une cavité remplie de fluides, appelée aussi antrum, se forme également à l'intérieur du follicule dans le compartiment des cellules de la granulosa (2). Au stade antral, la plupart des follicules subissent une dégénération atrétique, tandis que quelques uns d'entre eux, sous le contrôle cyclique des gonadotropines qui arrive après la puberté, atteignent le stade préovulatoire (3, 4) (figure 1).

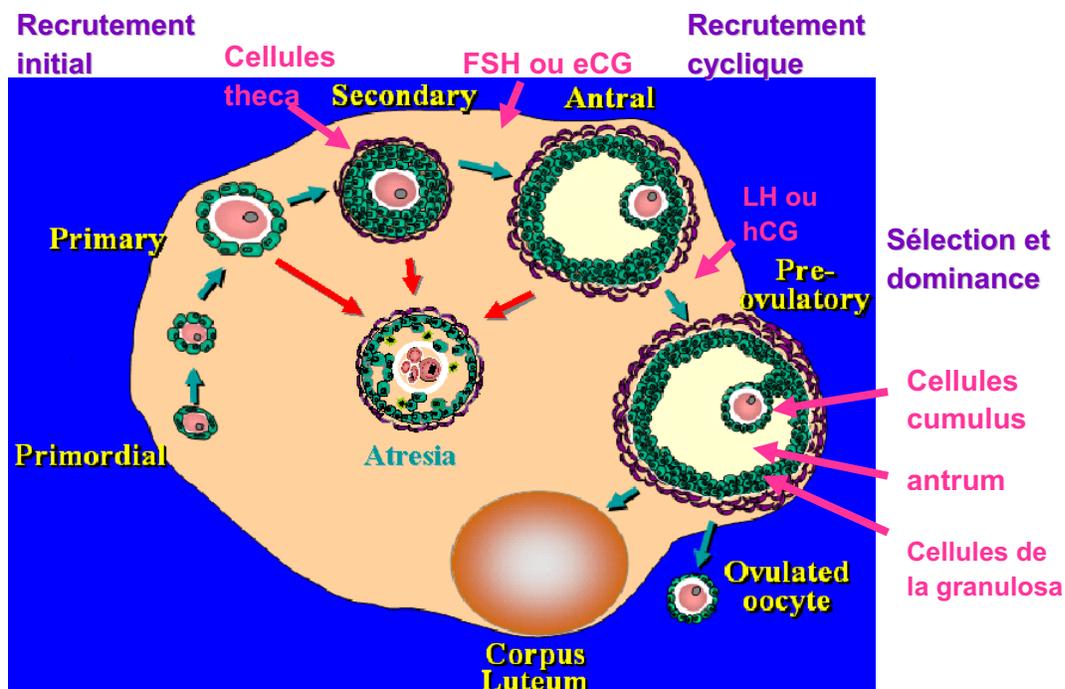


Figure 1. Schéma de la folliculogénèse. (5)

Ces follicules de Graaf sont la source majeure de sécrétion cyclique d'œstrogènes ovariens chez les femmes en âge de se reproduire (1). La FSH (follicle stimulating hormone) stimule le développement des follicules des stades secondaires jusqu'à pré-ovulatoires (ou antraux) matures, caractérisés par un large antrum et un ovocyte qui est apte à l'ovulation en réponse à la LH (luteinizing hormone) (2). En réponse aux élévations de gonadotropines aux stades préovulatoires pendant chaque cycle de reproduction, le follicule de Graaf dominant ovule afin de relâcher l'ovocyte mature pour la fécondation, tandis que les cellules de la granulosa et theca restantes subissent une transformation (6) ; la lamina basale est dégradée et les cellules de la granulosa restantes se différencient en cellules lutéales afin de devenir un corpus luteum (2). Le pool d'ovocytes dans l'ovaire des mammifères est établi très tôt au début de leur vie, donc la sénescence ovarienne est liée à l'éventuel épuisement de la réserve de follicules primordiaux.

La folliculogénèse n'est pas seulement contrôlée par les hormones gonadotropines. Il a été démontré que plusieurs membres de la superfamille des TGF- β (transforming growth factor- β) agissent comme des régulateurs intraovariens dans ce processus. Par exemple, l'activine, un membre de la famille des TGF- β , stimule la formation du follicule (7) et la sensibilité à la FSH, en augmentant l'expression du récepteur de la FSH. L'activine, qui est composée de deux sous-unités β , induit également son antagoniste l'inhibine (hétérodimère $\alpha\beta$). Tandis que l'activine est contrôlée localement par la follistatine, une protéine de liaison qui va empêcher l'activine de se lier à son récepteur (8, 9), l'inhibine agit d'une façon endocrine contraire à celle de la FSH. En retournant à l'hypophyse, l'inhibine empêche la signalisation d'activine, complétant ainsi le cycle de régulation folliculaire (10). D'autres membres de la famille des TGF- β ont aussi des rôles importants dans le développement des follicules, lesquels sont discutés plus loin, et ces protéines, ensemble avec les hormones gonadotropines, dictent le destin d'un follicule.

1.1.1. Recrutement initial et recrutement cyclique

Le terme recrutement a été utilisé fréquemment par différents chercheurs pour décrire deux points décisifs importants mais distincts pendant le développement des follicules (11-14). Les follicules primordiaux dormants sont recrutés dans le pool de follicules en croissance de façon continue (recrutement initial), tandis que l'augmentation du niveau de FSH circulant à chaque cycle de reproduction permet un recrutement d'une cohorte de follicules antraux (recrutement cyclique) (1) (figure 1).

Le recrutement initial est considéré comme étant un processus continu qui commence juste après la formation du follicule, très tôt avant le début de la puberté. Après le recrutement initial, la croissance de l'ovocyte est un facteur prédominant du follicule grandissant, mais ces ovocytes demeurent arrêtés dans la prophase de la méiose. Pour ces follicules qui ne sont pas recrutés, la voie par défaut est de demeurer dormants. Par opposition, le recrutement cyclique

des follicules en croissance débute après le début de la puberté et résulte de l'augmentation de la FSH circulante pendant chaque cycle de reproduction qui vient rescaper une cohorte de follicules antraux de l'atrésie. Pendant le recrutement cyclique, seul un certain nombre de follicules vont survivre, et la voie par défaut est d'aller en atrésie. Les ovocytes de ces follicules ont déjà complété leur croissance, acquis une zona pellucida et sont aptes à compléter leur méiose (15, 16).

Les cellules pré-granulosa qui entourent l'ovocyte dans les follicules primordiaux expriment une quantité de facteurs peptidiques comme kit ligand (KL) et le leukemia inhibitory factor (LIF) dont on a démontré *in vitro* la capacité de promouvoir la transition des follicules primordiaux vers le stade primaire, et de stimuler la croissance de l'ovocyte et le recrutement et la prolifération des cellules theca provenant de tissus stromaux avoisinants (17-19). Le récepteur pour KL, c-kit, est exprimé par l'ovocyte et les cellules thecales-interstitielles, ce qui leur permet de répondre à ce facteur de croissance. Les précurseurs des cellules theca produisent du FGF-7 (fibroblast growth factor-7) qui pourrait, à son tour, agir sur les cellules pré-granulosa et/ou les cellules de la granulosa afin de réguler à la hausse l'expression de KL, et donc amplifier son effet positif sur la prolifération des cellules pré-theca/theca et la croissance de l'ovocyte (20). Le FGF-2 qui est exprimé par les ovocytes des follicules primordiaux (19) ainsi que d'autres facteurs, comme le BMP-4 et le BMP-7 (bone morphogenic protein) de la famille des TGF- β , exprimés dans les cellules pré-theca ou stromales chez les rongeurs, se sont avérés avoir un rôle positif dans la transition primordial à primaire et ils améliorent la survie du follicule (18, 21). Trois autres membres de la famille des TGF- β , le GDF-9, le BMP-15 et le BMP-6, sont exprimés par les ovocytes de follicules aux stades primordiaux (vache et brebis) et primaires (souris) (22-26). Le GDF-9 est important pour la progression de la folliculogénèse, les souris déficientes du gène étant infertiles et montrant un arrêt du développement des follicules au stade primaire (27, 28). Les souris déficientes de BMP-15 ou BMP-6 ne subissent que des effets minimaux quant à leur développement des follicules et leur fertilité (29, 30). Un

autre membre de la famille TGF- β , l'AMH (anti-Mullerian hormone), a quant à elle, un effet inhibiteur sur la croissance des follicules primordiaux (voir tableau I) (31). L'expression de l'AMH est absente dans les follicules primordiaux mais détectée dans les follicules primaires jusqu'aux follicules secondaires ce qui démontre un effet de rétrocontrôle négatif des follicules en croissance sur les follicules primordiaux dormants (32).

Le développement des follicules primaires jusqu'au début du stade antral implique l'augmentation de la taille de l'ovocyte, la formation de la zona pellucida, la prolifération des cellules de la granulosa pour former un tissu multicouches, la formation de la lamina basale, la condensation des cellules stromales autour de la lamina basale afin de former une couche de cellules theca unie et le développement d'espaces remplis de fluides qui vont graduellement former une cavité antrale unique. Même si il y a une bonne évidence que les gonadotropines influencent la progression des follicules nouvellement antraux (33, 34), leur rôle est considéré comme étant permissifs plutôt qu'essentiels. Il est proposé que des facteurs locaux, incluant plusieurs membres de la famille TGF- β , régulent la transition primaire à secondaire des follicules et la croissance subséquente jusqu'au début du stade antral. Les membres locaux de la famille TGF- β impliqués comme régulateurs positifs de la croissance des follicules pré-antraux incluent GDF-9 (18, 28, 35-40) et BMP-15 (30, 41) des ovocytes, les activines des cellules de la granulosa (42-52), BMP-4 et BMP-7 (18, 53, 54) des cellules theca et TGF- β (55-59) des cellules de la granulosa et theca. Par opposition, de fortes évidences indiquent un rôle négatif de l'AMH (31, 60-62) dans le développement des follicules pré-antraux (voir tableau I) (32).

1.1.2. Sélection négative et positive amenant à la dominance

Le recrutement cyclique et la sélection des follicules représentent un processus continu, amenant éventuellement à l'émergence du ou des follicules préovulatoires. Le recrutement cyclique et la sélection finale du

follicule sont clairement démontrés lors du cycle menstruel chez l'humain. Après l'augmentation de la FSH circulante pendant la période périmenstruelle, une cohorte de follicules antraux s'échappe de l'apoptose dû à l'action de la FSH qui leur permet de survivre. Parmi ce groupe de follicules antraux, un des follicules dominants grandit plus rapidement que les autres et produit une plus grande quantité d'œstrogènes et d'inhibines (63). Malgré le fait que la raison pour laquelle un follicule se démarque des autres pour la dominance n'est pas encore claire, ce follicule est probablement plus sensible à l'action de la FSH (6), peut-être à cause d'une expression plus élevée des récepteurs de FSH et/ou LH ou une augmentation des facteurs de croissances locaux qui augmenterait la réponse à la FSH comme le suggère les études faites avec les bovins (64-66). Les œstrogènes et inhibines produits par les follicules de plus grande taille suppriment la relâche de FSH de l'hypophyse pendant la phase mi-folliculaire. Les follicules antraux en croissance restants sont donc privés d'une stimulation adéquate par la FSH qui leur permettrait de survivre (67). La sélection négative des follicules est donc le résultat de la production d'œstrogène et d'inhibine par le follicule dominant causant une rétroaction négative sur la relâche de gonadotropines. De plus, ce follicule qui croît rapidement produit également une plus grande quantité de facteurs de croissance autocrines et paracrines qui stimulent l'augmentation de la vasculature et de la réponse à la FSH, constituant donc un mécanisme de sélection positive local. Plusieurs études démontrent l'importance des facteurs de croissance de l'insuline (IGF) et d'autres facteurs locaux dans l'amplification de l'action de la FSH (68, 69). Des études, pour la plupart chez les rongeurs, indiquent un rôle autocrine/paracrine pour l'activine et BMP-6 des cellules de la granulosa et un rôle paracrine pour GDF-9, BMP-15 et BMP-6 dérivés de l'ovocyte dans la promotion de la prolifération des cellules de la granulosa et la modulation des fonctions FSH-dépendantes du follicule. L'exposition différentielle à ces facteurs pourrait être une des façons par laquelle certains follicules sont sensibilisés à la FSH et sont donc sélectionnés pour devenir les follicules dominants qui vont continuer la croissance jusqu'au stade pré-

ovulatoire (32). Par opposition, l'AMH réduit la réponse à la FSH chez les follicules pré-antraux et antraux et peut donc avoir un rôle négatif dans le recrutement cyclique des follicules et dans la sélection du follicule dominant (31, 60, 62). Les facteurs atrérogéniques produits par le follicule dominant sont possiblement responsables du déficit de développement des follicules non-dominants après administration de gonadotropines exogènes (13, 70). Plus encore, l'augmentation de la réponse à la FSH par le follicule dominant stimule l'expression des récepteurs de FSH et de LH dans les cellules de la granulosa de ce follicule (71, 72), assurant donc un mécanisme permettant l'ovulation éventuelle du follicule sélectionné. Des modélisations par ordinateur d'images à ultrasons chez des patients suggèrent également un effet suppressif du follicule dominant sur les follicules non-dominants qui l'entourent (73).

Tableau I: Résumé des différents régulateurs positifs et négatifs dans le développement des follicules ovariens.

Types de follicule	Régulateurs positifs	Régulateurs négatifs
Primordiaux	KL, LIF, FGF-2, BMP-4, BMP-7	AMH
Primaire	GDF-9	AMH
Secondaire/ Pré-Antraux	GDF-9, BMP-15, activine, BMP-4, BMP-7, TGF- β	AMH
Antral	FSH, IGF, activine, GDF-9, BMP-15, BMP-6	Inhibine, AMH

1.1.3. Ovulation

Lorsque les follicules ovariens atteignent le stade antral dans la folliculogénèse, une cavité remplie de fluides se forme (antrum). Comme le follicule grandit, une population spéciale de cellules entourant l'ovocyte, les cellules cumulus, se différencient de la couche de cellules de la granulosa et la

matrice de la zona pellucida se développe autour de l'ovocyte. Des couches spécialisées vascularisées stromales (la thèque interne et externe) se développent aussi. Pendant le processus d'ovulation, une matrice riche en acide hyaluronique (HA), indispensable pour la fertilité, se forme à l'intérieur du COC (complexe cumulus ovocyte). La surface du follicule se rompt et le fluide folliculaire et le COC sont expulsés. La lamina basale folliculaire est ensuite dégradée et le follicule devient un corpus luteum. Les cellules de la granulosa deviennent des cellules lutéales et la membrana granulosa devient vascularisée à partir des couches theca (74).

La formation de la matrice extracellulaire (MEC) riche en HA autour de l'ovocyte est un processus complexe impliquant l'interaction de plusieurs protéines, protéoglycans, HA ainsi que d'autres facteurs (voir item 1.2.2). La biosynthèse de HA augmente d'un facteur 20 à 30 suite à une stimulation du COC par la LH *in vivo* et la FSH *in vitro*. La biosynthèse de protéoglycan, comme le sulfate de dermatan et le sulfate d'héparan, par le COC est aussi stimulée par la FSH mais à un moindre degré que pour HA et ne semble pas contribuer à l'expansion du COC (75). HA est aussi localisé dans le stroma et le theca des follicules à tous les stades (76) ainsi qu'au COC et aux cellules de la granulosa situées près de l'antrum 5 h après une stimulation par LH chez la souris (77). Le COC exprime spécifiquement HA synthase 2 pendant l'expansion de la matrice (78) et le GDF-9 recombinant induit l'expression de HA synthase 2 par les cellules de la granulosa *in vitro* (74, 79).

La montée de LH promeut des changements majeurs dans les follicules préovulatoires, incluant la différenciation terminale des cellules folliculaires et la maturation de l'ovocyte, des événements requis pour l'ovulation d'un œuf (ovule) fécondable. Les effets de LH s'exercent via l'activation de son récepteur (LHR), un membre de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), qui s'unit avec la protéine G_s et active l'adénylyl cyclase pour augmenter les niveaux intracellulaires d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Ce dernier va activer d'autres voies de signalisation comme celles de la protéine kinase A, du facteur d'échange des guanines activé par l'AMPc et de

la phospholipase C (80-82). Même si LH stimule directement les cellules de la granulosa et theca, son effet sur les cellules cumulus et l'ovocyte est probablement indirect étant donné qu'il n'y a peu ou pas de récepteurs de LH exprimés sur ces cellules (83). Au cours des dernières années, les membres de la famille de facteurs de croissance EGF (epidermal growth factor)-like sont devenus des candidats pour l'entremise de l'action de LH dans le follicule. Spécifiquement, amphiréguline, epiréguline et betacelluline sont rapidement induits par LH ou par son analogue hCG (human chorionic gonadotropin) (84-86) et on pense qu'ils fonctionnent de façon autocrine et paracrine afin de propager le signal induit par LH à travers le follicule préovulatoire. *In vitro*, ces facteurs de croissance promeuvent plusieurs événements qui sont stimulés par LH, incluant l'expansion du cumulus et la reprise méiotique de l'ovocyte (84, 85). Le facteur de croissance a besoin de l'activité du récepteur de l'EGF parce que des inhibiteurs de tyrosine kinase du récepteur de l'EGF bloquent ces deux processus (84, 85), de même que plusieurs autres fonctions dépendantes des gonadotropines des cellules de la granulosa (87-91).

Pour la petite proportion de follicules qui atteignent le statut ovulatoire, la folliculogénèse atteint son point culminant avec la relâche du COC et la formation subséquente du corpus luteum par un processus appelé lutéinisation. Le corpus luteum nouvellement formé synthétise et secrète de grande quantités de progestérone (et d'œstrogène chez les primates) qui sont essentiels pour le support de l'éventuelle grossesse. Si la fécondation et l'implantation subséquente ne se produisent pas, la stéroïdogénèse cesse et le corpus luteum régresse (32).

Le processus de lutéinisation est largement vu comme étant sous le contrôle des inhibiteurs de lutéinisation dérivés de l'ovocyte. Il est envisagé que ceux-ci agissent afin d'empêcher la lutéinisation et suppriment la synthèse de progestérone jusqu'au moment où l'ovocyte est relâché à l'ovulation. BMP-6, BMP-15 et GDF-9 dérivés de l'ovocyte ont l'habilité d'agir comme inhibiteur de la lutéinisation dans les cultures de cellules de la granulosa. Par exemple, ils inhibent la production de progestérone, augmentent la sécrétion d'œstradiol et

augmentent la prolifération des cellules de la granulosa (92-95). Il est fortement probable que la perte de ces facteurs au moment de l'ovulation pourrait avoir un effet significatif sur les cellules restantes du follicule et ainsi promouvoir la lutéinisation. (32)

1.2. L'acide hyaluronique (hyaluronan)

1.2.1. Hyaluronan synthases

L'acide hyaluronique (HA) ou hyaluronan est un hétéropolysaccharide linéaire composé de répétitions du disaccharide [-D-acide glucuronique- β 1,3-N-acétyl-D-glucosamine- β 1,4-] $_n$ (figure 2) et est retrouvé chez les vertébrés et certains microbes (96-101). L'hyaluronan est retrouvé typiquement à la surface cellulaire ou dans l'espace extracellulaire mais aussi à l'intérieur des cellules de mammifères. L'hyaluronan est synthétisé et polymérisé par des glycosyltransférases nommées HA synthases (voir figure 3) (HAS ; EC 2.4.1.212) mais appelées autrefois HA synthétases (102-104). Toutes les HA synthases utilisent des sucres-UDP en présence de magnésium ou de manganèse. L'équation globale pour la formation de HA est :

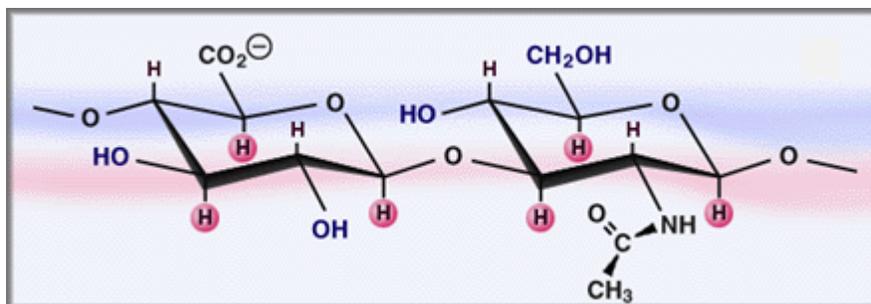
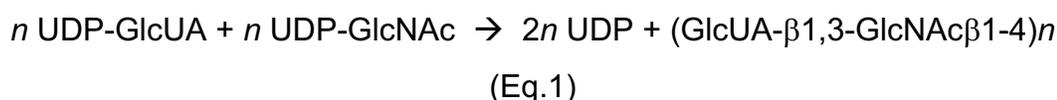


Figure 2: Représentation d'une répétition du dissaccharide -D-acide glucuronique- β 1,3-N-acétyl-D-glucosamine- β 1,4-.

Tiré de www.glycoforum.gr.jp.

De façon générale, $n > 10^{3-4}$ et génère donc des chaînes de HA d'environ 1 à 10 MDa. Contrairement à tous les autres glycoconjugués des vertébrés, HA est fabriqué comme un glycan libre, non attaché à une protéine ou un lipide. Les HA synthases n'ont pas besoin de promoteur pour initier la synthèse de HA, elles initient toutes la biosynthèse de HA *de novo* avec seulement UDP-GlcNAc, UDP-GlcUA et Mg^{2+} . Les sucres-UDP sont reliés par des liens α et les HA synthases catalysent la formation des liens β , donc ce sont des enzymes qui font inverser la configuration anomérique de ces sucres. Les disaccharides conjugués sont synthétisés à partir du pool cytoplasmique par les HA synthases et la chaîne d'hyaluronan naissante est expulsée à l'extérieur de la cellule (figure 3).

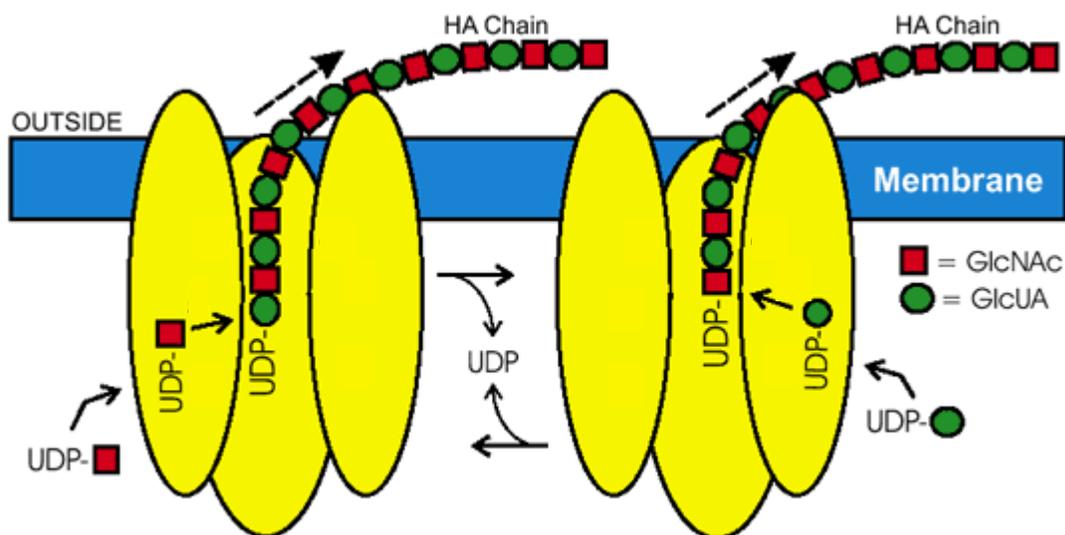


Figure 3 : Synthèse des chaînes de HA par les HA synthases de classe I. Représentation d'une hyaluronan synthase de classe I lié à la membrane plasmique d'une cellule. Les sucres-UDP sont produits et utilisés par la synthase à l'intérieur de la cellule et la chaîne de HA est continuellement transloquée à l'extérieur de la cellule. Deux enzymes sont représentées ici afin d'illustrer comment une enzyme peut, de façon alternative, générer chacun des deux types de liaisons glycosidiques. Modifié à partir de www.glycoforum.gr.jp.

Des tests fonctionnels avec des protéines recombinantes ont démontrés que les HA synthases sont les premières glycosyltransférases dans lesquelles une seule protéine catalyse le transfert de deux différents monosaccharides. Il était aussi inattendu que de si petites protéines (417-588 acides aminés et une de 972 acides aminés) pourraient avoir des fonctions multiples comme la liaison de deux sucres-UDP distincts, la liaison de deux espèces de HA donneurs ou accepteurs, le transfert de deux différents sucres avec deux différents types de liaison, la polymérisation de répétitions de sucres et le transfert de HA à travers la membrane (105).

Plusieurs isozymes des HA synthases sont codées par 3 à 4 gènes qui sont présents chez les chordés. On ne connaît pas le gène ancestral ou fondateur de HAS étant donné qu'aucun animal connu ne possède qu'un seul gène pour les HA synthases, mais il y a évidence de deux rondes de duplication des gènes (106). *Xenopus* possède trois gènes actifs et un pseudogène tandis que les souris et l'humain n'ont pas le pseudogène. Il existe trois isozymes des HA synthases chez les mammifères ; HAS-1, -2 et -3. Ces isozymes sont environ 55 à 70% identiques et sont plus de 90% identiques entre elles dans une même famille d'isozymes. Des études de développement chez des souris knock-out démontrent que HAS2 est essentiel, étant donné que les souris qui en sont déficientes meurent à l'âge de 10 jours à cause d'une anomalie dans le développement cardiaque, mais que HAS1 et HAS3 ont des rôles de moins grande importance (106, 107)

1.2.2. L'acide hyaluronique dans la matrice pérécillulaire

Plusieurs études ont été effectuées sur la structure et la formation de la matrice pérécillulaire. L'épaisseur d'une couche de HA excède souvent 20 µm, ce qui correspond environ à la longueur d'une seule chaîne de HA. Ceci permettrait de croire qu'il doit y avoir une façon d'étirer les chaînes de HA plutôt que de leur permettre de prendre une forme repliée (random coil) près de la surface cellulaire. Cette observation s'accorde avec le fait que la couche

péricellulaire de plusieurs cellules a besoin de protéoglycans causant l'agrégation tels que l'aggrecan ou le versican (108). Les forces de répulsion entre les sulfates de chondroïtine très chargés dans ces protéoglycans sont apparemment responsables de l'état perpendiculaire et étendu de HA à la surface cellulaire et résulte en la formation d'une couche épaisse, comme un manteau, autour de la cellule. Ces protéoglycans qui s'agrègent se lient à HA via le module Link dans le domaine globulaire G1 situé en N-terminal. Le module Link se retrouve dans les autres protéines se liant à HA telles que les protéines de liaison et CD44 (109). La présence de protéoglycans dans la matrice péricellulaire lui confère une grande densité de charges négatives fixes due aux nombreuses chaînes de sulfate de chondroïtine et peut avoir un effet important sur les propriétés matérielles et la perméabilité de la matrice. L'addition de protéoglycans augmente la viscosité des solutions de HA (110). La pression osmotique de la matrice péricellulaire est augmentée lorsque plus de protéoglycan est présent.

Plusieurs mécanismes différents de liens croisés de HA (cross-linking) ont été identifiés et ces mécanismes peuvent influencer l'assemblage et les propriétés matérielles de la matrice péricellulaire. Certaines études impliquent l'inhibiteur de trypsine inter alpha ($I\alpha I$) comme étant nécessaire pour la formation de couches autour de la cellule (111, 112), pour le maintien de l'intégrité de HA pendant l'expansion du cumulus (113) et pour potentialiser l'adhésion des leucocytes aux matrices riches en HA, entremise par CD44 (114, 115). Les chaînes lourdes des $I\alpha I$ sont transférées de la chaîne de sulfate de chondroïtine de $I\alpha I$ vers HA par une réaction de transestérification et la formation d'un lien covalent équivalent entre la chaîne lourde et HA (116) (figure 4). TSG-6 (produit de tumor necrosis factor-stimulated gene 6) est une autre protéine ayant un module Link qui sert à la liaison à HA et participe, avec d'autres protéines, à la formation de structures de HA inter reliées de plus grande complexité (figure 4) (117). TSG-6 peut agir comme un cofacteur dans le transfert des chaînes lourdes de $I\alpha I$ vers HA comme décrit précédemment. TSG-6 peut aussi former des complexes avec pentraxin 3 (PTX3) afin de relier

jusqu'à 20 chaînes de HA, formant ainsi un nœud dans la matrice extracellulaire (118). Des complexes de la sorte sont plus susceptibles d'être formés dans la matrice du cumulus et aux sites inflammatoires (118), et sont produits par les cellules endothéliales, les macrophages, les fibroblastes (119), et probablement d'autres cellules. La matrice péricellulaire dépendante de HA pourrait être impliquée directement ou indirectement dans l'assemblage des autres composants de la matrice extracellulaire, dans la prolifération et la migration des cellules et dans l'adhésion des cellules. C'est un régulateur multifonctionnel de l'adhésion, de la forme et du comportement des cellules (109).

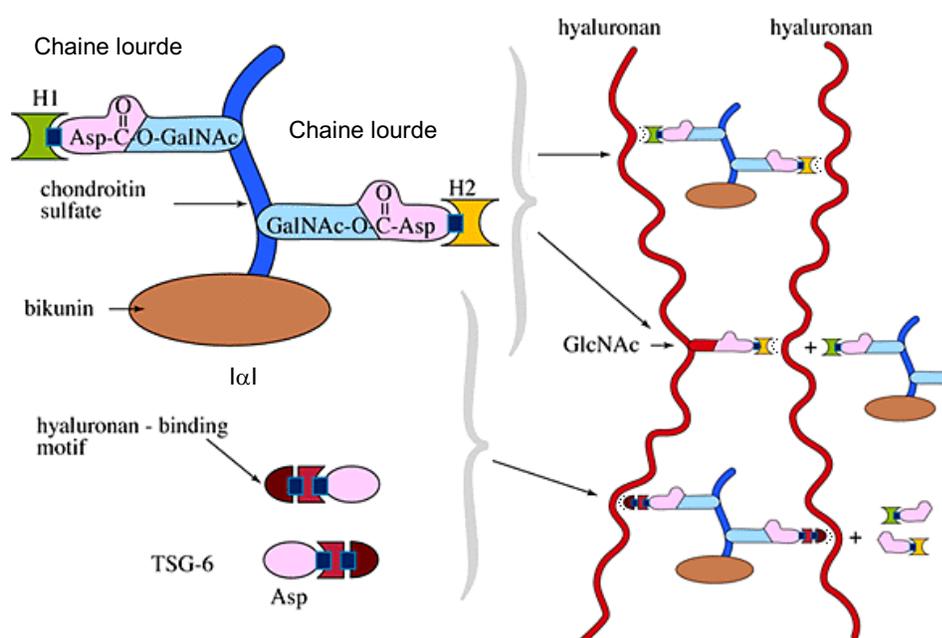


Figure 4: Modèle de l'interaction de I α 1 et de TSG-6 avec les chaînes d'acide hyaluronique dans la matrice extracellulaire.

Les chaînes lourdes de l'I α 1 sont liées de façon covalente à un résidu galactosamine de la chaîne de sulfate de chondroïtine par les liens esters entre les résidus C6-OH et l'acide aspartique (Asp). Les chaînes lourdes interagissent avec la chaîne de HA par une réaction de transestérification dans laquelle un résidu de glucosamine de HA va déplacer le résidu galactosamine de la chaîne de ChS. TSG-6 possède un motif de liaison à HA et peut aussi interagir avec l'I α 1 en déplaçant une de ses chaînes lourdes. Modifié à partir de www.glycoforum.gr.jp.

1.3. Les hyaluronidases

1.3.1. Classification

Les hyaluronidases sont un groupe d'enzymes distribuées à travers le règne animal. Au cours des dernières années, les hyaluronidases ont reçu de l'attention dû à leur fonction de régulation dans le métabolisme de l'acide hyaluronique. Karl Meyer a introduit le terme « hyaluronidase » afin d'identifier les enzymes qui dégradent HA. Il a classifié les hyaluronidases en trois différents groupes s'appuyant des analyses biochimiques et sur les produits générés (120). Ces trois groupes incluent : 1) les hyaluronidases des mammifères (E.C. 3.2.1.35) qui sont des endo- β -N-acetyl-hexosaminidases, 2) les hyaluronate-3-glycanohydrolases (E.C. 3.2.1.36) qui sont des endo- β -glucuronidases retrouvées dans la salive de la sangsue et de l'ankylostome (hook worm) (121) et 3) les hyaluronidases microbiennes.

Les hyaluronidases des mammifères clivent les liens glycosidiques β 1,4 dans HA, et à un moindre degré, dans la chondroïtine (Ch) et le sulfate de chondroïtine (ChS) afin de produire un nombre pair d'oligosaccharide (tetra- et hexa-) comme produits majeurs, avec *N*-acétyl-D-glucosamine à l'extrémité réductrice. Les enzymes de cette classe ont des activités hydrolytiques et des activités de transglycosidases, leur permettant de faire des liens croisés entre les chaînes d'acide hyaluronique avec la chondroïtine et le sulfate de chondroïtine (122), présents dans les spermatozoïdes des mammifères, dans les lysosomes, et dans le venin de serpent, de reptiles et d'insectes hyménoptères (123). De plus, les hyaluronidases sont aussi classées de façon élargie en deux groupes selon leur profil d'activité dépendant du pH. Les hyaluronidases actives en milieu acide sont actives à des pH entre 3 et 4, et ce groupe comprend les hyaluronidases du foie humain et du sérum. Les hyaluronidases actives à pH neutre sont actives à des pH entre 5 et 8 et incluent les hyaluronidases testiculaires, les hyaluronidases du venin de serpent et les hyaluronidases du venin d'abeille (124-126).

1.3.2. Structure génomique des hyaluronidases des mammifères

La dégradation enzymatique de HA chez les mammifères est réalisée par la coordination de l'activité de trois enzymes séparées, une hyaluronidase, un endoglycosidase et deux autres exoglycosidases qui enlèvent les sucres terminaux, une β -glucuronidase et une β -N-acetyl-hexosaminidase. La dégradation initiale accomplie par la hyaluronidase génère des oligosaccharides de différentes longueurs et ceux-ci sont les substrats pour les deux exoglycosidases (127). Les hyaluronidases des humains ont été étudiées et quelque unes d'entre elles sont bien caractérisées à partir d'un certain nombre de tissus (128, 129).

Il y a six séquences de type hyaluronidase dans le génome humain (130). Ces gènes de hyaluronidases sont aussi connus comme étant des gènes hyaluronoglucosaminidases (HYAL). Ces 6 gènes paralogues de HYAL partagent environ 40% d'identité entre eux. Par contre, l'expression de chaque gène a une distribution tissulaire unique. Ces gènes se retrouvent en groupes de trois à deux sites chromosomiques (voir figure 5), sur les chromosomes 3p21.3 (*HYAL1*, *HYAL2* et *HYAL3*) et 7q31.3 (*HYAL4*, *PH20/SPAM1* et *HYALP1*). *HYALP1* est un pseudogène chez l'humain. Hyal-1 et Hyal-2 sont les hyaluronidases les plus exprimées dans les tissus somatiques humains (131).

Chez la souris, par contre, on retrouve dans son génome 7 séquences de gènes de type hyaluronidase (figure 5) (132, 133). Six des sept gènes se retrouvent en groupes de trois à deux sites chromosomiques : *Hyal1*, *Hyal2* et *Hyal3* sont localisés sur le chromosome 9F1-F2 tandis que *Hyal4*, *Spam1/PH-20* et *Hyalp1* sont localisés sur le chromosome 6A2 (131, 134, 135). Le 7^e gène de type hyaluronidase retrouvé chez la souris, appelé *Hyal5*, est localisé à proximité du groupe sur le chromosome 6A2 (133, 136). *Hyalp1* et *Hyal-5* partagent une grande similarité de séquence avec les hyaluronidases biochimiquement caractérisées comme PH-20 et la hyaluronidase de venin d'abeille. À part le premier domaine très conservé en N-terminal, toutes les

hyaluronidases de mammifères possèdent un second domaine en C-terminal. Pour les hyaluronidases de type PH-20, un domaine d'ancrage GPI est requis en C-terminal afin de lier l'enzyme à la surface externe de la membrane plasmique (voir figure 6). (133)

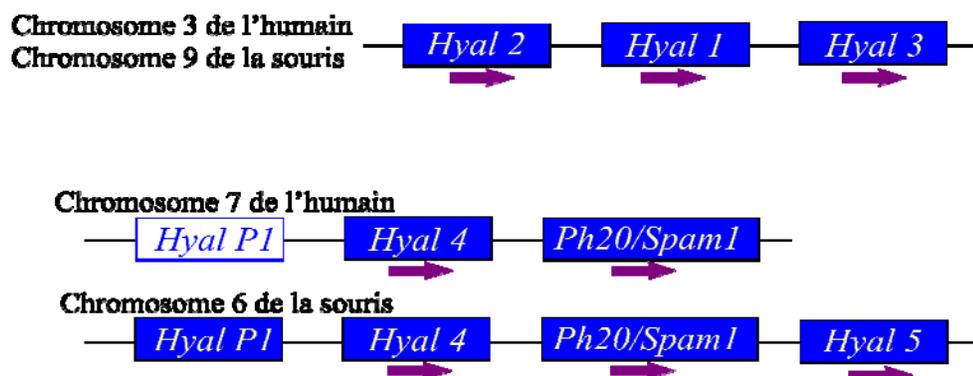


Figure 5 : Arrangement chromosomique des différents gènes de hyaluronidases chez l'humain et la souris.

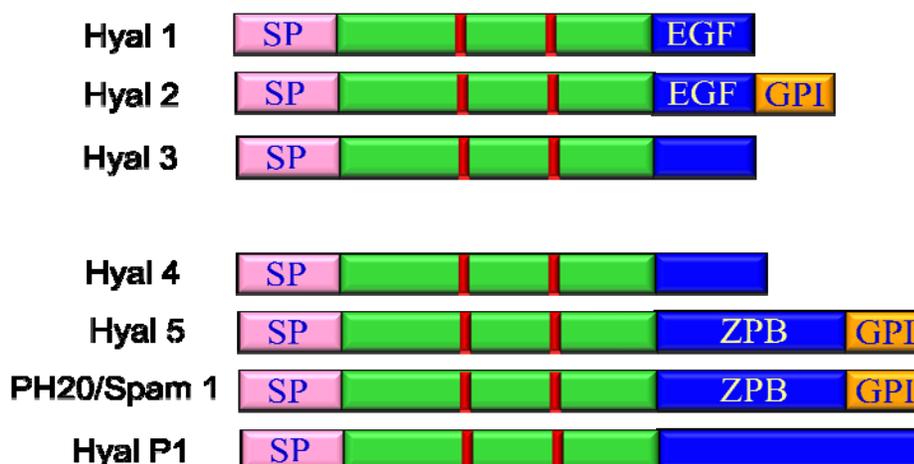


Figure 6 : Représentation des différents domaines protéiques des hyaluronidases.

Les rectangles rouges représentent les résidus catalytiques (Glu145 et Asp147, chez Hyal-1 de la souris) et les résidus importants pour la position du substrat (Tyr218, Tyr263 et Trp339). SP= peptide signal, EGF= similaire à l'épidermal growth factor, GPI= glycosylphosphatidil-inositol, ZPB= zona pellucida binding.

1.3.3. Distribution et caractéristiques des hyaluronidases des mammifères

La distribution tissulaire des enzymes hyaluronidases semble être reliée à leur localisation au niveau chromosomique. Hyal-1, Hyal-2 et Hyal-3 sont toutes trois regroupées sur le même chromosome et sont exprimées de façon ubiquitaire (dans tous les tissus), tandis que les 3 à 4 autres hyaluronidases sont regroupées sur le même chromosome (figure 5) et sont retrouvées principalement au niveau du système reproducteur mâle (voir tableau II) (130, 136-139).

Hyal-1 est la première hyaluronidase à avoir été isolée et caractérisée à partir du plasma humain (130, 140). C'est une glycoprotéine active à pH acide constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 57 kDa qui est aussi retrouvée sous une forme de 45 kDa modifiée post-traductionnellement par deux endoprotéases. Seule l'isoforme de plus haut poids moléculaire est présente dans la circulation, et les deux isoformes sont retrouvées dans l'urine, dans des extraits de tissus et dans les cellules en culture (141). Les plus hauts niveaux d'ARNm de *HYAL1* sont retrouvés dans les organes parenchymateux tels que le foie, le rein, la rate et le cœur. Hyal-1 peut prendre des fragments de HA de n'importe quelle taille comme substrat et génère de façon prédominante des fragments de tétrasaccharides et d'hexasaccharides. Le gène orthologue chez la souris fut également cloné et exprimé (141) et est 73% identique à la séquence de l'humain (126, 142). La structure cristallographique de Hyal-1 de l'humain montre que c'est une molécule composée de deux domaines intimement associés : un domaine catalytique en forme de tonneau (α/β)₈ triose phosphate isomérase (TIM) tordu ressemblant à celui de l'hyaluronidase de venin d'abeille, et un domaine EGF-like, caractéristique d'une implication dans des interactions protéine-protéine et dans des processus de régulation. La structure montre que le repliement de ce domaine EGF unique est intact dans quatre variants d'épissages de Hyal-1, tandis que le domaine catalytique est plus probablement sous forme dépliée (143).

Hyal-2, aussi active à pH acide, est ancrée dans la membrane plasmique par un lien glycosylphosphatidyl-inositol (GPI) (144, 145). Hyal-2 existe aussi sous forme soluble. Hyal-2 clive le HA de haut poids moléculaire en fragments de taille intermédiaire d'environ 20 kDa. Hyal-1 et Hyal-2 ont des structures similaires mais produisent des produits de réaction différents. Hyal-2 est considérée comme étant l'hyaluronidase la plus importante entre les deux étant donné que les souris déficientes de cette enzyme sont non viables (144) tandis que les souris déficientes de Hyal-1 sont viables (146). Hyal-2 est aussi un récepteur pour le rétrovirus de Jaagsiekte du mouton (JSRV) (147) et pour le virus de la tumeur nasale enzootique (ENTV) (148). Hyal-2 de l'humain se lie aux protéines de l'enveloppe de ces virus et sert de récepteur fonctionnel. Hyal-2 de la souris, par contre, ne se lie pas aux protéines de l'enveloppe de ces virus et ne favorise pas leur entrée non plus (149).

Hyal-3 est exprimée dans plusieurs tissus, mais aucune activité ne peut être détectée en utilisant les méthodes de détection d'activité hyaluronidase (131). On la retrouve dans les chondrocytes, les testicules et la moelle osseuse et son expression augmente lorsque les fibroblastes se différencient en chondrocytes (150, 151). L'expression de Hyal-3 et Hyal-2 est régulée à la hausse par les cytokines inflammatoires comme IL-1 (interleukine-1) et TNF- α (tumor necrosis factor-alpha), tandis que Hyal-1 ne l'est pas (150).

Hyal-4, retrouvée sur le chromosome 7q31.3, semble être une chondroïtinase n'ayant pas d'activité envers HA (données non publiées). C'est la première chondroïtinase à être identifiée dans les tissus des vertébrés. Il n'est pas surprenant de retrouver une activité de chondroïtinase dans cette famille d'enzyme étant donné que Hyal-1 et PH-20 ont toutes les deux la capacité de cliver ChS (sulfate de chondroïtine) à un moindre degré que HA. ChS ressemble à HA, la seule différence entre les deux étant que le *N*-acetylglucosamine du HA est remplacé par un *N*-acetyl-galactosamine dans ChS. La séquence en acides aminés de Hyal-4 de l'humain et celle de la souris ont 77% d'identité (131).

Parmi les hyaluronidases des mammifères, les hyaluronidases des testicules sont très bien étudiées et caractérisées. La protéine PH-20, retrouvée au niveau du chromosome 7q31 chez l'humain et 6A2 chez la souris, est la protéine de la membrane du spermatozoïde la plus conservée chez les mammifères (152). PH-20, ou encore SPAM-1, est une hyaluronidase avec un ancrage GPI située sur le spermatozoïde des mammifères. PH-20 est localisée à la surface du spermatozoïde et dans l'acrosome dérivé du lysosome, où elle est liée à la membrane interne acrosomale. PH-20 facilite la pénétration du spermatozoïde à travers la MEC du cumulus et la zona pellicida de l'ovule, et est aussi nécessaire pour la fécondation (153, 154). PH-20 est unique en son genre parmi les hyaluronidases car elle montre une activité enzymatique à pH acide de même qu'à pH neutre et que ces activités semblent impliquer deux domaines différents dans cette protéine (153, 155, 156).

Comme PH-20, les deux autres gènes retrouvés sur ce regroupement chromosomique chez l'humain, *HYALP1* et *HYAL4*, sont abondamment exprimés dans les testicules. Par contre, étant donné que Hyal-4 est une chondroïtinase sans activité hyaluronidase et que *Hyalp1* est un pseudogène, PH-20 est la seule hyaluronidase fonctionnelle au niveau du chromosome 7q31, soulignant donc son importance dans la fécondation humaine. Chez la souris, par contre, le gène *Hyalp1* donne lieu à une protéine et le gène de la 7^e hyaluronidase, *Hyal5*, est présent sur le chromosome 6A2 (130) et ces deux protéines sont présentes dans le sperme murin (135) et ont des rôles similaires à la PH-20 dans la fécondation (132). Hyal-5 est une simple chaîne d'hyaluronidase présente sur la membrane plasmique et acrosomale du spermatozoïde probablement par ancrage GPI. Des études de zymographie de HA ont démontré que cette enzyme est active à pH 5-7 et inactive à pH 3-4 (136).

Tableau II : Caractéristiques des différentes hyaluronidases.

Nom	Tissu	Localisation cellulaire	pH optimum	Fragments	Fonction
Hyal-1	Tous	Lysosomes, sécrétée	Acide	Petits	Métabolisme de HA
Hyal-2	Tous	Membrane plasmique, lysosomes, sécrétée	Acide, neutre	20 kDa	Métabolisme de HA, récepteur à virus
Hyal-3	Tous	Lysosomes	?	?	Différenciation des chondrocytes
Hyal-4	Placenta, muscle squelettique	?	?	?	Métabolisme de ChS
Hyal-5	Testicules	Acrosome, membrane plasmique du spermatozoïde	Neutre	Petits	Dispersion du cumulus, liaison à la zona pellucida
PH-20/ Spam1	Appareil reproducteur mâle	Acrosome, membrane plasmique du spermatozoïde, sécrété	Neutre	Petits	Dispersion du cumulus, liaison à la zona pellucida, efflux de calcium au sperme
Hyalp1	Testicules	Membrane plasmique du spermatozoïde	Neutre	Petits	Dispersion du cumulus

1.3.4. Fragments de HA générés par les hyaluronidases

Les hyaluronidases des vertébrés peuvent générer une variété d'oligomères d'acide hyaluronique ayant une vaste gamme d'activités biologiques relatives à leurs tailles (129). Le substrat de haut poids moléculaire, HA, est un antiangiogénique (157) et un immunosuppresseur (158, 159). Le

produit de la digestion par la Hyal-2 humaine, un fragment de 20 kDa (voir figure 7), est hautement angiogénique (160) et inflammatoire (161), induit la transcription de métalloprotéinases de la matrice (162), et stimule la reconnaissance vasculaire endothéliale de blessures (163). La Hyal-1 humaine digère les oligomères de HA en fragments de bas poids moléculaire (voir figure 7) qui sont immunostimulants, qui participent à l'oncogénèse, et qui sont dégradés en tétrasaccharides. Même ces petits produits de digestion ont une activité biologique en étant antiapoptotiques et inducteurs de protéines de choc thermique (164). Les tétrasaccharides sont probablement clivés en plus petits fragments par les β -exoglycosidases. Les exoglycosidases, β -glucuronidase et *N*-acetyl-D-glucosaminidase participent à la dégradation à un degré plus élevé. Ce sont les monosaccharides qui ont la possibilité de sortir du lysosome pour participer à d'autres voies métaboliques.

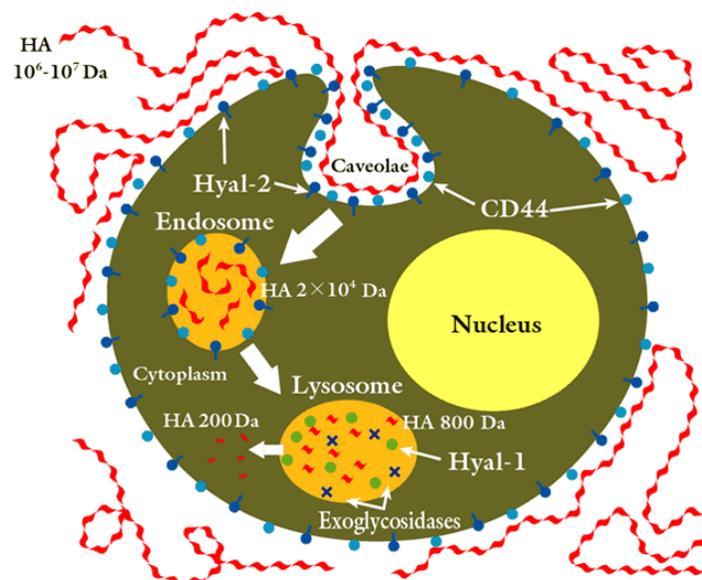


Figure 7 : Schéma de la dégradation de HA.

La chaîne de HA de haut poids moléculaire est prise en charge par la cellule par le récepteur CD44 et Hyal-2. Hyal-2 clive le HA de haut poids moléculaire en fragments de taille intermédiaire d'environ 20 kDa. Aux lysosomes, Hyal-1 génère de façon prédominante des fragments de tétrasaccharides et d'hexasaccharides. Ces fragments sont ensuite digérés en fragments plus petits par des exoglycosidases. Tiré de www.glycoforum.gr.jp.

1.3.5. Modèles de souris déficientes des enzymes hyaluronidases

Afin de définir les fonctions des différentes hyaluronidases, quelques modèles de souris déficientes et des expériences d'inactivation des hyaluronidases ont été effectuées.

Malgré l'absence de PH-20 dans le sperme, les souris mâles déficientes de PH-20 (PH20 *-/-*) étaient toujours fertiles (134). Des essais de fécondation *in vitro* ont démontré que les spermatozoïdes de souris déficients de PH-20 avaient une moins grande capacité à disperser les cellules cumulus dans la masse de cumulus, résultant ainsi en une fécondation retardée. De plus, des analyses en SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) d'extraits de spermatozoïdes suivies d'immunobuvardages de type Western ont démontré la présence d'autres hyaluronidases à l'intérieur de l'acrosome du spermatozoïde de la souris. Ces données démontrent que PH-20 n'est pas essentielle pour la fécondation, du moins chez la souris, et suggèrent que d'autres hyaluronidases pourraient jouer un rôle important dans la pénétration du spermatozoïde à travers le COC et/ou la zona pellucida possiblement en coopération avec PH-20 (134).

Hyalp1 est localisée aussi au niveau du spermatozoïde et des études plus récentes ont démontré que l'inhibition de cette protéine avec un anticorps retardait significativement le taux de pénétration dans le cumulus *in vitro* du spermatozoïde sauvage. Les spermatozoïdes de souris déficientes de PH-20 dont on a inactivé Hyalp1 avec un anticorps étaient encore plus sévèrement retardés dans la pénétration du cumulus, suggérant ainsi une régulation à la hausse de Hyalp1 chez ces souris déficientes de PH-20. Ceci suggère que Hyalp1 a une fonction redondante avec PH-20 et pourrait compenser pour la délétion de PH-20 chez les souris (132).

De plus, une protéine de 55 kDa capable d'hydrolyser HA était abondamment présente chez les spermatozoïdes de souris sauvages et chez les souris déficientes de PH-20 et a été purifiée à partir d'extraits protéiques solubles provenant de sperme de l'épididyme et a été identifiée comme étant

Hyal-5. Les spermatozoïdes de souris déficientes de PH-20 ainsi que des extraits protéiques déficients de PH-20 enrichis de Hyal-5 étaient tous les deux capables de disperser les cellules cumulus de la masse cumulus. La dispersion du cumulus était fortement inhibée par la présence d'un inhibiteur de hyaluronidase, l'apigénine. Ces résultats suggèrent donc que chez la souris, Hyal-5 joue un rôle important dans la pénétration du spermatozoïde à travers la masse de cumulus. Les auteurs suggèrent donc que Hyal-5 pourrait compenser en partie pour les rôles fonctionnels de PH-20 (136).

Par contre, des études effectuées avec PH-20, Hyal-5 et Hyalp1 de la souris exprimées dans les ovocytes de *Xenopus laevis* de façon recombinante ont démontré que PH-20 et Hyal-5, mais pas Hyalp1, ont une activité hyaluronidase à pH neutre (133). Hyalp1 et Hyal-5 sont donc des candidats pour la compensation chez les souris déficientes de PH-20, surtout à cause d'une forte homologie et similarité de séquences avec PH-20 (135). De plus, les translocations Robertsoniennes Rb (6.16) et Rb (6.15), qui sont reconnues pour affecter des mutations ponctuelles de PH-20 et pour être associées à une dysfonction du spermatozoïde chez les homozygotes, affectent également des mutations dans Hyalp1 et Hyal-5 (135). Les tentatives de surexpression de PH-20 chez les souris se sont avérées être un échec général car ces souris ne démontraient pas une surexpression de l'ARN ou des protéines au niveau des testicules. Par contre, cet échec n'était pas dû à l'intégration du transgène mais à une régulation post-traductionnelle de *PH20*. Les auteurs ont décidé de regarder le niveau d'expression de Hyal-5 chez ces souris transgéniques et, de façon similaire à *PH20*, aucune des lignées transgéniques montraient une augmentation de l'expression de l'ARNm de *Hyal5* suggérant ainsi un contrôle de la régulation des hyaluronidases situées sur le chromosome 6A2 de la souris (165).

Des études récentes effectuées chez la souris déficiente de Hyal-1 (146) démontrent que cette souris a des signes d'une pathologie de stockage lysosomal appelé mucopolysaccharidose IX mais avec un phénotype moins

sévère que chez les patients atteints de cette maladie (166). Les animaux étaient viables, fertiles et ne démontraient pas d'anomalies. Des études histologiques démontraient, par contre, une perte de protéoglycans au niveau du genou à partir de l'âge de 3 mois qui progressait avec l'âge. Un nombre grandissant de chondrocytes montrant des marquages intenses pour HA au niveau péricellulaire et cytoplasmique ont été détectés dans les cartilages des articulations et de l'épiphyse chez ces souris déficientes, démontrant une accumulation de HA. Des élévations de HA n'ont pas été détectées dans le sérum ou dans les tissus non-squelettiques indiquant ainsi que l'ostéoarthrite est la maladie caractéristique de la perte de Hyal-1. L'expression du gène de *Hyal3* était plus élevée chez les souris déficientes de Hyal-1, suggérant ainsi une compensation possible par Hyal-3 dans la dégradation de HA dans les tissus non-squelettiques (146).

Des études récentes avec les souris déficientes de Hyal-3 ont démontré que les souris sont viables, fertiles et ne montraient pas de changements flagrants. Les analyses par rayons X, les études histologiques, le poids corporel, la masse des organes et le niveau de HA sérique étaient tous normaux chez les souris Hyal-3 *-/-*. Il n'y avait pas d'évidence d'accumulation de glycosaminoglycans dans les tissus analysés. La seule différence identifiée chez ces souris était un subtil changement dans la structure alvéolaire et l'épaisseur de la MEC dans les coupes de tissus de poumons chez les souris âgées de 12 à 14 mois. La conclusion de cette étude est donc que Hyal-3 ne joue pas un rôle majeur dans la dégradation de HA (167).

1.4. Notre étude sur les rôles des hyaluronidases dans l'ovaire

Dans les ovaires, la présence de Hyal-1, -2 et -3 a été démontrée par immunobuvardage de type Northern et par RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) (130, 136). Par contre, leur localisation précise de même que leur rôle dans la fonction ovarienne n'ont jamais été étudiés. De plus, étant donné qu'il n'y a pas d'anticorps disponibles contre ces enzymes, il

n'est pas possible d'analyser ces protéines par immunobuvardage de type Western. Les études *in vitro* effectuées sur la fonction des enzymes hyaluronidases étaient déjà en marche lors de mon arrivée au laboratoire de Dre Carmona. Parallèlement à mon projet de maîtrise, j'ai aussi participé à ce projet en effectuant de la culture de cellules de la granulosa et des transfections transitoires de Hyal-1, -2 et -3 fusionnées à GFP et ces cellules ont ensuite servi aux expériences démontrées dans les figures 5, 6 et 7 de l'article publié par notre laboratoire et dont je suis la 2^e auteure. Nous avons récemment démontré que ces enzymes induisent l'apoptose des cellules de la granulosa ovariennes et qu'elles sont impliquées dans l'atrésie des follicules. (168) (Orimoto, A. M., **Dumaresq-Doiron, K.**, Jiang, J. Y., Tanphaichitr, N., Tsang, B. K., and Carmona, E. (2008) Mammalian hyaluronidase induces ovarian granulosa cell apoptosis and is involved in follicular atresia, *Endocrinology* 149, 5835-5847.)

En utilisant un modèle d'induction de l'atrésie, par retrait des gonadotropines en injectant l'anticorps anti-eCG à des souris, nous avons démontré que les cellules de la granulosa avaient un nombre significativement plus élevé d'apoptose comparativement au groupe contrôle n'ayant pas reçu l'injection de l'anticorps. De la même façon, la morphologie des ovaires de ces souris démontrait une augmentation du niveau de follicules en atrésie et une diminution du nombre de follicules antraux en santé par rapport au groupe contrôle n'ayant pas reçu l'anticorps (168).

De ces cellules de la granulosa apoptotiques, le niveau d'ARNm de *Hyal1*, *Hyal2* et *Hyal3* dans l'ovaire a été analysé par RT-PCR en temps réel et par hybridation *in situ*. Les résultats ont démontré que les niveaux d'expression de Hyal-1, Hyal-2 et de Hyal-3 étaient significativement plus élevés que dans le groupe contrôle. Pour ce qui est de l'hybridation *in situ*, l'expérience a démontré qu'il y avait une localisation de l'expression des trois hyaluronidases préférentiellement dans les petits follicules antraux, mais aussi dans les grands follicules antraux de souris ayant reçu l'injection de l'anticorps anti-eCG et que

cette localisation coïncide avec l'augmentation de nombre de follicules atériques dans ce groupe de souris (168).

Dans une situation physiologique, on sait que l'atésie se passe dans les petits follicules antraux qui commencent à entrer dans le processus de différenciation des cellules de la granulosa (4, 169, 170). Les gonadotropines sont aussi reconnues pour empêcher l'apoptose dans les ovaires (169, 171, 172). Il serait donc plausible de penser que des follicules antraux atériques seraient en plus grande abondance chez les souris immatures que chez les souris matures. Les études effectuées avec des souris immatures âgées de 3 semaines et avec des souris matures âgées de 7 semaines ont montré que les cellules de la granulosa collectées chez les souris de 3 semaines avaient un niveau d'apoptose plus élevé que les cellules collectées chez les souris de 7 semaines. En se servant de cette situation physiologique, il a été démontré, par hybridation *in situ* et par le niveau de protéines dans le lysat cellulaire, que le niveau d'ARNm de *Hyal1* était plus élevé chez les souris âgées de 3 semaines comparé aux souris de 7 semaines. Le niveau d'expression de la protéine caspase-3, un effecteur de l'apoptose, a aussi été évalué et les résultats démontrent qu'il y a aussi une augmentation du niveau de cette protéine chez les souris immatures par rapport aux souris matures (168).

On peut donc conclure que les souris du modèle d'induction d'atésie et les souris normales démontrent une expression des hyaluronidases intimement reliée avec l'atésie des follicules et l'apoptose des cellules de la granulosa. En plus, des transfections transitoires des différentes Hyal fusionnées à EGFP (green fluorescent protein) dans des cultures primaires de cellules de la granulosa ont démontré que les trois hyaluronidases induisent l'apoptose des cellules de la granulosa en culture. Afin de déterminer si cette induction d'apoptose par les hyaluronidases était due à leur activité enzymatique, des mutations au site catalytique de Hyal-1 ont été effectuées (Asp157 et Glu 159 ont été remplacés par une alanine). Ce mutant de Hyal-1 était exempt de toute activité enzymatique envers HA comparé à Hyal-1 de type sauvage. Ce mutant

de Hyal-1 a été capable d'induire l'apoptose des cellules de la granulosa. Ce résultat, mis ensemble avec le fait que Hyal-3 ne possède aucune activité enzymatique, laisse croire que le métabolisme de HA ou l'activité enzymatique des hyaluronidases ne sont pas impliqués dans l'apoptose des cellules de la granulosa (168).

Les expériences effectuées afin d'élucider le mécanisme par lequel cette apoptose se produit ont démontré que ce n'est pas la voie intrinsèque d'apoptose qui est utilisée mais la voie extrinsèque impliquant caspase-8, caspase-3 et PARP (poly-ADP-ribose-polymerase) comme le démontrait l'augmentation des niveaux de produits clivés dans les cellules transfectées avec Hyal-1, Hyal-3 et Hyal-1 mutant comparativement au contrôle transfecté avec EGFP seulement (168).

1.5. Objectifs du projet de recherche

Suite à ces résultats, un modèle de souris déficiente des enzymes hyaluronidases devenait intéressant afin de voir le rôle de ces enzymes *in vivo*. Les souris déficientes de Hyal-3 et les souris déficientes de Hyal-1 étant disponibles, nous avons décidé de démarrer un projet avec ces modèles *in vivo*.

Notre hypothèse était que les souris déficientes des enzymes hyaluronidases auraient une moins grande apoptose et atrophie de leurs follicules ovariens et une possible augmentation de la folliculogénèse comparativement aux souris sauvages.

Un des objectifs de ma maîtrise était **d'évaluer les niveaux d'apoptose et de folliculogénèse chez les souris déficientes de Hyal-3 ou de Hyal-1.**

Étant donné que la souris déficiente de Hyal-2 n'est pas viable (144), il est donc impossible de faire des études de folliculogénèse et d'apoptose avec un tel modèle. Afin d'étudier la fonction des trois hyaluronidases, Hyal-1, Hyal-2 et Hyal-3, sans avoir d'effet compensatoire entre elles, nous avons décidé de

générer une souris déficiente des trois hyaluronidases spécifiquement dans les ovaires. Pour ce faire, nous allons utiliser le système Cre/loxP afin d'enlever la séquence comprenant les trois gènes sur le chromosome 9 de la souris. La création de cette souris se fera en deux étapes : premièrement, la création d'une souris exprimant la *Cre* sous le contrôle d'un promoteur spécifique aux gonades, *Inhibin- α* , et deuxièmement, la création d'une souris ayant deux séquences *lox P* bordant la région chromosomique que l'on veut enlever. Les gènes de ces trois enzymes étant localisés sur le même chromosome de façon consécutive dans une région d'environ 20 kb seulement rend possible la délétion entière de cette région chromosomique par le système Cre/loxP (figure 8). Le système Cre/loxP est une méthode utilisée pour enlever un fragment spécifique d'ADN. Lorsque l'enzyme Cre se lie à deux séquences d'ADN spécifiques, appelées *lox P*, bordant la région d'ADN cible, elle coupe ces sites à la moitié et colle ensemble les deux autres moitiés restantes lorsque le fragment d'ADN cible est enlevé (173).



Figure 8. Stratégie pour la délétion de Hyal-1, Hyal-2 et Hyal-3.

Représentation de la région du chromosome 9 chez la souris contenant dans l'ordre les séquences *Hyal-2*, *Hyal-1* et *Hyal-3*. Les séquences *loxP* sont représentées par les triangles verts.

Mon deuxième objectif était donc de **créer un vecteur contenant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur *Inhibin α*** qui conduit l'expression des gènes en aval chez les cellules somatiques des gonades (174).

2. Matériel et méthodes

2.1. Animaux :

Les soins et l'utilisation des animaux ont répondu à toutes les exigences légales, gouvernementales ou municipales et à tous les règlements internes de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont ou du Centre de recherche de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont selon le Comité de protection des animaux. Les souris utilisées sont des chimères qui ont été croisées sur au moins 6 à 8 générations. Les souris déficientes de Hyal-3 nous ont été données grâce à la collaboration de Dr. Barbara Triggs-Raine (University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada) et ont été faites à partir des cellules souches de C129 inoculées dans les souris CD1 (167). Les souris déficientes de Hyal-1 ont été achetées de « Mutant Mouse Regional Resource Center » (California, É.U.) et proviennent des souris B6 qui ont été inoculées avec les cellules souches de C129. (146) Les accouplements ont été faits à l'animalerie du centre de recherche. Les types d'accouplements effectués étaient parents hétérozygotes pour l'histologie et l'analyse d'expression et parents homozygotes +/+ ou -/- pour l'induction de l'atrésie et de l'ovulation.

2.2. Détermination du génotype des souris déficientes de Hyal-3 et Hyal-1 :

2.2.1. Extraction de l'ADN génomique des queues de souris

Une biopsie de la queue de souris d'environ 0.5 à 1.0 cm a été incubée à 55°C pour la nuit dans 500 µL de solution de digestion (Tris-HCL 10 mM pH 8.0, EDTA 5 mM, SDS 1%, NaOAc 0.3M) et Protéinase K 200 µg/mL (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). 500 µL de Ultra Pure Buffer-Saturated Phenol (Invitrogen) a été ajouté aux échantillons et agité pendant 5 minutes par inversion. 400 µL de chloroforme (EMD, Gibbstown, NJ, É.U.) a été ajouté et les échantillons ont été mélangés par inversion pendant 5 min. Les tubes ont été centrifugés pendant 5 min à 10 000 g. La phase supérieure aqueuse (environ 500 µL) a été transférée dans un nouveau tube. 1 mL d'EtOH 95% a

été ajouté aux tubes qui ont ensuite été mélangés par inversion et centrifugés pendant 5 min à 10 000 *g*. Le surnageant a été décanté et 1 mL d'EtOH 70% a été ajouté doucement à chaque tube. Les tubes ont été centrifugés pendant 5 min à 10 000 *g* et le surnageant a été décanté. Le culot a été séché à l'air libre 10-15 min et dissous dans 50 µL de Tris-HCl 10 mM pH 8.0. L'ADN a été conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

2.2.2. Analyse du génotype par réaction de polymérase en chaîne (PCR)

La détermination du génotype des souris déficientes de Hyal-3 et Hyal-1 a été faite par PCR à partir de l'ADN génomique extrait à partir de biopsie de queue de la souris (voir item 2.2.1.). Pour chaque réaction, nous avons utilisé : 0.5 µL dNTP 10 mM (Invitrogen), 10 pmol de chaque amorces (voir tableau III), 50 mM MgCl₂ (pour Hyal-3 seulement), 0.25 µL de Taq Polymerase 5000 U/mL (New England Biolabs (NEB), Pickering, ON, Canada) avec 2.5 µL de son Tampon 10X et 1 µL d'ADN génomique de souris dilué 10 à 20 fois, le tout dans un volume total de 25 µL.

Le programme pour la réaction de PCR pour la détermination du génotype des souris Hyal-3 était le suivant:

94°C 10 min, (94°C 1 min, 63°C 1 min, 72°C 2 min) 35x, 72°C 10 min.

Le programme pour la réaction de PCR pour la détermination du génotype des souris Hyal-1 était le suivant:

94°C 5 min, (94°C 30 sec, 62°C 30 sec, 72°C 45 sec) 30x, 72°C 7 min.

L'analyse des produits de PCR a été faite par électrophorèse sur gel d'agarose 1% pour Hyal-3 et 2% pour Hyal-1. Dans les deux cas, si les deux bandes sont observées (sauvage et neo), les souris sont hétérozygotes; si on n'observe qu'une seule des deux bandes sauvage ou neo, les souris sont donc homozygotes sauvage ou « knockout » respectivement.

Tableau III. Séquences des différents oligonucléotides utilisés comme amorces et la taille attendue de chaque produit pour les différentes amplifications par PCR et PCR en temps réel.

Nom	Séquence 5' → 3'	Taille du fragment
Génotype des souris Hyal-3		
Hyal-3 Exon 2 F*	GGTCTCCATCTCTGTGGCAT	500 pb
Hyal-3 Exon 2 R*	GCAGCCTGCTCAAAGCTAGT	
Hyal-3 Neo F	TGGCTACCCGTGATATTGCT	1 kb
Hyal-3 Exon 2 R	GAGGCTGCCAGGTAGACTTGTG	
Génotype des souris Hyal-1		
Hyal-1 Exon 2 F	CTGGGACAGCAAGGACATTT	340 pb
Hyal-1 Exon 2 R	CAGTGCTGCAGGCAAATAAA	
Hyal-1 Neo F	CTTGGGTGGAGAGAGGCTATTC	270 pb
Hyal-1 Neo R	AGGTGAGATGACAGGAGATC	
PCR en temps réel		
Hyal-1 Real F	GCTCAGACAAAACAAGTACCAAGGA	169 pb
Hyal-1 Real R	GAGAGCCTCAGGATAACTTGGATG	
Hyal-2 Real F	CTTATCTCTACCATCGGTGAGAGTG	123 pb
Hyal-2 Real R	GCAGCTGAGTTAGGTAATTCTTGAG	
β-actin Real F	ATCGTGGGCCGCCCTAGGCACCA	148 pb
β-actin Real R	TCCATGTTCGTCCCAGTTGGTAACAA	
Clonage		
CRE Trans F	CACAGACATCTGCGTCAGAGATAGG	686 pb
CRE Trans R	CTGTTTTGCACGTTACCGGCATC	
Inh screen F	GCTCATTACTCTGGAGCTG	742 pb
Inh screen R	GCCACTTATCCATCAGTATC	

*F= forward, R= reverse

2.3. Histologie des ovaires

Les ovaires de souris déficientes de Hyal-3 ou Hyal-1 provenant de parents hétérozygotes ont été prélevés à différents âges, soit 4 semaines, 6 semaines, 6 mois et 1 an et immédiatement incubés dans la solution fixative Bouin (LabChem Inc, Pittsburgh, PA, É.U.) pendant 4 heures à température pièce et ensuite conservé dans EtOH 70% à 4°C jusqu'à leur inclusion dans la paraffine. L'inclusion des ovaires dans la paraffine a été faite par incubations successives de 45 minutes chacune dans les diverses solutions suivantes : EtOH 80%, EtOH 95%, EtOH 100% (3 solutions différentes) (Surgipath Canada, Winnipeg, MB, Canada), Xylène (2 solutions différentes) (Surgipath Canada) et paraffine liquide à 56-60°C (3 solutions différentes) (Surgipath Canada). Les ovaires ont ensuite été mis en bloc de paraffine à l'aide d'un moule dans lequel on a coulé de la paraffine liquide avec l'ovaire en place et le moule a ensuite été refroidi sur glace. Les ovaires en bloc de paraffine ont été coupés au complet à chaque 5 µm et mis sur lame de microscope (Surgipath Canada). Les lames ont été colorées à l'hématoxyline-éosine par le département de Pathologie de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont (Montréal, QC, Canada). L'observation des coupes a été effectuée à chaque 10 coupes d'ovaires à partir de la 5^e coupe et les follicules ont été dénombrés selon le type de follicule : primordial, primaire, secondaire, antral et atrétique (voir figure 9). Seuls les follicules montrant un noyau ont été comptés afin d'éviter de compter le même follicule plus d'une fois.

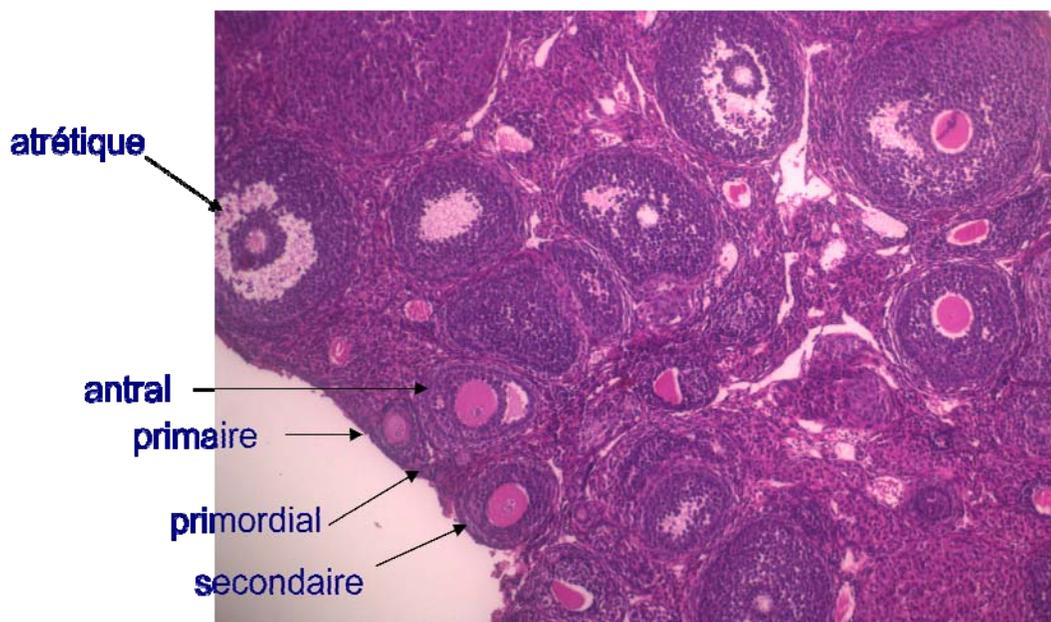


Figure 9. Photographie d'une coupe d'ovaire de souris représentant les différents types de follicules ovariens.

2.4. Induction de l'atrésie

La méthode utilisée pour cette expérience est une adaptation de celle effectuée chez le rat par Dr Tsang (175) et que nous avons récemment décrite (168). Les souris immatures +/+ et -/-, provenant de parents homozygotes, âgées de 19 jours dans le cas des souris déficientes de Hyal-3 et âgées de 21 jours pour celles déficientes de Hyal-1, ont été injectées avec 2.5 U de eCG (PMSG) (Sigma Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada) au temps 0 et injectées avec l'anticorps anti-eCG dilué 100 fois au temps 24h et sacrifiées au temps 48h. Le groupe contrôle n'a pas été injecté avec l'anticorps. Les ovaires ont été prélevés et incubés dans un milieu de culture contenant du FBS 10% (Invitrogen), pénicilline-streptomycine 0.5 % (Invitrogen), amphotéricine 0.25% (Invitrogen), Hesper 1M 1% (Invitrogen) et RPMI 1640 avec L-Glutamine (Invitrogen), pour ensuite procéder à la récolte des cellules de la granulosa.

2.4.1. Récolte des cellules de la granulosa

Les cellules de la granulosa des ovaires ont été récoltées individuellement en piquant les ovaires à l'aide de seringues de 1 mL avec aiguille de calibre 28½ G. La solution de milieu contenant l'ovaire et les cellules de la granulosa a été remise dans le tube pendant 3 min de sorte à permettre aux débris de se déposer au fond et le surnageant contenant les cellules de la granulosa a été transféré dans un nouveau tube et centrifugé pendant 1 min à 10 000 rpm. Le culot a été lavé avec 200 µL de PBS (pH 7.4, Invitrogen) stérile, centrifugé pendant 1 min à 10 000 rpm. Les cellules de la granulosa ont été fixées dans 100 µL de Formaline 10% (ACP Chemicals, Montréal, QC, Canada) et conservé à 4°C jusqu'à l'analyse de l'apoptose.

2.4.2. Évaluation du niveau d'apoptose des cellules de la granulosa

L'échantillon de cellules de la granulosa a été centrifugé pendant 1 min à 10 000 rpm, le culot a été resuspendu dans 44 µL de la solution de Hoechst 33258 (Sigma, 62.5 ng/µL) dans la formaline 10% et 11 µL a été appliqué sur une lame de microscope et observé au microscope à fluorescence (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Pour chaque échantillon, 1000 cellules au total, normales et apoptotiques, ont été comptées au hasard sur une surface recouvrant la majorité de la lame.

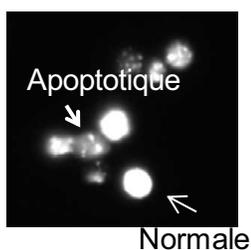


Figure 10. Photographie de cellules de la granulosa marquées au Hoechst.

Les cellules normales sont représentées par un noyau rond et uniforme et les cellules apoptotiques ont un noyau fragmenté.

2.5. Induction de l'ovulation

Les souris immatures +/+ et -/-, provenant de parents homozygotes, âgées de 19 jours pour la lignée déficiente de Hyal-3 et âgées de 21 jours pour la lignée déficiente de Hyal-1 ont été injectées avec 5 U de eCG au temps 0 et injectées avec 5 U de hCG au temps 47h et sacrifiées au temps 67h. L'ampoule de l'oviducte des souris a été prélevée et conservée dans le milieu MEM (Minimum Essential Medium) avec Earle's Salts et L-Glutamine contenant un supplément de BSA 0.3 % (Invitrogen). De cette ampoule, le complexe ovocyte-cumulus (COC) a été collecté et traité avec une hyaluronidase bovine (embryo tested) (Sigma Aldrich Canada) jusqu'à la dissociation du COC. Les ovocytes ont ensuite été prélevés et comptés.

2.6. Analyse d'expression

2.6.1. Extraction de l'ARN

Les ovaires des souris déficientes de Hyal-3 provenant de parents hétérozygotes ont été prélevés à différents âges, soit 4 semaines, 6 semaines, 6 mois et 1 an et immédiatement congelés dans l'azote liquide et conservé à -80°C jusqu'à utilisation. L'extraction de l'ARN de l'ovaire en entier a été effectuée en utilisant le Trizol (Invitrogen) selon le protocole fourni par le fabricant et conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

2.6.2. PCR quantitative

Le brin d'ADNc a été synthétisé à partir de 1 µg d'ARNm, traité à la DNaseI (Invitrogen) selon protocole du fabricant, avec la Superscript II RNase H - Reverse Transcriptase (Invitrogen). Le niveau d'expression de l'ARNm de *Hyal1* et *Hyal2* a été évalué chez les souris déficientes de Hyal-3 par PCR quantitative en utilisant le Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) et 1 µL d'ADNc pour chaque réaction. Les amorces utilisées sont localisées sur les exons 3 et 4 des hyaluronidases (voir tableau III). Le gène de la β -actine a été utilisé comme contrôle. Chaque échantillon d'ADNc a été

analysé en triplicat. La machine utilisée était iCycler iQ Real Time Detection System (BioRad, Missisauga, ON, Canada). Le programme utilisé était le suivant:

50°C 2 min, 95°C 3 min, (95°C 30 sec, 64°C 30 sec, 72°C 45 sec) 50 x
 Courbe de fusion : 60°C 1 min, 60°C 10 sec avec augmentation de la température de 0.5°C à chaque cycle pour 70 cycles.

Les résultats ont été analysés en utilisant la formule $2^{\Delta\Delta C_t}$ qui compare la différence de C_t entre les souris sauvages et mutantes par rapport à la différence de C_t entre sauvage et mutant pour l'actine ($2^{(C_{tHyalWT} - C_{tHyalKO}) - (C_{tActWT} - C_{tActKO})}$). (176)

Les échantillons ont été soumis à une migration sur gel d'agarose 2% afin de s'assurer de la présence d'une seule bande pour chacune des réactions. Les produits de la PCR quantitative ont aussi été purifiés avec le GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England), clonés dans le vecteur pCRII (Invitrogen) et séquencés (voir item 2.9.) afin de confirmer leur identité à l'aide de l'amorce M13 Forward.

2.7. Clonage moléculaire

2.7.1. Vecteurs

Le vecteur pBlueScript a été acheté chez Strategene (La Jolla, CA, É.U.). Le vecteur pIC-CRE a été obtenu de Dr Nathalie Labrecque (177). Le vecteur pBlueInhibinProm a été obtenu de Dr Aaron J. W. Hsueh (174).

2.7.2. Milieux de culture bactérienne

Les bactéries ont été mises en culture dans du Luria Broth Miller (LB) (EM Science, Gibbstown, NJ, É.U.) ou sur des pétris LB Agar Miller (EM Science) fabriqués selon le protocole du fabricant.

2.7.3. Préparation d'ADN

2.7.3.1. MiniPrep phénol/chloroforme à partir d'une culture bactérienne

Les solutions ainsi que leur composition sont les suivantes : Solution I: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, RNase A 100 µg/mL ; Solution II: 0.2 N NaOH, SDS 1%; Solution III: 3M KAc pH 4.8.

Une colonie bactérienne a été inoculée dans 3 mL de LB contenant de l'ampicilline (100 µg/mL) et mise en culture environ 16 heures à 37°C avec agitation de 200 rpm. 1.2 mL de culture a été transféré dans un tube et centrifugé à vitesse maximale pendant 30 sec. Le surnageant a été jeté et un 1 mL de culture a été rajouté au culot et centrifugé à nouveau. Le surnageant a été jeté. Le culot a été dissous avec 150 µL de solution I et vortexé vigoureusement. Les bactéries ont été lysées par l'ajout de 150 µL de solution II et les tubes ont été inversés 10 à 15 fois. 300 µL de solution III a été ajouté afin de neutraliser la réaction et les tubes ont été inversés jusqu'à ce qu'un précipité floconneux apparaisse. Les tubes ont été centrifugés à vitesse maximale pendant 5 min à température pièce. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube et 300 µL de UltraPure Buffer-Saturated Phenol (pH 7.5-7.8) (Invitrogen) a été ajouté ainsi que 300 µL de chloroforme (EMD). Les tubes ont été vortexés pendant 30 sec et centrifugés à 14 000 rpm pendant 10 min à 4°C. La phase supérieure aqueuse (~400 µL) a été récupérée et transférée dans un nouveau tube. 1/10 volume (~40 µL) de 3 M NaAc pH 5.0 et 1 volume (~400 µL) d'isopropanol ont été ajoutés et les tubes ont été vortexés afin d'homogénéiser et incubés à -80°C pendant 2 h ou pendant au moins 8 h à -20°C. Les tubes ont été centrifugés à 14 000 rpm pendant 15 min à 4°C, le surnageant a été jeté et 1 mL d'EtOH 70% a été ajouté au culot, vortexé et centrifugé à 14 000 rpm pendant 10 min à 4°C. Le surnageant a été jeté et le culot séché à l'air libre (~15 min) et dissous dans 50 µL d'eau.

2.7.3.2. Midi Prep

Une colonie d'un pétri a été inoculée et mise en culture dans 3 mL de LB contenant de l'ampicilline (100 µg/mL) avec agitation à 200 rpm à 37°C pendant 4 h. 100 µL de cette suspension a été remise en culture dans 100 mL de LB Broth contenant de l'ampicilline (100 µg/mL) à 37°C pendant environ 16 h. Les Midi Prep ont été préparées à l'aide du HiSpeed Plasmid Midi Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) selon le protocole du fournisseur à partir de cette culture.

2.7.3.3. Purification d'ADN à partir de gel d'agarose

L'ADN purifié à partir de gel d'agarose a été effectué en utilisant le kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Bioscience) selon le protocole du fabricant.

2.7.4. Digestions

L'ADN (4 µg pour la préparation d'insert ou de vecteur et 0.5 à 1 µg pour l'analyse des constructions) a été digéré avec 1, 2, 10 ou 20 U d'enzymes de restriction dans le tampon recommandé et dans le cas des digestions doubles, dans le tampon le plus compatible avec les deux enzymes. Les réactions ont été effectuées à 37°C pendant 1 h ou 18 h. Les échantillons ont ensuite été soumis à une migration sur gel d'agarose 1% afin d'analyser le résultat de la digestion. Les enzymes de restriction utilisées sont les suivantes : *PstI*, *Sall*, *KpnI*, *XbaI* (Invitrogen) et *AgeI* (Fermantas, Burlington, ON, Canada).

2.7.5. Ligations

Les réactions de ligations ont été effectuées avec 100 ng de vecteur dans un ratio molaire vecteur/insert 1 :3 avec 1 µL de T4 DNA ligase (NEB) avec son tampon T4 DNA Ligase Buffer 10X (NEB) dans un volume total de 10 µL et incubées à 16°C pendant 18 h puis l'enzyme a été inactivée à 65°C pendant 10 min.

2.7.6. Transformations

Les transformations bactériennes ont été effectuées avec 1 μL de miniprep ou 5 μL de réaction de ligation. Les bactéries compétentes utilisées étaient DH5 α , MACH1 et One Shot Topo10 (Invitrogen). L'ADN a été ajouté à 100 μL de bactéries compétentes et incubées sur glace pendant 30 min. Les échantillons ont ensuite subi une réaction de choc thermique par l'incubation à 42°C pendant 30 à 45 sec et ont été immédiatement transférés sur glace pendant 5 min. 250 μL de milieu SOC (Super Optimal Catabolite repression) (Invitrogen) ont été ajoutés aux réactions et incubés à 37°C avec agitation à 200 rpm pendant 1h à 1h30. 25 à 100 μL de la culture a été étalé sur pétris LB Agar contenant de l'ampicilline (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et les pétris ont été incubés à 37°C pendant environ 16h dans le but d'obtenir des colonies isolées.

2.7.7. Analyse des colonies

Les colonies présentes sur les pétris LB Agar, sur lesquelles avaient été étalées les réactions de transformations, ont été repiquées et incubées pendant environ 16 h à 37°C sur une plaque LB Agar contenant de l'ampicilline (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) numérotée pour fin d'identification d'éventuelles colonies positives contenant l'insert. L'analyse a été faite par PCR avec les amorces InhScreen F et R (voir tableau III). Pour chaque réaction de 25 μL nous avons utilisé : 0.5 μL dNTP 10 mM (Invitrogen), 10 pmol de chaque amorce, 0.25 μL de Taq Polymerase 5000 U/mL (NEB) avec 2.5 μL de son Tampon 10X et 15 μL d'eau dans laquelle est dissous l'équivalent d'une colonie.

Le programme pour la réaction de PCR était le suivant :

94°C 5 min, (94°C 30 sec, 48°C 45 sec, 72°C 1 min) 35x, 72°C 5 min.

Les échantillons ont ensuite été soumis à une migration sur gel d'agarose 1% pour analyse.

2.7.8. Analyse du génotype de l'éventuelle souris transgénique CRE-Inhibin α

Pour chaque réaction de 25 μ L nous avons utilisé : 0.5 μ L dNTP 10 mM (Invitrogen), 10 pmol de chaque amorce CRE Trans F et R (voir tableau III), 0.25 μ L de Taq Polymerase 5000 U/mL (NEB) avec 2.5 μ L de son Tampon 10X et 40 pg à 100 ng de la Midiprep pBlueCRE-Inhibin α .

Le programme pour la réaction de PCR était le suivant :

94°C 10 min, (94°C 1 min, 63°C 1 min, 72°C 2 min) 35x, 72°C 10 min.

Les échantillons ont ensuite été soumis à une migration sur gel d'agarose 1% pour analyse.

2.8. Quantification d'acides nucléiques

La quantification de l'ADN et de l'ARN a été effectuée par mesure de la densité optique à 260 nm.

La concentration d'ADN est calculée selon la formule suivante :

Concentration d'ADN (μ g/ μ L) = D.O. 260 nm x facteur de dilution x 50 μ g/mL

La concentration d'ARN est calculée avec la formule suivante :

Concentration d'ARN (μ g/ μ L) = D.O. 260 nm x facteur de dilution x 40 μ g/mL

2.9. Séquençage

La préparation des échantillons destinés au séquençage comporte deux étapes : la réaction de PCR et la précipitation. Pour la réaction de PCR, on prépare environ 500 ng des Midi preps, 10 pmol de l'amorce M13 Forward, 1 μ L de Terminator Reaction Mix et 0.5 μ L de Terminator Diluant du Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, É.U.) dans un volume total de 5 μ L. Le programme était le suivant :

96°C 3 min, (96°C 30 sec, 50°C 15 sec, 60°C 4 min) x25, 4°C ∞

Les échantillons ont ensuite été précipités : après une brève centrifugation des échantillons, 80 μ L de la solution suivante a été ajouté à chaque réaction : 3 μ L NaAc 3M pH 4.6, 62.5 μ L EtOH 95% et 14.5 μ L d'eau. Les échantillons ont été incubés 15 min à température pièce et centrifugés à

2000 *g* pendant 45 min. Le surnageant a été jeté et les tubes ont été centrifugés en position inversée à 50 *g* pendant 1 min. 150 μ L d'EtOH 70% a été ajouté aux tubes, mélangé par inversion et centrifugé à 2000 *g* pendant 10 min. Le surnageant a été jeté et les tubes ont été centrifugés en position inversée à 50 *g* pendant 1 min. L'analyse des séquences d'ADN a été effectuée avec le séquenceur ABI 3100 du Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont (Montréal, QC, Canada).

2.10. Analyses statistiques

Les analyses biostatistiques ont été effectuées en utilisant le Test de *t* de Student bilatéral à variance égale.

Les analyses statistiques pour le nombre de follicules par catégorie d'âge ont été effectuées par Dr Ellen Freeman (Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Département d'ophtamologie, Université de Montréal) en utilisant le logiciel Stata Version 7 (StataCorp LP, Texas, É.-U.). Le test non-paramétrique Kruskal-Wallis a été utilisé afin de déterminer s'il y avait une différence dans le nombre de follicules pour les 4 catégories d'âges pour chaque type de follicules. Ensuite, un test de tendance non-paramétrique a été effectué afin de déterminer si le nombre de follicule diminuait avec l'augmentation de l'âge des souris (178). Les différences étaient considérées comme significatives si $p < 0.05$.

3. Résultats

3.1. Fonction ovarienne chez les souris déficientes de Hyal-3

Dans le but de savoir si la délétion de Hyal-3 affecterait la folliculogénèse et le niveau d'atrésie dans les ovaires des souris déficientes de cette enzyme, les différents types de follicules des souris Hyal-3 +/+ et Hyal-3 -/- ont été comptés. La figure 11 représente les résultats obtenus suite à ce décompte et chaque graphique représente le nombre moyen de follicules par coupe pour chaque type de follicule ; primordial, primaire, secondaire, antral et atrétique, pour les souris âgées de 4 semaines, 6 semaines, 6 mois et 1 an. Les follicules atrétiques comptés sont généralement de type antraux. Aucune différence significative n'est observée entre les deux groupes de souris et ce, pour chaque type de follicule et à chaque âge. On observe par contre que la folliculogénèse est normale puisque le nombre de follicules diminue avec l'âge et ce, de façon significative ($p < 0.05$, test Kruskal-Wallis non-paramétrique) chez les souris sauvages et chez les souris déficientes de Hyal-3, excepté pour les follicules antraux et les follicules atrétiques des souris sauvages. Cette exception est probablement due à la difficulté rencontrée lors du décompte de ces types de follicules.

Afin de voir si l'enzyme Hyal-3 avait un effet sur l'apoptose des cellules de la granulosa des ovaires dans une situation d'atrésie des follicules ovariens, une induction d'atrésie a été effectuée chez des souris immatures Hyal-3 +/+ et Hyal-3 -/- en leur injectant eCG, un analogue de la FSH qui stimule la croissance des follicules, et en bloquant l'action de cette hormone par injection de l'anticorps anti-eCG. La figure 12 représente le pourcentage de cellules de la granulosa apoptotiques provenant des souris ayant reçu l'injection de eCG seulement (groupe contrôle) et des souris ayant reçu l'injection de eCG et anti-eCG. On observe que l'injection de l'anticorps induit effectivement une augmentation significative du nombre de cellules de la granulosa apoptotiques comparativement au nombre de cellules de la granulosa apoptotiques dans le groupe contrôle n'ayant reçu que l'injection de eCG. Par contre, cette

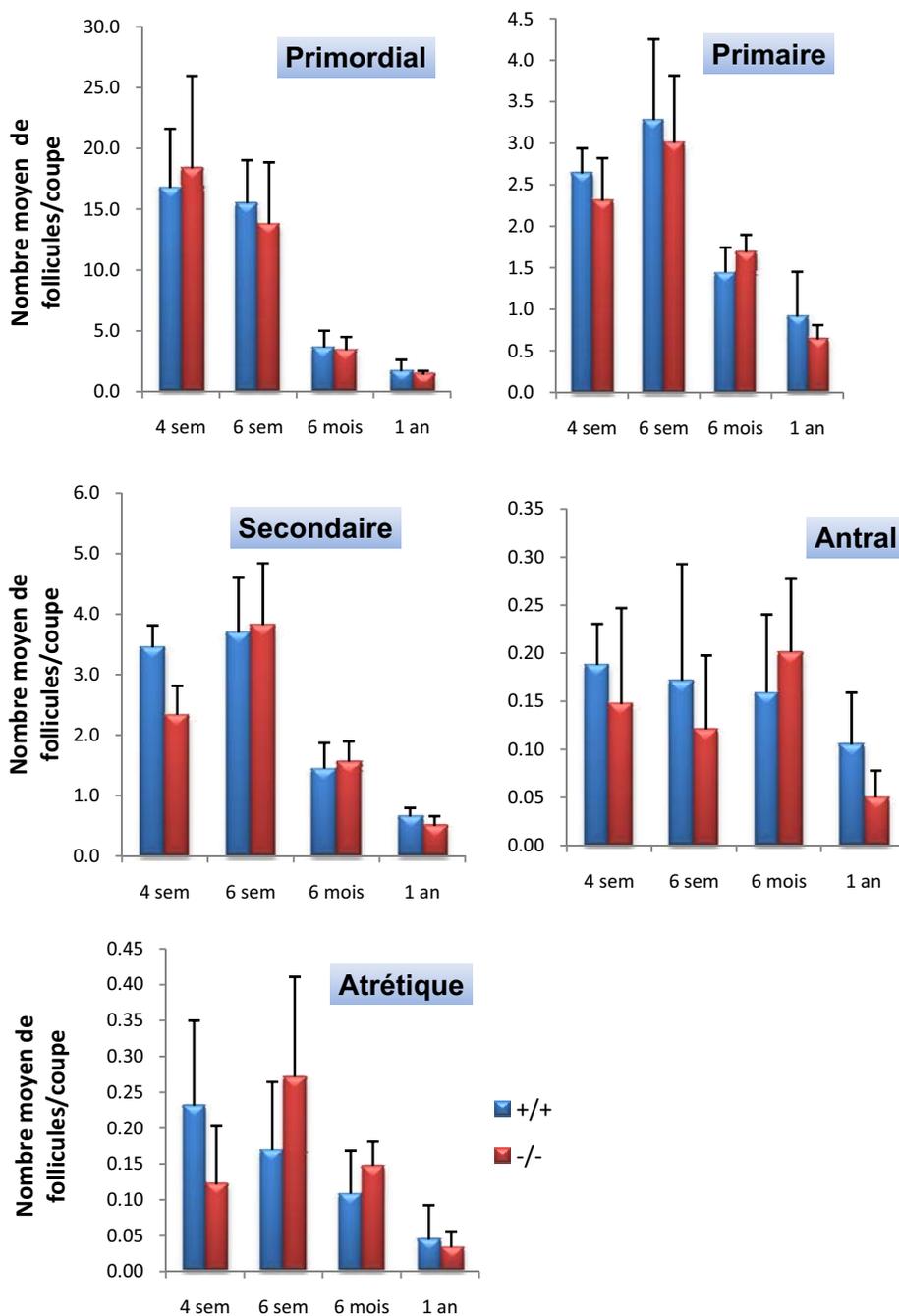


Figure 11. Décompte des follicules ovariens chez les souris déficientes de Hyal-3.

Le décompte a été effectué chez les souris homozygotes +/+ et -/- pour le gène *Hyal3*. Les follicules ont été comptés selon le type (primordial, primaire, secondaire, antral et atrétique) à chaque 10 coupes. Les graphiques représentent le nombre moyen de follicules par coupe pour chaque ovaire. n=5-6 souris. Les barres d'erreurs représentent l'écart moyen.

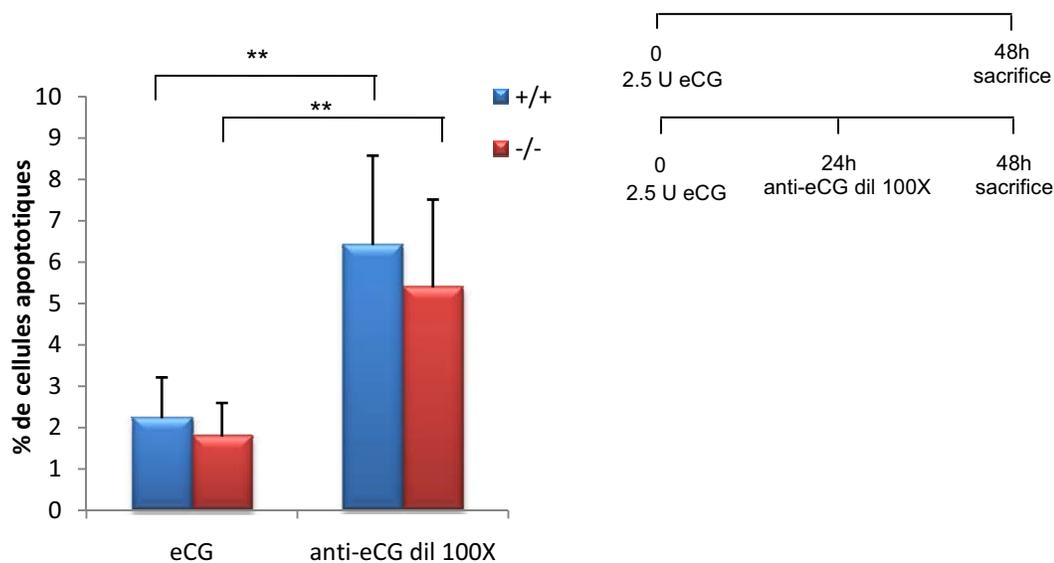


Figure 12. Analyse de l'apoptose des cellules de la granulosa chez les souris déficientes de Hyal-3.

L'analyse a été effectuée chez les souris homozygotes +/+ et -/- pour le gène *Hyal3* âgées de 19 jours. L'induction d'atrésie a été effectuée par l'injection de 2.5 U de eCG (groupe contrôle) ou de 2.5 U de eCG et de l'anticorps anti-eCG dilué 100X aux souris. Les cellules de la granulosa récoltées ont été marquées au Hoechst afin de voir leur niveau d'apoptose et 1000 cellules ont été comptées pour chaque échantillon. n=8 ovaires pour les souris +/+ eCG et anti-eCG, n=6 ovaires pour les souris -/- eCG et n=7 ovaires pour les souris -/- anti-eCG. Les barres d'erreurs représentent l'écart moyen. Test t de Student : ** p < 0.01

augmentation du nombre de cellules apoptotiques dans le groupe ayant reçu l'anticorps anti-eCG ne démontre aucune différence significative entre les souris Hyal-3 +/+ et Hyal-3 -/-.

On s'est demandé par la suite si l'enzyme Hyal-3 avait un effet sur l'ovulation et le nombre d'ovocytes produits. L'induction d'ovulation s'est fait en injectant aux souris immatures Hyal-3 +/+ et Hyal-3 -/- l'eCG pour stimuler la croissance des follicules et hCG afin d'induire l'ovulation. La figure 13 montre le nombre d'ovocytes produits chez les souris Hyal-3 +/+ et Hyal-3 -/- cependant aucune différence significative n'est observée entre les deux groupes.

Suite à tous ces résultats ne démontrant aucune différence significative pour le nombre de follicules ovariens, l'apoptose des cellules de la granulosa et le nombre d'ovocytes produits chez les souris déficientes de Hyal-3, nous avons décidé de regarder le niveau d'expression des autres enzymes présentes chez ces souris au niveau des ovaires afin de déterminer si un effet compensatoire est généré par les autres enzymes. Le niveau d'expression de l'actine étant utilisé comme contrôle et ayant comme valeur arbitraire 1, toute valeur au-dessus de 1 représente une augmentation d'expression et, de la même façon, toute valeur en dessous de 1 représente une diminution d'expression. La figure 14 représente la comparaison du niveau d'expression de Hyal-1, Hyal-2 et d'actine entre les souris Hyal-3 +/+ et Hyal-3 -/-. On peut observer que le niveau d'expression de Hyal-2 reste le même chez les souris Hyal-3 -/- que chez les souris Hyal-3 +/+. Le niveau d'expression de Hyal-1 quant à lui est plus élevé chez les souris Hyal-3 -/- âgées de 6 mois et 1 an. Cependant, cette analyse a été faite juste une fois pour chaque âge et génotype représentés dans le graphique (n=1 souris), alors l'expérience doit être répétée avec un plus grand échantillon de souris afin d'en tirer des conclusions significatives.

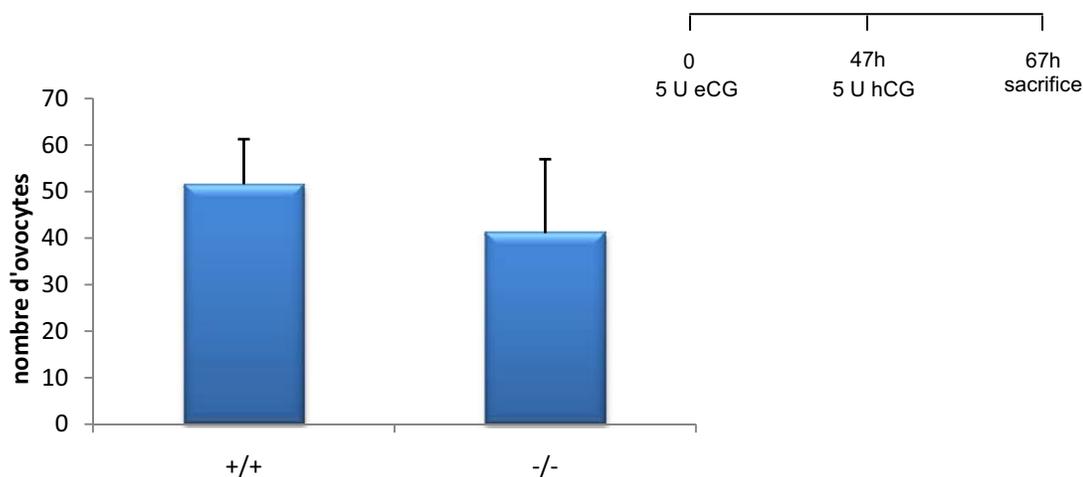


Figure 13. Analyse du nombre d'ovocytes produits chez les souris déficientes de Hyal-3.

Les souris homozygotes +/+ et -/- pour le gène *Hyal3* âgées de 19 jours ont été analysées selon le nombre d'ovocytes produits suite à une induction d'ovulation par injection de 5 U de eCG au temps 0 et de 5 U de hCG au temps 47h. n=12 souris pour les souris +/+ et n=10 souris pour les souris -/-. Les barres d'erreurs représentent l'écart moyen.

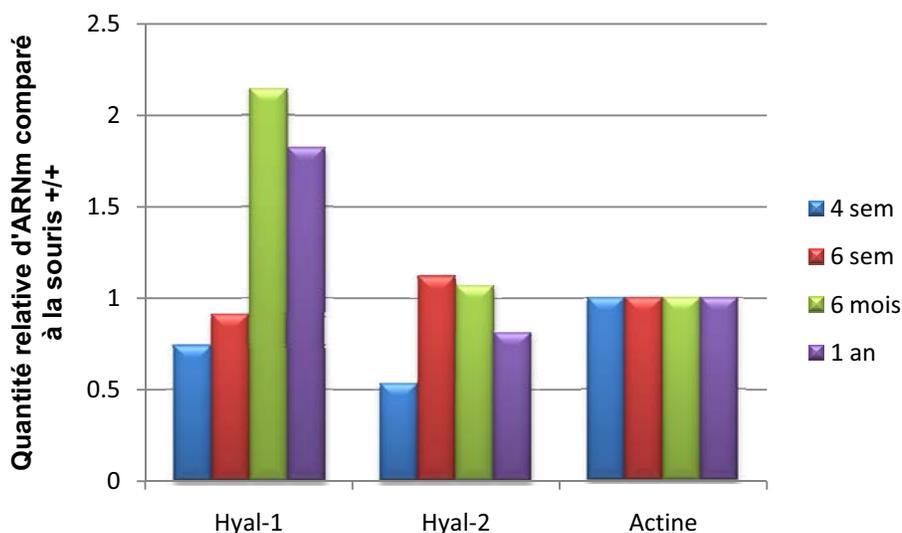


Figure 14. Analyse du niveau d'expression des gènes *Hyal1* et *Hyal2* chez les souris déficientes du gène *Hyal3* par PCR en temps réel.

Le niveau d'expression de chaque gène dans les ovaires des souris homozygotes *-/-* pour *Hyal3* a été effectué par rapport au niveau d'expression chez les souris homozygotes *+/+* pour *Hyal3* comme décrit dans la section *Matériel et Méthodes*. Le niveau d'expression de l'actine a été utilisé comme contrôle.

3.2. Fonction ovarienne chez les souris déficientes de Hyal-1

Dans le but de savoir si la délétion de Hyal-1 affecterait la folliculogénèse et le niveau d'atrésie dans les ovaires des souris déficientes de cette enzyme, les différents types de follicules des souris Hyal-1 +/+ et Hyal-1 -/- ont été comptés. La figure 15 montre les résultats obtenus suite au décompte et chaque graphique représente le nombre moyen de follicules par coupe pour chaque type de follicule ; primordial, primaire, secondaire, antral et atrétique, pour les souris âgées de 4 semaines, 6 semaines, 6 mois et 1 an. Les follicules atrétiques comptés sont généralement de type antraux. On peut observer une augmentation significative du nombre de follicules primordiaux chez les souris Hyal-1 -/- âgées de 4 semaines et 6 semaines ($p < 0.05$), une augmentation significative du nombre de follicules primaires chez les souris Hyal-1 -/- âgées de 6 semaines ($p < 0.01$) et une augmentation significative du nombre de follicules secondaires chez les souris Hyal-1 -/- âgées de 6 semaines ($p < 0.05$). Cependant, il n'y a pas de différence significative du nombre de follicules antraux et atrétiques entre les souris Hyal-1 +/+ et Hyal-1 -/-. De plus, même si on observe des différences significatives chez les souris âgées de 4 semaines et 6 semaines, cet effet sur les follicules disparaît avec l'âge comme on peut le constater avec les souris âgées de 6 mois et 1 an, chez qui on ne voit aucune différence significative du nombre de follicules, tous types de follicules confondus. Par ailleurs, on observe que la folliculogénèse est normale puisque le nombre de follicules diminue avec l'âge et ce, de façon significative ($p < 0.05$, test Kruskal-Wallis non-paramétrique) chez les souris sauvages et chez les souris déficientes de Hyal-1, excepté pour les follicules antraux des souris sauvages et des souris déficientes de Hyal-1. Cette exception, comme avec les souris déficientes de Hyal-3, est probablement due à la difficulté rencontrée lors du décompte de ce type de follicule.

Étant donné que la délétion de Hyal-1 n'avait pas d'effet sur le nombre de follicules atrétiques lors d'une folliculogénèse normale (figure 15), nous nous sommes demandé si l'enzyme Hyal-1 avait un effet sur l'apoptose des cellules de la granulosa des ovaires dans une situation d'induction d'atrésie des

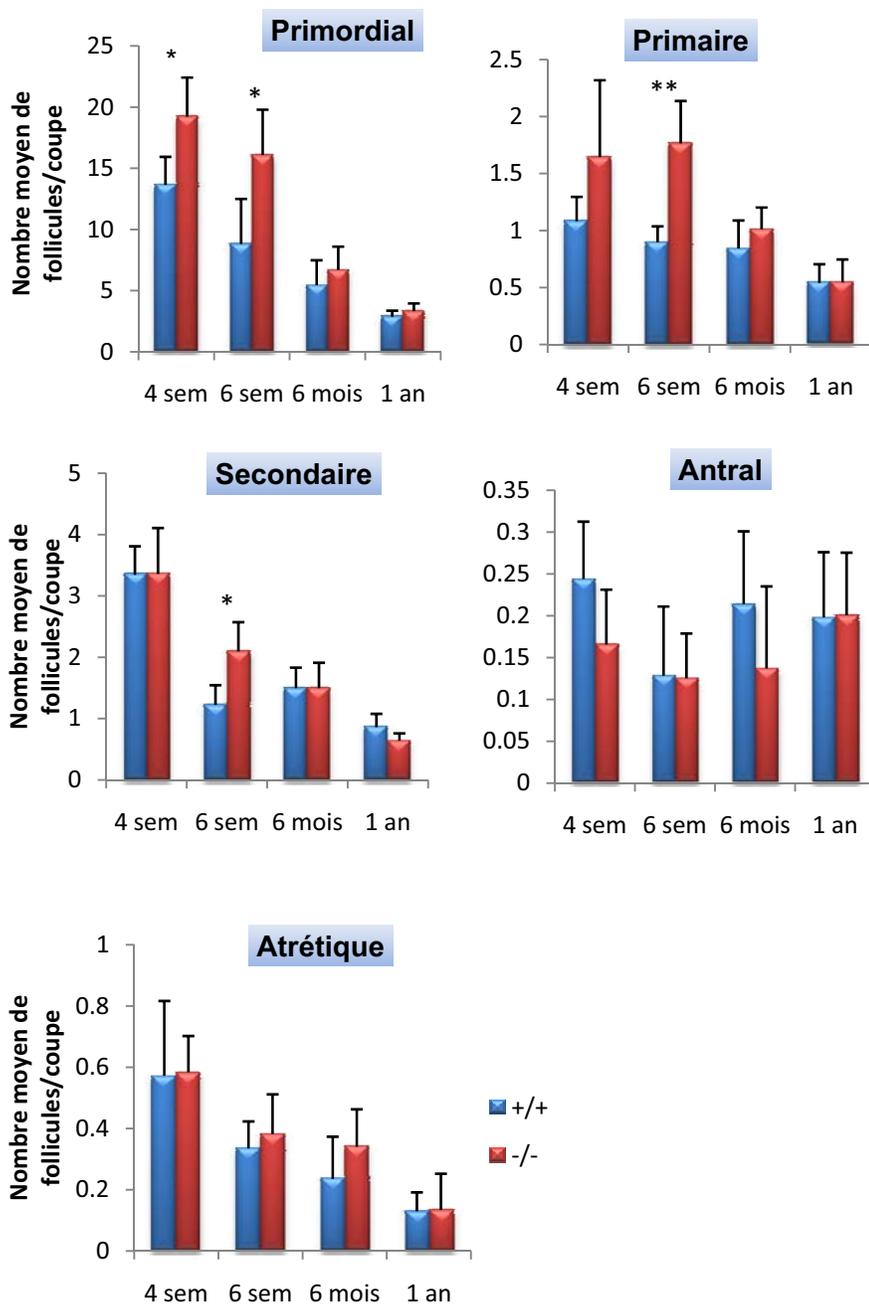


Figure 15. Décompte des follicules ovariens chez les souris déficientes de Hyal-1.

Le décompte a été effectué chez les souris homozygotes +/+ et -/- pour le gène *Hyal1*. Les follicules ont été comptés selon le type (primordial, primaire, secondaire, antral et atrétique) à chaque 10 coupes. Les graphiques représentent le nombre moyen de follicules par coupe pour chaque ovaire. n=5-6 souris. Les barres d'erreurs représentent l'écart moyen. Test t de Student : * p< 0.05, ** p< 0.01

follicules. Pour ce faire, les souris immatures Hyal-1 +/+ et Hyal-1 -/- ont été injectées avec eCG et l'anticorps anti-eCG en suivant la même procédure qu'avec les souris Hyal-3.

La figure 16 représente le pourcentage de cellules de la granulosa apoptotiques provenant des souris ayant reçu l'injection de eCG seulement (groupe contrôle) et des souris ayant reçu l'injection de eCG et anti-eCG. On observe que l'injection de l'anticorps induit effectivement une augmentation significative du nombre de cellules de la granulosa apoptotiques comparativement au nombre de cellules de la granulosa apoptotiques dans le groupe contrôle n'ayant reçu que l'injection de eCG. De plus, on observe que le niveau d'apoptose des cellules de la granulosa des souris Hyal-1 -/- ayant reçu l'anticorps anti-eCG est significativement moins élevé que chez les souris Hyal-1 +/+ traitées de la même façon ($p < 0.05$).

On s'est demandé par la suite si l'enzyme Hyal-1 avait un effet sur l'ovulation et le nombre d'ovocytes produits. L'induction d'ovulation s'est faite en injectant les souris immatures Hyal-1 +/+ et Hyal-1 -/- avec eCG et hCG en suivant la même procédure qu'avec les souris Hyal-3. La figure 17 montre le nombre d'ovocytes produits chez les souris Hyal-1 +/+ et Hyal-1 -/-. On peut observer une augmentation significative du nombre d'ovocytes produits chez les souris Hyal-1 -/- comparé au nombre d'ovocytes produits par les souris Hyal-1 +/+, et ce, avec un $p < 0.01$.

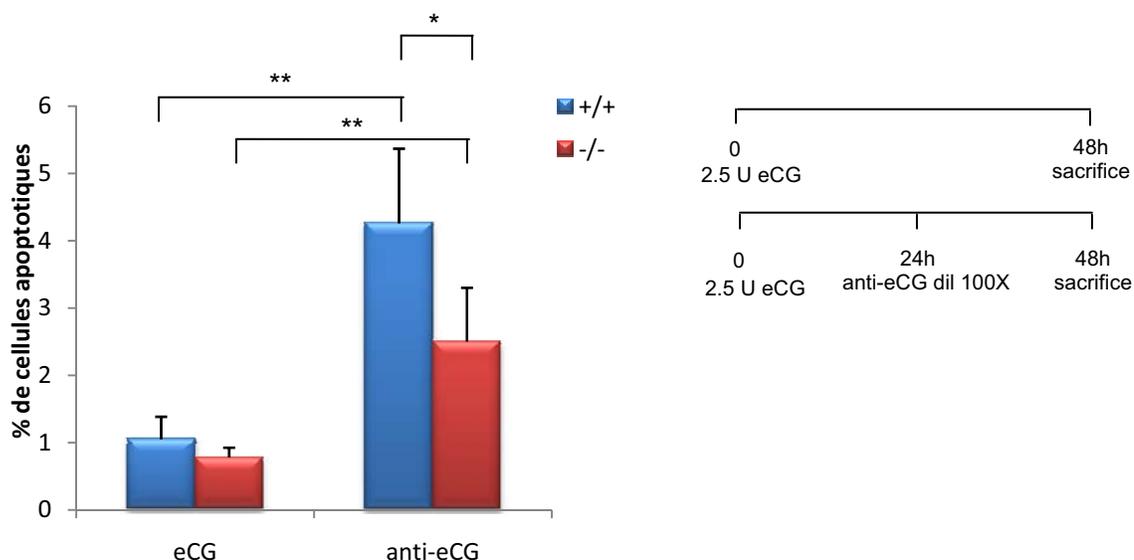


Figure 16. Analyse de l'apoptose des cellules de la granulosa chez les souris déficientes de Hyal-1.

L'analyse a été effectuée chez les souris homozygotes +/+ et -/- pour le gène *Hyal1* âgées de 19 jours. L'induction d'atrésie a été effectuée par l'injection de 2.5 U de eCG (groupe contrôle) ou de 2.5 U de eCG et de l'anticorps anti-eCG dilué 100X aux souris. Les cellules de la granulosa récoltées ont été marquées au Hoechst afin de voir leur niveau d'apoptose et 1000 cellules ont été comptées pour chaque échantillon. n=7 ovaires pour les souris +/+ eCG, n=8 ovaires pour les souris +/+ anti-eCG et n=6 ovaires pour les souris -/- eCG et anti-eCG. Les barres d'erreur représentent l'écart moyen. Test t de Student : * p< 0.05, ** p< 0.01

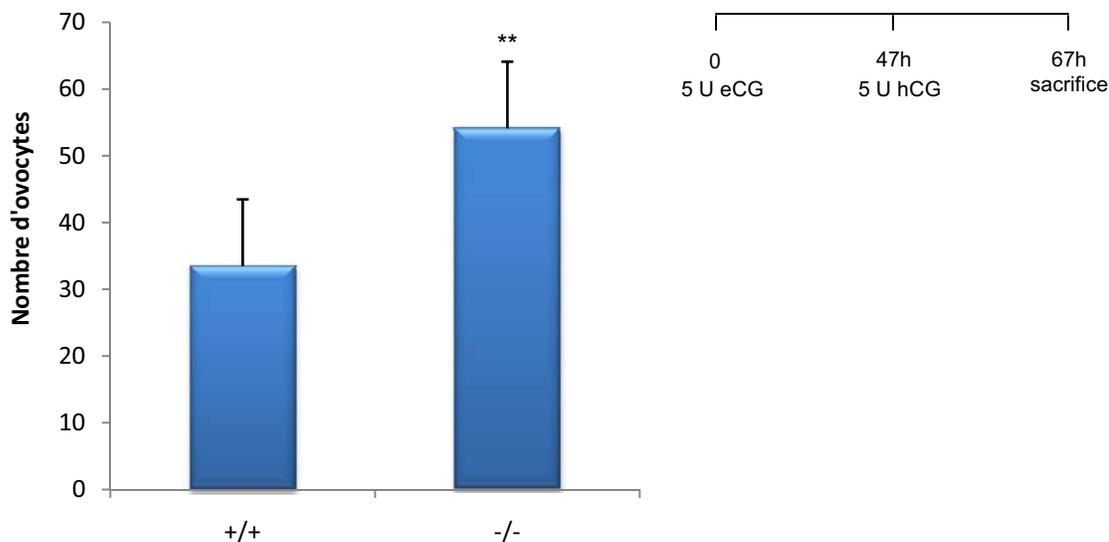


Figure 17. Analyse du nombre d'ovocytes produits chez les souris déficientes de Hyal-1.

Les souris homozygotes +/+ et -/- pour le gène *Hyal1* âgées de 19 jours ont été analysées selon le nombre d'ovocytes produits suite à une induction d'ovulation par injection de 5 U de eCG au temps 0 et de 5 U de hCG au temps 47h. n=13 souris pour les souris +/+ et n=11 pour les souris -/-. Les barres d'erreurs représentent l'écart moyen. **Test t de Student : $p < 0.01$

Suite à ces résultats nous démontrant une différence significative pour le nombre de follicules ovariens, l'apoptose des cellules de la granulosa et le nombre d'ovocytes produits chez les souris déficientes de Hyal-1, nous n'avons pas vu l'intérêt d'analyser le niveau d'expression des autres enzymes présentes chez ces souris au niveau des ovaires comme nous l'avons fait avec les souris déficientes de Hyal-3. Cependant, il a été récemment démontré que le niveau d'expression de *Hyal3*, mais pas celui de *Hyal2*, était augmenté au niveau du foie chez les souris déficientes de Hyal-1 d'âge adulte (146). Donc, nous croyons que dans un avenir rapproché, il serait intéressant de vérifier le niveau d'expression de *Hyal3* et *Hyal2* dans les ovaires des souris déficientes de Hyal-1 de différents âges. Il est possible qu'une compensation puisse arriver juste chez les souris adultes mais pas chez les jeunes.

Il est à noter que les résultats obtenus avec les souris déficientes de Hyal-3 ne peuvent être comparés avec les résultats obtenus avec les souris déficientes de Hyal-1 et vice versa étant donné que les deux types de souris ont été générés chez deux souches de souris différentes, soit CD1 pour les souris déficientes de Hyal-3 et B6 pour les souris déficientes de Hyal-1 comme mentionné à la section 2.1. Ces deux souches de souris ont des comportements différents et une fertilité différente comme j'ai pu l'observer tout au long de ma maîtrise lors des manipulations effectuées avec celles-ci.

3.3. Construction d'un plasmide contenant le gène *Cre* sous le contrôle du promoteur de l'*Inhibin- α*

Afin de voir l'effet des enzymes hyaluronidases, Hyal-1, Hyal-2 et Hyal-3, dans la fonction ovarienne sans qu'il y ait d'effet compensatoire possible entre elles, comme le suggère la figure 14 pour les souris déficientes de Hyal-3, et étant donné que la souris déficiente de Hyal-2 n'est pas viable (144), nous avons décidé de générer une souris déficiente des trois enzymes Hyal-1, Hyal-2 et Hyal-3 spécifiquement dans les ovaires. Pour ce faire, nous avons décidé d'utiliser le système Cre/loxP et le promoteur de l'*Inhibin- α* , qui est spécifique aux gonades (174). Un fragment de 6 kb du promoteur de l'*Inhibin- α* a été cloné en amont du gène *Cre*. Cette construction a débuté par l'insertion de CRE, venant de pIC-CRE dans le plasmide de pBlueScript. La figure 18 montre les résultats obtenus après chaque étape. En 18.A, on démontre la stratégie utilisée pour la construction de pBlueCRE. La figure 18.B montre le résultat obtenu après la digestion de 4 μ g de pBlueScript et de 4 μ g de pIC-CRE par les enzymes *PstI* et *SalI*. Dans le puits 1, on voit la bande de 3 kb, encadrée en bleu, générée par la l'ouverture de pBlueScript. Dans le puits 2, on voit les deux bandes générées suite à la digestion de pIC-CRE. Le fragment CRE de 1.6 kb est encadré en vert. Les fragments obtenus ont ensuite été purifiés, ont subi une réaction de ligation et ont été transformés dans des cellules compétentes (voir Matériel et Méthodes). Les colonies obtenues suite à la transformation ont été inoculées afin de faire des minipreps et les analyser par digestion enzymatique. La figure 18.C montre le résultat obtenu suite à la digestion par *PstI* et *SalI* afin de confirmer la présence de l'insert CRE. Les minipreps #1, 2, 7, 10, 11, 13, 14 et 18 ont donné les deux fragments attendus soit 3 kb (pBlueScript) et 1.6 kb (CRE). Nous les avons donc digérés avec une autre paire d'enzymes, *KpnI* et *AgeI*, afin de voir si le fragment CRE a été inséré dans le bon sens. Les fragments attendus sont de 1300 pb et 3300 pb si l'insert est dans le bon sens et 4300 pb et 300 pb si l'insert est antisens. A la figure 18.D, on peut voir que sauf pour la miniprep #2, toutes les minipreps semblent avoir l'insert CRE dans le bon sens.

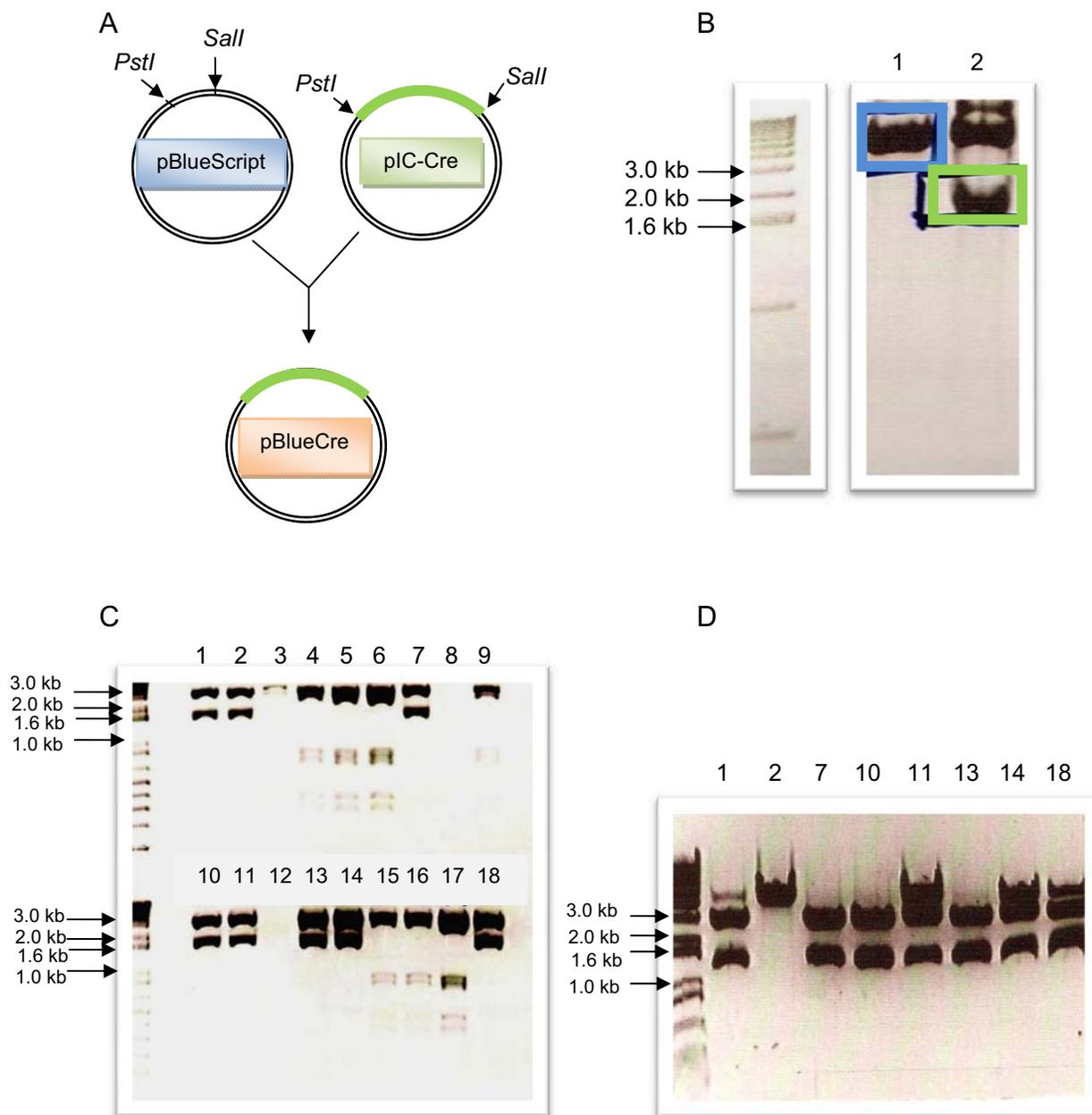


Figure 18. Construction de pBlueCRE.

A) Stratégie utilisée pour la création de pBlueCRE. B) Digestion de pBlueScript (puits 1) et de pIC-CRE (puits 2) par les enzymes de restriction *PstI* et *Sall*. Les bandes désirées sont encadrées : pBlueScript ouvert est en bleu et le fragment CRE en vert. C) Digestion des minipreps avec les enzymes de restrictions *PstI* et *Sall* afin de confirmer la présence de l'insert CRE D) et avec *KpnI* et *AgeI* afin de confirmer le sens de l'insert CRE.

Pour les miniprep #1, 11, 14 et 18, les bandes de plus grandes tailles représentent le plasmide non digéré. Nous avons donc préparé une Midiprep à partir de l'échantillon #7. Afin de confirmer que cette construction est positive et dans le bon sens, nous avons procédé au séquençage de la construction et nous avons eu la confirmation que nous avons réellement pBlueCRE

Par la suite, le fragment de 6 kb du promoteur de l'Inhibin- α a été inséré en amont de la séquence *Cre* dans le plasmide pBlueCRE. La figure 19 montre les résultats obtenus après chaque étape. En 19.A, on démontre la stratégie utilisée pour la création de pBlueCRE-InhProm. La figure 19.B montre le résultat obtenu après la digestion de 3 μ g de la Midiprep pBlueCRE et de 4 μ g de la MaxiPrep pBlueInhProm avec *Xba*I. On retrouve dans le puits 1 pBlueCRE non digéré, dans le puits 2 pBlueCRE digéré, donnant un fragment de 4.5 kb, et dans le puits 3 pBlueInhProm digéré. La digestion de pBlueInhProm par *Xba*I génère 3 fragments ; un fragment de 6 kb, encadré en rouge, représentant le fragment Inhibin désiré, un fragment de 4.5 kb représentant pBlueScript ainsi qu'un fragment d'environ 1 kb représentant le gène *bcl-2*. Les fragments de pBlueCRE et de Inhibin digérés ont ensuite été purifiés, ont subi une ligation et une transformation dans des cellules compétentes (voir Matériel et Méthodes). Les colonies générées suite à la transformation ont été inoculées sur une autre plaque LB Agar contenant de l'ampicilline (50 μ g/mL) et ont été analysées par PCR avec les amorces InhScreen F et R tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes 2.7.7. La figure 19.C montre le résultat obtenu après la réaction de PCR et on peut voir que la colonie #7 semble être positive. La colonie #7 a donc été inoculée pour faire une miniprep et cette miniprep a été digérée avec *Xba*I afin de confirmer la présence de l'insert Inhibin Prom. La figure 19.D montre le résultat obtenu suite à cette digestion. Dans le puits 1, on a l'échantillon digéré, montrant les deux bandes attendues de 6 kb (Inhibin Prom) et de 4.5 kb (pBlueCRE), et le puits 2 montre l'échantillon non digéré. Notre échantillon est donc positif. Afin de confirmer que cette construction est positive et dans le bon sens, nous avons

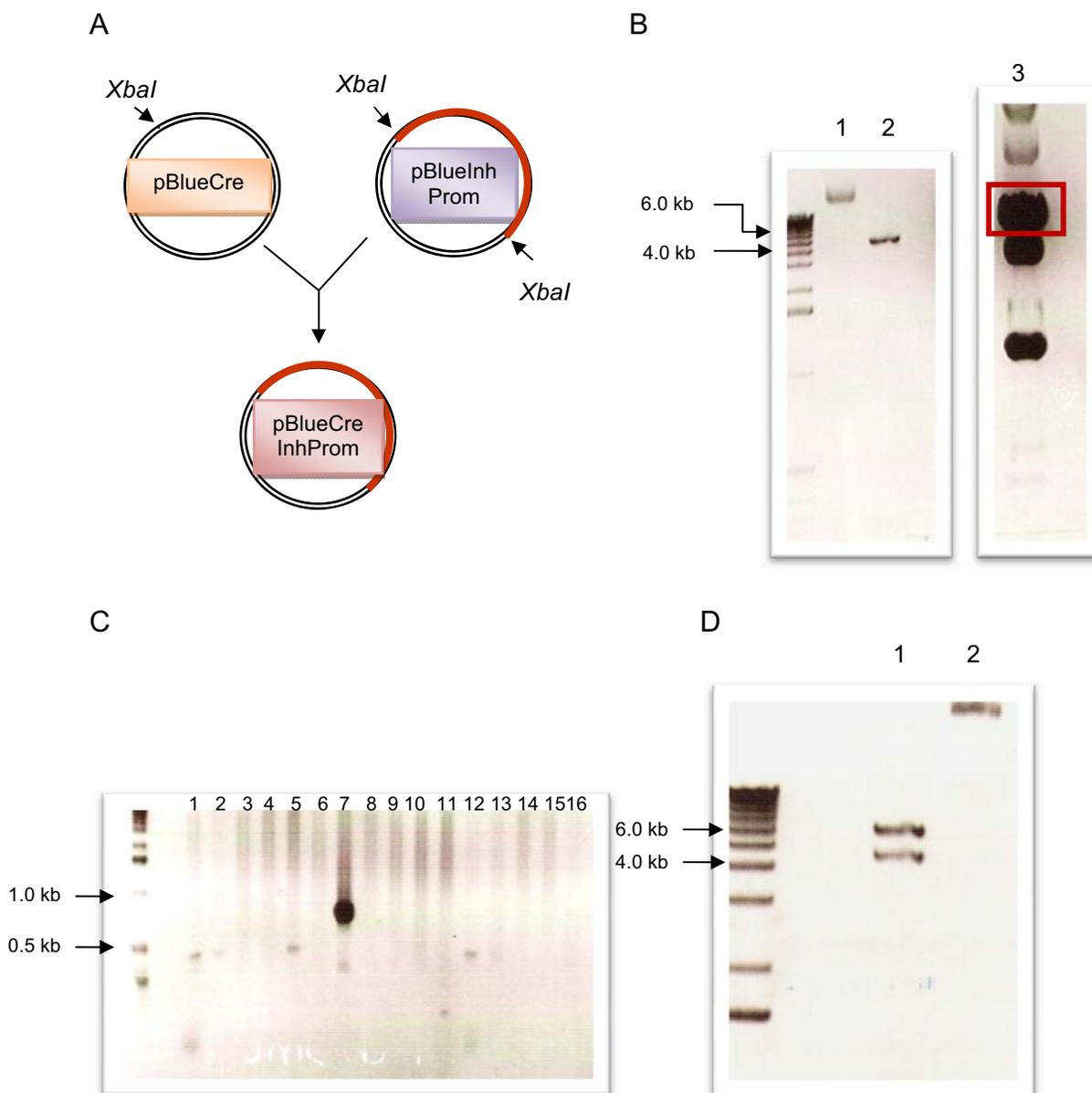


Figure 19. Construction de pBlueCRE-InhibinProm.

A) Stratégie utilisée pour la création de pBlueCRE-InhibinProm. B) Digestion de pBlueCRE et pBlueInhProm par *XbaI*. Dans les puits, on retrouve : 1 : pBlueCRE non digéré, 2 : pBlueCRE digéré, 3 : pBlueInhProm digéré. La bande encadrée en rouge représente le fragment Inhibin désiré. C) Analyse des colonies par PCR avec les amorces Inh Screen F et R. D) Digestion de la miniprep #7 afin de confirmer la présence de l'insert avec *XbaI*. Dans les puits, on retrouve : 1 : miniprep digérée, 2 : miniprep non-digérée

procédé au séquençage de la construction et nous avons eu la confirmation que nous avons réellement pBlueCRE-InhProm.

La figure 20 représente le schéma du résultat final de la construction d'un plasmide contenant CRE sous le contrôle du promoteur de l'Inhibin- α tel que démontré par le logiciel pDRAW 1.1.100 (www.acaclone.com). Les sites de coupures des enzymes de restriction utilisées pour le clonage, *XbaI* et *Sall*, sont représentés ainsi que le site de liaison des oligonucléotides CRE Trans F et R (tableau III) qui seront utilisés pour déterminer le génotype des futures souris transgéniques. Les enzymes de restriction *Sall* et *NaeI* seront utilisées afin de retirer la portion bactérienne du plasmide et d'isoler le transgène pour la microinjection pronucléaire lors de la fabrication de la souris transgénique. L'ADN rendu ainsi linéaire sera micro-injecté dans des ovocytes fécondés ayant deux pro-noyaux qui seront implantés dans l'utérus d'une souris femelle pseudo-enceinte selon des procédures décrites dans la littérature (179).

Afin de voir s'il est possible de déterminer de façon efficace le génotype de l'éventuelle souris transgénique, nous avons effectué un test par PCR avec les amorces CRE Trans F et R. La figure 21 montre le résultat obtenu suite à cette PCR. Dans le puits 1, on retrouve le produit de PCR effectué avec 100 ng d'ADN de souris sauvage. Aucune bande n'est observée. On peut donc en conclure que les oligonucléotides ne donneront pas de résultats non spécifiques ou de faux positifs. Dans le puits 2, on retrouve le produit de PCR effectué avec un mélange de 100 ng d'ADN de souris sauvage + 100 pg de MidiPrep pBlueCRE InhProm et dans le puits 3, le produit de PCR obtenu avec 40 pg de MidiPrep pBlueCRE InhProm (contrôle positif). On observe dans ces deux puits, une bande à 686 pb qui correspond à la taille du fragment attendu. Dans le puits 4, la réaction de PCR a été effectuée sans ADN (contrôle négatif). Aucune bande n'est obtenue ce qui signifie que notre réaction est exempt de contamination. Suite à ces résultats, on peut donc conclure que nos oligonucléotides seront efficaces pour déterminer le génotype d'une souris transgénique.

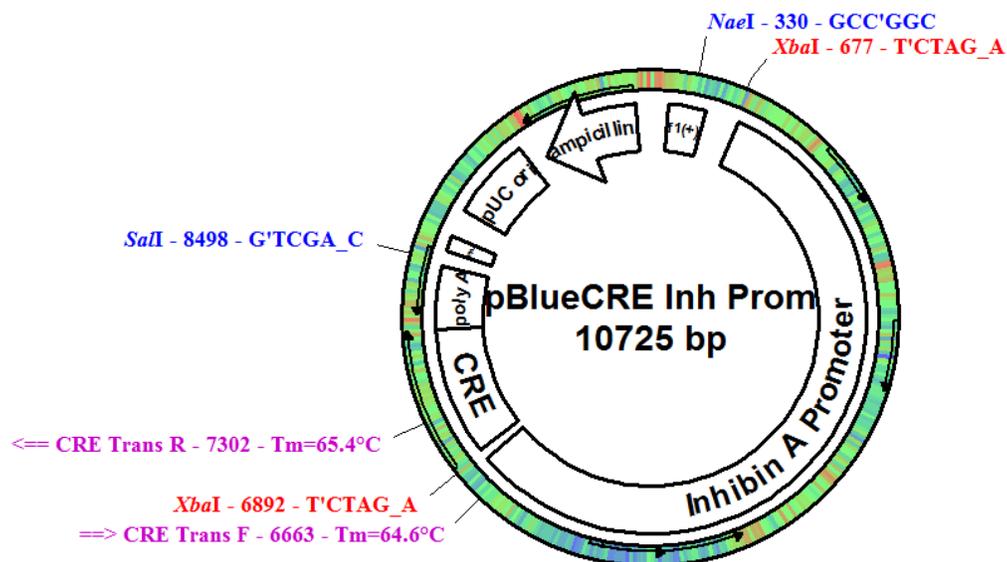


Figure 20. Représentation schématique du résultat du clonage de CRE sous le contrôle du promoteur Inhibin- α .

Sont représentés dans la figure les sites de coupures des différentes enzymes de restriction utilisées pour la création de ce plasmide, *XbaI* et *SaII*, les enzymes qui seront utilisées pour l'isolement du transgène, *SaII* et *NaeI*, ainsi que les sites de liaison des amorces CRE Trans R et CRE Trans F qui pourront être utilisées lors de la détermination du génotype de la souris transgénique.

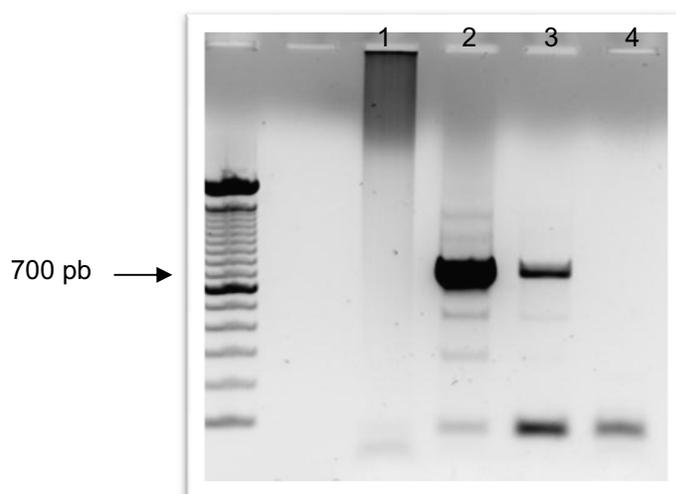


Figure 21. Test de détermination du génotype de la souris transgénique avec les amorces CRE Trans F et CRE Trans R.

Les réactions de PCR ont été effectuées avec les quantités d'ADN suivantes : pour le puits 1 : 100 ng d'ADN de souris sauvage, le puits 2 : 100 ng d'ADN de souris sauvage + 100 pg de MidiPrep pBlueCRE InhProm, dans le puits 3 : contrôle positif: 40 pg de MidiPrep pBlueCRE InhProm et dans le puits 4 : contrôle négatif sans ADN. Le fragment attendu est de 686 pb.

4. Discussion

Les mammifères femelles naissent avec un très grand nombre de follicules ovariens primordiaux (10^4 - 10^6) (180), mais la grande majorité (99%) de ceux-ci n'atteignent jamais la maturité et subissent l'atrésie, principalement par l'apoptose des cellules de la granulosa (3, 181, 182). Il a été démontré par immunobuvardage de type Northern et par RT-PCR que Hyal-1, Hyal-2 et Hyal-3, localisées sur le chromosome 3p21.3 de l'humain et le chromosome 9F1-F2 de la souris, sont exprimées dans l'ovaire (131, 136), mais aucune étude n'avait démontré le rôle de ces enzymes dans la fonction ovarienne. Le rôle physiologique des hyaluronidases dans la reproduction a seulement été démontré pour les hyaluronidases du chromosome 7q31.3 de l'humain et 6A de la souris, qui sont PH-20, Hyal-5 et Hyalp1. Ces hyaluronidases sont présentes au niveau du spermatozoïde et facilitent la pénétration dans le cumulus et la fécondation de l'ovocyte (130, 132, 136-139, 153, 183). Des études effectuées dans notre laboratoire ont démontré l'implication des enzymes hyaluronidases, Hyal-1, Hyal-2 et Hyal-3, dans l'apoptose des cellules de la granulosa ovariennes et dans l'atrésie des follicules ovariens (168). Nous avons démontré que ces enzymes sont exprimées dans les cellules de la granulosa des petits follicules antraux et que leur expression est augmentée après une induction de l'atrésie dans un modèle de retrait des gonadotropines par l'injection de l'anticorps anti-eCG. Plus particulièrement, nous avons détecté un haut niveau d'expression de Hyal-1 dans les petits follicules antraux chez les jeunes souris (âgées de 3 semaines). Cette expression de Hyal-1 s'atténuait avec l'âge indiquant ainsi une action répressive des gonadotropines dans l'expression de cette enzyme. La présente étude visait à démontrer la fonction de ces enzymes dans la fonction ovarienne en évaluant la folliculogénèse et la fertilité des souris déficientes de ces enzymes.

Les résultats obtenus avec les souris déficientes de Hyal-3 démontrent que cette enzyme n'affecte pas la folliculogénèse. Il n'y a pas de différence significative du nombre de follicules ovariens chez les souris âgées de 4 semaines, 6 semaines, 6 mois et 1 an et ce, pour tous les types de follicules

(figure 11). On peut quand même constater que la folliculogénèse est normale étant donné que l'on peut voir une diminution du nombre de follicules avec l'âge. Par contre, la délétion de Hyal-1 a eu un effet significatif sur la folliculogénèse (figure 15). On peut observer que le nombre de follicules primordiaux, primaires et même secondaires augmente de façon significative ($p < 0.05$) chez les souris âgées de 6 semaines. La folliculogénèse demeure normale également car on voit une diminution du nombre de follicules avec l'âge. Ces résultats, mis ensemble avec les résultats obtenus récemment (168), nous amènent à suggérer que Hyal-1 joue un rôle dans l'élimination de petits follicules antraux chez les souris pré-pubères générant ainsi un recrutement des follicules primordiaux dans le pool de follicules grandissants. Par contre, chez les souris plus âgées, les actions de la FSH et de la LH sont plus prédominantes, ce qui compense pour l'effet de la délétion de Hyal-1, et le nombre de follicules chez les souris âgées de 6 mois et 1 an n'est plus significativement différent entre les souris déficientes de Hyal-1 et les souris sauvages. De plus, il est attendu que les souris plus âgées soit moins affectées par la délétion de Hyal-1 étant donné que le niveau d'expression de cette enzyme est diminué chez les souris ayant passé la puberté (168). Nous suggérons donc que les hyaluronidases jouent un rôle dans les phases du début de la folliculogénèse impliquées dans le recrutement initial et non pas au niveau du recrutement cyclique où les gonadotropines jouent un rôle dans le développement des follicules et l'ovulation (2, 6). De la même façon, on peut se permettre de penser aussi que l'enzyme agit au moment où la souris est en âge de concevoir étant donné que les effets observés sont chez les souris âgées de 4 à 6 semaines. Il serait d'autant plus intéressant d'analyser la folliculogénèse chez les souris âgées de 8 semaines et 3 mois afin de voir jusqu'à quel âge cet effet persiste. Dans un même ordre d'idée, il serait intéressant également d'analyser la folliculogénèse chez les souris plus jeunes que 4 semaines ou chez les souris venant juste d'être nées afin de voir à quel moment ce phénotype commence.

Notre laboratoire a établi un modèle pour l'atrésie des follicules ovariens chez les souris en se basant sur un modèle déjà utilisé pour le rat dans lequel l'action de eCG est bloquée par l'administration d'un anticorps anti-eCG (168, 175). Les résultats obtenus avec les souris sauvages étaient en accord avec les résultats obtenus avec le modèle du rat dans lequel une augmentation du niveau d'apoptose des cellules de la granulosa et une augmentation de follicules antraux atrétiques étaient observées (175). Nous avons donc décidé d'utiliser ce modèle dans la présente étude avec les souris déficientes de Hyal-3 ou de Hyal-1 pour voir leur effet sur le niveau d'apoptose des cellules de la granulosa dans une situation d'atrésie. Les souris utilisées sont des souris immatures âgées de 19-21 jours. En utilisant des souris aussi jeunes, nous évitons ainsi les variations de FSH causées par l'hormone endogène, ce qui nous donnait donc un contrôle sur le niveau de gonadotropines présent dans la souris. Le modèle a bien fonctionné étant donné qu'on peut observer une augmentation significative du nombre de cellules de la granulosa apoptotiques autant chez les souris Hyal-3 +/+ (figure 12) et -/- que chez les souris Hyal-1 +/+ et -/- (figure 16). Chez les souris déficientes de Hyal-3, le niveau d'apoptose des cellules de la granulosa n'est pas significativement différent de celui des souris Hyal-3 +/+ dans le groupe anti-eCG. Par contre, chez les souris déficientes de Hyal-1, le niveau d'apoptose des cellules de la granulosa est significativement moins élevé que chez les souris Hyal-1 +/+ dans le groupe anti-eCG. Ces résultats indiquent que les souris déficientes de Hyal-1 immatures avaient plus de follicules en santé pouvant être activées par eCG et qui étaient moins susceptibles d'aller en apoptose même en condition de retrait de l'eCG par un traitement avec l'anticorps anti-eCG. Par contre, il est possible que les follicules préantraux et/ou les petits follicules antraux des souris immatures déficientes de Hyal-1 répondent moins bien au traitement eCG/anti-eCG que les follicules des souris sauvages résultant ainsi en une moins grande induction de l'apoptose.

Cette possibilité a été vérifiée par les résultats obtenus dans nos expériences d'induction de l'ovulation par hCG chez les souris immatures

traitées avec eCG. Nous avons démontré que les souris déficientes de Hyal-1 (figure 17) mais pas les souris déficientes de Hyal-3 (figure 13) avaient un nombre plus élevés d'ovocytes produits que chez les souris sauvages, suggérant ainsi que les follicules préantraux et/ou les petits follicules antraux des souris immatures déficientes de Hyal-1 étaient plus en santé et répondaient mieux au traitement par eCG et hCG. De cette façon, il y avait un nombre plus grand de follicules recrutés pour l'ovulation. Ces résultats mis ensemble nous indiquent que l'expression de Hyal-1 chez les souris immatures femelles est un régulateur négatif de la croissance des follicules. Étant donné que nous n'avons pas vu de différence dans le nombre de follicules antraux et dans le nombre de follicules atrétiques autant chez les souris jeunes que chez les souris plus âgées, ni dans le nombre de follicules de tous les types chez les souris plus âgées, nous suggérons donc que cette enzyme a un patron d'expression synchronisé et spécifique, coïncidant avec les phases du recrutement initial de la folliculogénèse.

Dans un même ordre d'idée, on pourrait se demander pourquoi il n'y a pas de différence dans le nombre de follicules antraux ou atrétiques chez les souris déficientes de Hyal-1 et les souris sauvages malgré le fait que lors d'une induction de l'atrésie, nous observons, de façon significative, une moins grande apoptose des cellules de la granulosa. De façon générale, le nombre de follicules antraux n'est pas très élevé, que ce soit chez les souris sauvages ou les souris déficientes de Hyal-1, et il est donc difficile d'observer une différence significative dans une situation physiologique. Il serait intéressant d'effectuer le décompte des follicules antraux en santé et antraux atrétiques chez les souris déficientes de Hyal-1 ayant reçu le traitement eCG/anti-eCG afin de voir si les follicules antraux sont moins grandement affectés par l'atrésie que chez les souris sauvages. Lors d'une induction de l'atrésie des follicules ovariens par le traitement avec eCG et l'anticorps anti-eCG, il y a une plus grande stimulation de croissance des follicules, ce qui permet d'en avoir un plus grand nombre. De plus, nous avons démontré auparavant que Hyal-1 est exprimé de façon préférentielle dans les petits follicules antraux chez les souris immatures. Ce

type de follicule répondrait mieux au traitement eCG/anti-eCG, donnant ainsi les résultats significatifs obtenus lors de l'induction de l'atrésie chez les souris immatures (figure 16).

Les résultats obtenus avec les souris déficientes de Hyal-3, montrant une folliculogénèse et une fonction ovarienne normale (figures 11, 12 et 13), étaient assez inattendus. De la même façon que Hyal-1, cette enzyme a été démontrée induire l'apoptose des cellules de la granulosa et être impliquée dans l'atrésie des follicules ovariens. Les expériences effectuées avec le modèle d'induction d'atrésie chez les souris sauvages ont démontré que les follicules antraux atrétiques avaient une expression augmentée de Hyal-1, Hyal-2 et Hyal-3 indiquant ainsi que l'expression des hyaluronidases est liée à l'augmentation de l'apoptose des cellules de la granulosa (168). Bien entendu, ce modèle n'est pas le reflet d'une situation physiologique normale dans un organisme, ce qui pourrait expliquer pourquoi Hyal-3, même si exprimée dans les follicules atrétiques dans une situation d'induction de l'atrésie, n'a pas d'effet sur l'apoptose des cellules de la granulosa et dans la fonction ovarienne dans la présente étude. Cette enzyme a un bas niveau d'expression comparativement à celui de Hyal-1 ou de Hyal-2 dans l'organisme, incluant les cellules de la granulosa (10 fois moins) (130, 168, 184). Des travaux récents effectués par Dr Triggs-Raine utilisant des cellules surexprimant Hyal-3 (185) ainsi que les travaux d'autres laboratoires (186) ont démontré que Hyal-3 ne possède pas d'activité hyaluronidase. Même si Hyal-3 n'a pas d'activité enzymatique intrinsèque, l'expression de Hyal-1 était augmentée dans les cellules surexprimant Hyal-3 (185). Les travaux effectués avec les souris déficientes de Hyal-1 dans le laboratoire de Dr Triggs-Raine ont démontré que ces souris avaient une augmentation du niveau de l'ARNm de *Hyal3* (146). Cette interaction réciproque entre l'activité de Hyal-1 et l'expression de *Hyal3* pourrait indiquer un rôle coopératif pour Hyal-1 et Hyal-3. Il est aussi possible que les fonctions de Hyal-3 dépendent de la présence de cofacteurs spécifiques au type de cellule. En absence de Hyal-3, il est donc probable que Hyal-1 compense pour l'effet de Hyal-3 et vice versa. En effet, lorsque nous avons analysé

l'expression de *Hyal1* et *Hyal2* chez les souris déficientes de Hyal-3, nous avons pu remarquer une augmentation de l'expression de Hyal-1 (figure 14).

Dans le recrutement initial, les follicules primordiaux dormants sont recrutés dans le pool grandissant de follicules de façon continue jusqu'au début du stade antral, très tôt avant le début de la puberté (1). Même si il y a une bonne évidence que les gonadotropines influencent la progression des follicules nouvellement antraux (33, 34), leur rôle est considéré comme étant permissifs plutôt qu'essentiels. Il est proposé que des facteurs locaux, incluant plusieurs membres de la famille TGF- β , régulent la transition primaire à secondaire des follicules et la croissance subséquente jusqu'au début du stade antral. Les membres locaux de la famille TGF- β impliqués comme régulateurs positifs de la croissance des follicules pré-antraux incluent GDF-9 et BMP-15 des ovocytes; activines et TGF- β des cellules de la granulosa; BMP-4, BMP-7 et TGF- β des cellules de la thèque. Par opposition, de fortes évidences indiquent un rôle négatif de AMH des cellules de la granulosa dans le développement des follicules pré-antraux (32). Nos résultats suggèrent que Hyal-1 régule de façon négative le développement des follicules préantraux, de façon similaire à l'AMH et contrairement à TGF- β et l'activine, des facteurs exprimés dans les cellules de la granulosa tout comme Hyal-1. Dans le cas de Hyal-1, ce contrôle négatif implique l'apoptose des cellules de la granulosa et l'atrésie des follicules ovariens. La délétion de Hyal-1 pourrait influencer l'expression et/ou l'action de ces membres de la superfamille des TGF- β amenant ainsi un maintien prolongé de la phase de recrutement initial et l'accumulation de follicules primordiaux, primaires et secondaires. La délétion de Hyal-1 pourrait donc interférer dans la balance de ces facteurs afin de réguler la folliculogénèse. Des études récentes ont démontré que l'expression et l'action de TGF- β peuvent altérer l'expression des hyaluronan synthases ou des hyaluronidases dans des fibroblastes de peau (187, 188). De plus, l'antagonisme fonctionnel entre TGF- β et les hyaluronidases a été démontré (189-191). Il est donc possible que dans l'ovaire, la voie de signalisation de TGF- β et celle de HA ou des hyaluronidases

soient associées ou inter-reliées. Des expériences en cours dans le laboratoire cherchent à analyser le niveau d'expression des protéines de la superfamille des TGF- β et aussi de leurs récepteurs dans les cellules de la granulosa des souris déficientes de Hyal-1 comparativement aux souris sauvages.

Nos résultats démontrant un faible phénotype chez les souris déficientes de Hyal-1 ainsi que l'absence de phénotype distinct chez les souris déficientes de Hyal-3 sont en accord avec les travaux récemment publiés sur la caractérisation de ces animaux (146, 167). Les auteurs ont démontré que les souris déficientes de Hyal-1 présentaient des signes d'ostéoarthrite mais pas d'élévation du niveau sérique de HA ni d'autres caractéristiques plus sévères présentes chez les patients atteints de mucopolysaccharidose IX ayant une mutation de Hyal-1 (146). Concernant les souris déficientes de Hyal-3, les auteurs n'ont pas observé de changements au niveau du phénotype ni d'accumulation de HA et en ont conclu que cette enzyme ne joue pas un rôle dans la dégradation des glycosaminoglycans (167). Il est possible que dans ces deux modèles d'animaux déficients des hyaluronidases utilisés dans ces études, l'effet de Hyal-2 pourrait compenser en partie ou totalement les actions de Hyal-1 ou de Hyal-3, respectivement, dans les ovaires. Il sera intéressant d'étudier la fonction ovarienne chez les souris déficientes des trois hyaluronidases, Hyal-1, Hyal-2 et Hyal-3.

Nous avons donc décidé de générer une souris déficiente de ces trois hyaluronidases spécifiquement dans les ovaires. De cette façon, il n'y aura pas d'effet compensatoire et nous pourrons étudier l'effet de la délétion de Hyal-2 dans les ovaires. Afin de créer cette souris transgénique, nous devons premièrement construire un plasmide contenant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de Inhibin- α . Le fragment de 6 kb du promoteur de Inhibin- α cible l'expression d'un transgène dans les cellules interstitielles et le corpus luteum de même que dans les cellules de la granulosa et theca des follicules secondaires, préantraux et antraux (174). La Cre recombinase quant à elle est une enzyme qui va se lier à deux séquences d'ADN spécifiques,

appelées *lox P*, bordant la région d'ADN cible, et va ensuite couper ces sites à la moitié et coller ensemble les deux autres moitiés restantes lorsque le fragment d'ADN cible est enlevé (173). Dans la présente étude, nous avons réussi à construire le plasmide contenant la Cre recombinase sous le contrôle du fragment de 6 kb du promoteur de *Inhibin- α* (figures 18 à 20). La deuxième étape consistera à construire un plasmide contenant les deux séquences *lox P* en amont de la séquence de *Hyal2* et en aval de la séquence de *Hyal-3* (voir figure 8 de la section Introduction) afin de générer une souris transgénique. Les deux souris transgéniques une fois accouplées donneront des bébés souris transgéniques n'ayant pas l'expression de *Hyal1*, *Hyal2* et *Hyal3* au niveau des follicules ovariens. Chez ces souris, la folliculogénèse, le niveau d'apoptose et le niveau de fertilité de ces souris seront analysés, de la même façon qu'avec les souris déficientes de *Hyal-3* ou de *Hyal-1*. Étant donné que nous avons observé un phénotype chez la souris déficiente de *Hyal-1* et que ce phénotype n'était pas présent chez la souris déficiente de *Hyal-3*, probablement dû à un effet compensatoire de la part de *Hyal-1*, il est naturel de penser que les souris déficientes des trois hyaluronidases auront un phénotype semblable, sinon plus fort, que celui observé chez les souris déficientes de *Hyal-1*.

4.1. Applications et perspectives

D'après l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), 15 % environ des couples en âge de procréer consultent pour une possible infertilité, généralement après deux années d'essais infructueux. Les causes du problème peuvent provenir de la femme comme de l'homme. De façon générale, l'origine de l'infertilité est exclusivement féminine dans 30 à 40 % des cas, exclusivement masculine dans 10 à 30 % des cas, ou due à l'association d'anomalies décelables chez les deux partenaires dans 15 à 30 % des cas. Les défaillances de l'ovulation constituent la cause d'infertilité la plus courante chez les femmes. Plus de 40 % des femmes infertiles présentent des troubles de l'ovulation. Le cycle ovarien normal est si complexe que même les anomalies

les plus minimes peuvent perturber le cycle et empêcher l'ovulation. Les traitements actuels contre l'infertilité chez la femme consistent à l'induction de l'ovulation à l'aide du citrate de clomifène, qui stimule la libération de la GnRH (gonadotropin releasing hormone), et si ce traitement s'avère inefficace, il y aura traitement avec les gonadotropines FSH et LH. Si toutefois le traitement avec les gonadotropines n'est pas couronné de succès, le couple doit avoir recours à la procréation assistée (192). La procréation assistée est une technique assez invasive qui pourrait être évitée si le problème d'infertilité chez la femme était relié avec les hyaluronidases ou des membres de la famille des TGF- β . Si une surexpression des hyaluronidases était la cause de cette infertilité, une approche pharmaceutique serait peut-être plus envisageable et moins invasive que la procréation assistée. Une approche visant la création d'inhibiteurs de hyaluronidases spécifiques (non disponibles à ce jour) ou encore la technologie des RNA interférences qui régulent à la baisse l'expression d'un gène pourrait être des avenues intéressantes.

Les études effectuées avec les inhibiteurs des hyaluronidases jusqu'à maintenant ont été faites pour la plupart avec les hyaluronidases testiculaires, de venin de serpent et de venin d'abeille et démontraient leur effet inhibiteur sur l'activité enzymatique des hyaluronidases (193). Or nos travaux montrent que l'effet sur l'apoptose des cellules de la granulosa et sur l'atrésie des follicules ovariens ne serait pas dû à l'activité enzymatique des hyaluronidases. Une mutation du domaine catalytique de Hyal-1 pouvait toujours induire la voie d'apoptose extrinsèque dans les cultures de cellules de la granulosa (168). Il serait donc intéressant de faire des études afin de trouver des inhibiteurs qui cibleraient tout d'abord les hyaluronidases des ovaires, comme Hyal-1, qui semble tout désignée vu les résultats obtenus avec la délétion de celle-ci dans la présente étude. Par la suite, il serait intéressant de trouver une molécule qui inhiberait non pas son domaine catalytique mais plutôt son domaine EGF, qui pourrait être le domaine hypothétiquement responsable de l'apoptose des cellules de la granulosa.

Dans la présente étude, le deuxième objectif était de créer une souris transgénique déficiente des trois hyaluronidases des ovaires, Hyal-1, Hyal-2 et Hyal-3, et ce, spécifiquement au niveau des ovaires. La création de cette souris nécessite deux étapes. Tout d'abord, la première étape consistait en la genèse d'une souris possédant le gène *Cre* sous le contrôle du promoteur de 6 kb de *Inhibin- α* . J'ai effectué cette première étape pour mon projet de maîtrise. La deuxième étape sera de créer une souris contenant les deux séquences *lox P* bordant la région que nous désirons enlever, soit la région de 20 kb du chromosome 9 de la souris contenant Hyal-2, Hyal-1 et Hyal-3.

Les deux plasmides construits pour ce projet afin de produire des souris transgéniques sont tous les deux intéressants dans le sens où il sera possible de les utiliser pour divers projets de recherche, tant pour notre laboratoire que pour la communauté scientifique en général. En effet, une souris transgénique exprimant la CRE sous le contrôle de *Inhibin- α* pourrait permettre des études de différents gènes au niveau des gonades en combinaison avec une autre souris transgénique ayant des séquences *lox P* bordant une région d'intérêt. De la même façon, une souris transgénique ayant les séquences *lox P* de part et d'autre de la région chromosomique contenant Hyal-2, Hyal-1 et Hyal-3 sur le chromosome 9 permettrait l'étude de ces trois hyaluronidases ailleurs dans l'organisme en combinaison avec une autre souris transgénique exprimant un promoteur propre à un organe en particulier.

Les perspectives à court terme dans le laboratoire seront d'analyser la folliculogénèse chez les souris déficientes de Hyal-1 âgées de 8 semaines et 3 mois, étant donné qu'un phénotype est observé à 4 et 6 semaines, et aussi chez les souris plus jeunes pour savoir à quel moment ce phénotype commence. Également, l'expression des différents membres de la famille des TGF- β chez les souris déficientes de Hyal-3 ou Hyal-1 sera analysée. Il serait intéressant également de faire des expériences avec des cultures de cellules de la granulosa provenant de ces souris afin de vérifier *in vitro* la réponse de ces cellules aux stimuli d'apoptose et d'analyser les voies de signalisation activées.

A moyen ou à long terme, il sera intéressant d'évaluer la fertilité des souris déficientes de Hyal-3 ou Hyal-1 en accouplant ces femelles avec des mâles n'ayant subi aucune modification génique et de comptabiliser le nombre de souriceaux par portées. Il serait également pertinent de refaire l'expérience d'évaluation du niveau d'expression de *Hyal1* et *Hyal-2* chez la souris déficiente de Hyal-3 avec d'autres souris afin d'augmenter l'échantillonnage et porter de meilleures conclusions. Une autre perspective à moyen terme sera de faire la construction du plasmide contenant les deux séquences *loxP* bordant la région contenant *Hyal2*, *Hyal1* et *Hyal3* (figure 8) afin de poursuivre les étapes menant à la création de la souris ayant un « knock-out » ayant ledit plasmide et éventuellement, la souris déficiente des trois hyaluronidases, Hyal-1, -2 et -3, spécifiquement au niveau des ovaires, après accouplement avec la souris transgénique Inhibin-CRE. Les perspectives à plus long terme regroupent évidemment les expériences qui seront effectuées avec ces deux types souris.

4.2. Conclusion

En conclusion, ces travaux nous ont permis de déterminer le rôle que peuvent avoir les hyaluronidases dans la folliculogénèse et la fonction ovarienne. Même si les résultats chez les souris déficientes de Hyal-3 ne démontrent pas un rôle de cette enzyme dans la fonction ovarienne, nos travaux ont quand même contribué à l'étude de cette enzyme. Peu est connu sur cette enzyme, mais les récents travaux effectués chez la souris déficientes de Hyal-3 (167) ainsi que la présente étude apportent une contribution à ce sujet.

Les résultats obtenus chez la souris déficiente de Hyal-1 ont démontré que la délétion de cette enzyme avait un effet positif sur la folliculogénèse chez les souris jeunes particulièrement au niveau des phases du recrutement initial. Cet effet de Hyal-1 serait possiblement en relation avec les membres de la superfamille des TGF- β et/ou l'action de ceux-ci dans la folliculogénèse.

Le fait qu'il puisse y avoir une possible compensation entre Hyal-1 et Hyal-3 dans la fonction ovarienne rend intéressante l'avenue d'une souris transgénique déficiente des trois hyaluronidases, Hyal-1, Hyal-2 et Hyal-3, spécifiquement dans les ovaires. De cette façon, le rôle des trois enzymes pourra être élucidé de façon plus spécifique et plus claire.

5. Bibliographie:

1. McGee, E. A., and Hsueh, A. J. (2000) Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles, *Endocrine reviews* 21, 200-214.
2. Woodruff, T. K., and Shea, L. D. (2007) The role of the extracellular matrix in ovarian follicle development, *Reprod Sci* 14, 6-10.
3. Gougeon, A. (1996) Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses, *Endocrine reviews* 17, 121-155.
4. Hirshfield, A. N. (1991) Development of follicles in the mammalian ovary, *International review of cytology* 124, 43-101.
5. Hoyer, P. B., Devine, P.J. (2001) Endocrinology and Toxicology: The Female Reproductive System, in *Handbook of Toxicology* (Derelanko, M. J., Hollinger, M.A., Ed.) Second ed., pp 573-596, CRC Press, Boca Raton FL.
6. Fauser, B. C., and Van Heusden, A. M. (1997) Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences, *Endocrine reviews* 18, 71-106.
7. Bristol-Gould, S., and Woodruff, T. K. (2006) Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*), *Theriogenology* 66, 5-13.
8. Harrington, A. E., Morris-Triggs, S. A., Ruotolo, B. T., Robinson, C. V., Ohnuma, S., and Hyvonen, M. (2006) Structural basis for the inhibition of activin signalling by follistatin, *EMBO J* 25, 1035-1045.
9. Thompson, T. B., Lerch, T. F., Cook, R. W., Woodruff, T. K., and Jardetzky, T. S. (2005) The structure of the follistatin:activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding, *Dev Cell* 9, 535-543.
10. Lerch, T. F., Xu, M., Jardetzky, T. S., Mayo, K. E., Radhakrishnan, I., Kazer, R., Shea, L. D., and Woodruff, T. K. (2007) The structures that underlie normal reproductive function, *Mol Cell Endocrinol* 267, 1-5.
11. Meijs-Roelofs, H. M., van Cappellen, W. A., van Leeuwen, E. C., and Kramer, P. (1990) Short- and long-term effects of an LHRH antagonist

- given during the prepubertal period on follicle dynamics in the rat, *The Journal of endocrinology* 124, 247-253.
12. Gosden, R. G., Laing, S. C., Felicio, L. S., Nelson, J. F., and Finch, C. E. (1983) Imminent oocyte exhaustion and reduced follicular recruitment mark the transition to acyclicity in aging C57BL/6J mice, *Biology of reproduction* 28, 255-260.
 13. Gougeon, A., and Testart, J. (1990) Influence of human menopausal gonadotropin on the recruitment of human ovarian follicles, *Fertility and sterility* 54, 848-852.
 14. Rombauts, L., Suikkari, A. M., MacLachlan, V., Trounson, A. O., and Healy, D. L. (1998) Recruitment of follicles by recombinant human follicle-stimulating hormone commencing in the luteal phase of the ovarian cycle, *Fertility and sterility* 69, 665-669.
 15. Trounson, A., Anderiesz, C., Jones, G. M., Kausche, A., Lolatgis, N., and Wood, C. (1998) Oocyte maturation, *Human reproduction (Oxford, England)* 13 Suppl 3, 52-62; discussion 71-55.
 16. Tsafiriri, A. (1997) Follicular development: impact on oocyte quality., in *FSH Action and Intraovarian Regulation* (BCJM, F., Ed.), pp 83-105, Parthenon Press, New York.
 17. Nilsson, E. E., Kezele, P., and Skinner, M. K. (2002) Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries, *Mol Cell Endocrinol* 188, 65-73.
 18. Nilsson, E. E., and Skinner, M. K. (2003) Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development, *Biology of reproduction* 69, 1265-1272.
 19. Nilsson, E. E., and Skinner, M. K. (2004) Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition, *Mol Cell Endocrinol* 214, 19-25.
 20. Kezele, P., Nilsson, E. E., and Skinner, M. K. (2005) Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition, *Biology of reproduction* 73, 967-973.

21. Lee, W. S., Otsuka, F., Moore, R. K., and Shimasaki, S. (2001) Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat, *Biology of reproduction* 65, 994-999.
22. Bodensteiner, K. J., Clay, C. M., Moeller, C. L., and Sawyer, H. R. (1999) Molecular cloning of the ovine Growth/Differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries, *Biology of reproduction* 60, 381-386.
23. Elvin, J. A., Yan, C., and Matzuk, M. M. (2000) Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility, *Mol Cell Endocrinol* 159, 1-5.
24. Jaatinen, R., Laitinen, M. P., Vuojolainen, K., Aaltonen, J., Louhio, H., Heikinheimo, K., Lehtonen, E., and Ritvos, O. (1999) Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homolog GDF-9B, *Mol Cell Endocrinol* 156, 189-193.
25. McGrath, S. A., Esquela, A. F., and Lee, S. J. (1995) Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9, *Mol Endocrinol* 9, 131-136.
26. McNatty, K. P., Juengel, J. L., Wilson, T., Galloway, S. M., and Davis, G. H. (2001) Genetic mutations influencing ovulation rate in sheep, *Reprod Fertil Dev* 13, 549-555.
27. Carabatsos, M. J., Elvin, J., Matzuk, M. M., and Albertini, D. F. (1998) Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice, *Dev Biol* 204, 373-384.
28. Dong, J., Albertini, D. F., Nishimori, K., Kumar, T. R., Lu, N., and Matzuk, M. M. (1996) Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis, *Nature* 383, 531-535.
29. Solloway, M. J., Dudley, A. T., Bikoff, E. K., Lyons, K. M., Hogan, B. L., and Robertson, E. J. (1998) Mice lacking Bmp6 function, *Dev Genet* 22, 321-339.
30. Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F. J., Elvin, J. A., Carino, C., Prasad, S. V., Skinner, S. S., Dunbar, B. S., Dube, J. L., Celeste, A. J.,

- and Matzuk, M. M. (2001) Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function, *Mol Endocrinol* 15, 854-866.
31. Durlinger, A. L., Visser, J. A., and Themmen, A. P. (2002) Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone, *Reproduction* 124, 601-609.
 32. Knight, P. G., and Glister, C. (2006) TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development, *Reproduction* 132, 191-206.
 33. Cortvrindt, R., Smits, J., and Van Steirteghem, A. C. (1997) Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture in vitro, *Human reproduction (Oxford, England)* 12, 759-768.
 34. Dufour, J., Cahill, L. P., and Mauleon, P. (1979) Short- and long-term effects of hypophysectomy and unilateral ovariectomy on ovarian follicular populations in sheep, *Journal of reproduction and fertility* 57, 301-309.
 35. Hanrahan, J. P., Gregan, S. M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G. H., Powell, R., and Galloway, S. M. (2004) Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*), *Biology of reproduction* 70, 900-909.
 36. Hayashi, M., McGee, E. A., Min, G., Klein, C., Rose, U. M., van Duin, M., and Hsueh, A. J. (1999) Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles, *Endocrinology* 140, 1236-1244.
 37. Hreinsson, J. G., Scott, J. E., Rasmussen, C., Swahn, M. L., Hsueh, A. J., and Hovatta, O. (2002) Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87, 316-321.

38. Juengel, J. L., Hudson, N. L., Heath, D. A., Smith, P., Reader, K. L., Lawrence, S. B., O'Connell, A. R., Laitinen, M. P., Cranfield, M., Groome, N. P., Ritvos, O., and McNatty, K. P. (2002) Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep, *Biology of reproduction* 67, 1777-1789.
39. Nilsson, E. E., and Skinner, M. K. (2002) Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development, *Biology of reproduction* 67, 1018-1024.
40. Wang, J., and Roy, S. K. (2004) Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle-stimulating hormone, *Biology of reproduction* 70, 577-585.
41. Otsuka, F., Yao, Z., Lee, T., Yamamoto, S., Erickson, G. F., and Shimasaki, S. (2000) Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions, *The Journal of biological chemistry* 275, 39523-39528.
42. Drummond, A. E., Le, M. T., Ethier, J. F., Dyson, M., and Findlay, J. K. (2002) Expression and localization of activin receptors, Smads, and beta glycan to the postnatal rat ovary, *Endocrinology* 143, 1423-1433.
43. Li, R., Phillips, D. M., and Mather, J. P. (1995) Activin promotes ovarian follicle development in vitro, *Endocrinology* 136, 849-856.
44. Liu, X., Andoh, K., Abe, Y., Kobayashi, J., Yamada, K., Mizunuma, H., and Ibuki, Y. (1999) A comparative study on transforming growth factor-beta and activin A for preantral follicles from adult, immature, and diethylstilbestrol-primed immature mice, *Endocrinology* 140, 2480-2485.
45. Matzuk, M. M., Finegold, M. J., Su, J. G., Hsueh, A. J., and Bradley, A. (1992) Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice, *Nature* 360, 313-319.
46. Matzuk, M. M., Kumar, T. R., Shou, W., Coerver, K. A., Lau, A. L., Behringer, R. R., and Finegold, M. J. (1996) Transgenic models to study the roles of inhibins and activins in reproduction, oncogenesis, and

- development, *Recent progress in hormone research* 51, 123-154; discussion 155-127.
47. McNatty, K. P., Fidler, A. E., Juengel, J. L., Quirke, L. D., Smith, P. R., Heath, D. A., Lundy, T., O'Connell, A., and Tisdall, D. J. (2000) Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function, *Mol Cell Endocrinol* 163, 11-20.
 48. Pangas, S. A., Rademaker, A. W., Fishman, D. A., and Woodruff, T. K. (2002) Localization of the activin signal transduction components in normal human ovarian follicles: implications for autocrine and paracrine signaling in the ovary, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87, 2644-2657.
 49. Rabinovici, J., Goldsmith, P. C., Roberts, V. J., Vaughan, J., Vale, W., and Jaffe, R. B. (1991) Localization and secretion of inhibin/activin subunits in the human and subhuman primate fetal gonads, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 73, 1141-1149.
 50. Smitz, J., and Cortvrindt, R. (1998) Inhibin A and B secretion in mouse preantral follicle culture, *Human reproduction (Oxford, England)* 13, 927-935.
 51. Smitz, J., Cortvrindt, R., Hu, Y., and Vanderstichele, H. (1998) Effects of recombinant activin A on in vitro culture of mouse preantral follicles, *Mol Reprod Dev* 50, 294-304.
 52. Zhao, J., Taverne, M. A., van der Weijden, G. C., Bevers, M. M., and van den Hurk, R. (2001) Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II, *Biology of reproduction* 65, 967-977.
 53. Erickson, G. F., and Shimasaki, S. (2003) The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle, *Reprod Biol Endocrinol* 1, 9.
 54. Lee, W. S., Yoon, S. J., Yoon, T. K., Cha, K. Y., Lee, S. H., Shimasaki, S., Lee, S., and Lee, K. A. (2004) Effects of bone morphogenetic protein-

- 7 (BMP-7) on primordial follicular growth in the mouse ovary, *Mol Reprod Dev* 69, 159-163.
55. Fortune, J. E. (2003) The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles, *Anim Reprod Sci* 78, 135-163.
56. Juengel, J. L., and McNatty, K. P. (2005) The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development, *Hum Reprod Update* 11, 143-160.
57. Roy, S. K., and Kole, A. R. (1998) Ovarian transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptors: in-vitro effects of follicle stimulating hormone, epidermal growth factor and TGF-beta on receptor expression in human preantral follicles, *Mol Hum Reprod* 4, 207-214.
58. Schmid, P., Cox, D., van der Putten, H., McMaster, G. K., and Bilbe, G. (1994) Expression of TGF-beta s and TGF-beta type II receptor mRNAs in mouse folliculogenesis: stored maternal TGF-beta 2 message in oocytes, *Biochemical and biophysical research communications* 201, 649-656.
59. Teerds, K. J., and Dorrington, J. H. (1992) Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 during follicular development in the adult rat ovary, *Mol Cell Endocrinol* 84, R7-13.
60. Durlinger, A. L., Gruijters, M. J., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H. A., Nachtigal, M. W., Uilenbroek, J. T., Grootegoed, J. A., and Themmen, A. P. (2002) Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary, *Endocrinology* 143, 1076-1084.
61. Durlinger, A. L., Gruijters, M. J., Kramer, P., Karels, B., Kumar, T. R., Matzuk, M. M., Rose, U. M., de Jong, F. H., Uilenbroek, J. T., Grootegoed, J. A., and Themmen, A. P. (2001) Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary, *Endocrinology* 142, 4891-4899.

62. Visser, J. A., and Themmen, A. P. (2005) Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis, *Mol Cell Endocrinol* 234, 81-86.
63. Zeleznik, A., and Benyo, D. (1994) Control of follicular development, corpus luteum function, and the recognition of pregnancy in higher primates., in *The Physiology of Reproduction* (Knobil, E., and Neill, J., Eds.), pp 751-782, Raven Press, New York.
64. Evans, A. C., and Fortune, J. E. (1997) Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors, *Endocrinology* 138, 2963-2971.
65. Bao, B., Garverick, H. A., Smith, G. W., Smith, M. F., Salfen, B. E., and Youngquist, R. S. (1997) Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles, *Biology of reproduction* 56, 1158-1168.
66. Xu, Z., Garverick, H. A., Smith, G. W., Smith, M. F., Hamilton, S. A., and Youngquist, R. S. (1995) Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave, *Biology of reproduction* 53, 951-957.
67. diZerega, G. S., and Hodgen, G. D. (1981) Folliculogenesis in the primate ovarian cycle, *Endocrine reviews* 2, 27-49.
68. Adashi, E. Y. (1995) Insulin-like growth factors as determinants of follicular fate, *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 2, 721-726.
69. Giudice, L. C. (1992) Insulin-like growth factors and ovarian follicular development, *Endocrine reviews* 13, 641-669.
70. diZerega, G. S., and Hodgen, G. D. (1980) The primate ovarian cycle: suppression of human menopausal gonadotropin-induced follicular growth in the presence of the dominant follicle, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 50, 819-825.

71. Hsueh, A. J., Adashi, E. Y., Jones, P. B., and Welsh, T. H., Jr. (1984) Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells, *Endocrine reviews* 5, 76-127.
72. Harlow, C. R., Shaw, H. J., Hillier, S. G., and Hodges, J. K. (1988) Factors influencing follicle-stimulating hormone-responsive steroidogenesis in marmoset granulosa cells: effects of androgens and the stage of follicular maturity, *Endocrinology* 122, 2780-2787.
73. Gore, M. A., Nayudu, P. L., and Vlaisavljevic, V. (1997) Attaining dominance in vivo: distinguishing dominant from challenger follicles in humans, *Human reproduction (Oxford, England)* 12, 2741-2747.
74. Irving-Rodgers, H. F., and Rodgers, R. J. (2005) Extracellular matrix in ovarian follicular development and disease, *Cell Tissue Res* 322, 89-98.
75. Salustri, A., Yanagishita, M., and Hascall, V. C. (1989) Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification, *The Journal of biological chemistry* 264, 13840-13847.
76. Kobayashi, H., Sun, G. W., and Terao, T. (1999) Immunolocalization of hyaluronic acid and inter-alpha-trypsin inhibitor in mice, *Cell Tissue Res* 296, 587-597.
77. Salustri, A., Yanagishita, M., Underhill, C. B., Laurent, T. C., and Hascall, V. C. (1992) Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle, *Dev Biol* 151, 541-551.
78. Fulop, C., Salustri, A., and Hascall, V. C. (1997) Coding sequence of a hyaluronan synthase homologue expressed during expansion of the mouse cumulus-oocyte complex, *Arch Biochem Biophys* 337, 261-266.
79. Elvin, J. A., Clark, A. T., Wang, P., Wolfman, N. M., and Matzuk, M. M. (1999) Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary, *Mol Endocrinol* 13, 1035-1048.

80. Richards, J. S. (2001) New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells, *Mol Endocrinol* 15, 209-218.
81. Conti, M. (2002) Specificity of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signal in granulosa cell function, *Biology of reproduction* 67, 1653-1661.
82. Wayne, C. M., Fan, H. Y., Cheng, X., and Richards, J. S. (2007) Follicle-stimulating hormone induces multiple signaling cascades: evidence that activation of Rous sarcoma oncogene, RAS, and the epidermal growth factor receptor are critical for granulosa cell differentiation, *Mol Endocrinol* 21, 1940-1957.
83. Peng, X. R., Hsueh, A. J., LaPolt, P. S., Bjersing, L., and Ny, T. (1991) Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation, *Endocrinology* 129, 3200-3207.
84. Ashkenazi, H., Cao, X., Motola, S., Popliker, M., Conti, M., and Tsafiriri, A. (2005) Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response, *Endocrinology* 146, 77-84.
85. Park, J. Y., Su, Y. Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S. L., and Conti, M. (2004) EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle, *Science (New York, N.Y)* 303, 682-684.
86. Sekiguchi, T., Mizutani, T., Yamada, K., Kajitani, T., Yazawa, T., Yoshino, M., and Miyamoto, K. (2004) Expression of epiregulin and amphiregulin in the rat ovary, *J Mol Endocrinol* 33, 281-291.
87. Andric, N., and Ascoli, M. (2006) A delayed gonadotropin-dependent and growth factor-mediated activation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 cascade negatively regulates aromatase expression in granulosa cells, *Mol Endocrinol* 20, 3308-3320.
88. Jo, M., and Curry, T. E., Jr. (2006) Luteinizing hormone-induced RUNX1 regulates the expression of genes in granulosa cells of rat periovulatory follicles, *Mol Endocrinol* 20, 2156-2172.

89. Orly, J., Rei, Z., Greenberg, N. M., and Richards, J. S. (1994) Tyrosine kinase inhibitor AG18 arrests follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell differentiation: use of reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for multiple messenger ribonucleic acids, *Endocrinology* 134, 2336-2346.
90. Tirone, E., D'Alessandris, C., Hascall, V. C., Siracusa, G., and Salustri, A. (1997) Hyaluronan synthesis by mouse cumulus cells is regulated by interactions between follicle-stimulating hormone (or epidermal growth factor) and a soluble oocyte factor (or transforming growth factor beta1), *The Journal of biological chemistry* 272, 4787-4794.
91. Panigone, S., Hsieh, M., Fu, M., Persani, L., and Conti, M. (2008) Luteinizing hormone signaling in preovulatory follicles involves early activation of the epidermal growth factor receptor pathway, *Mol Endocrinol* 22, 924-936.
92. Glister, C., Kemp, C. F., and Knight, P. G. (2004) Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin, *Reproduction* 127, 239-254.
93. Otsuka, F., Moore, R. K., Iemura, S., Ueno, N., and Shimasaki, S. (2001) Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15, *Biochemical and biophysical research communications* 289, 961-966.
94. Otsuka, F., Moore, R. K., and Shimasaki, S. (2001) Biological function and cellular mechanism of bone morphogenetic protein-6 in the ovary, *The Journal of biological chemistry* 276, 32889-32895.
95. Shimasaki, S., Zachow, R. J., Li, D., Kim, H., Iemura, S., Ueno, N., Sampath, K., Chang, R. J., and Erickson, G. F. (1999) A functional bone morphogenetic protein system in the ovary, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7282-7287.
96. Meyer, K. (1958) Chemical structure of hyaluronic acid, *Fed Proc* 17, 1075-1077.

97. Fraser, J. R., Laurent, T. C., and Laurent, U. B. (1997) Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover, *J Intern Med* 242, 27-33.
98. Laurent, T. C., and Fraser, J. R. (1992) Hyaluronan, *FASEB J* 6, 2397-2404.
99. Lee, J. Y., and Spicer, A. P. (2000) Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule, *Curr Opin Cell Biol* 12, 581-586.
100. McDonald, J. A., and Camenisch, T. D. (2002) Hyaluronan: genetic insights into the complex biology of a simple polysaccharide, *Glycoconj J* 19, 331-339.
101. Toole, B. P. (2000) Hyaluronan is not just a goo!, *J Clin Invest* 106, 335-336.
102. DeAngelis, P. L. (1999) Hyaluronan synthases: fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses, *Cell Mol Life Sci* 56, 670-682.
103. Itano, N., and Kimata, K. (2002) Mammalian hyaluronan synthases, *IUBMB Life* 54, 195-199.
104. Weigel, P. H., Hascall, V. C., and Tammi, M. (1997) Hyaluronan synthases, *The Journal of biological chemistry* 272, 13997-14000.
105. Weigel, P. H., and DeAngelis, P. L. (2007) Hyaluronan synthases: a decade-plus of novel glycosyltransferases, *The Journal of biological chemistry* 282, 36777-36781.
106. Spicer, A. P., and McDonald, J. A. (1998) Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family, *The Journal of biological chemistry* 273, 1923-1932.
107. Camenisch, T. D., Spicer, A. P., Brehm-Gibson, T., Biesterfeldt, J., Augustine, M. L., Calabro, A., Jr., Kubalak, S., Klewer, S. E., and McDonald, J. A. (2000) Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme, *J Clin Invest* 106, 349-360.
108. Knudson, C. B. (1993) Hyaluronan receptor-directed assembly of chondrocyte pericellular matrix, *J Cell Biol* 120, 825-834.

109. Evanko, S. P., Tammi, M. I., Tammi, R. H., and Wight, T. N. (2007) Hyaluronan-dependent pericellular matrix, *Adv Drug Deliv Rev* 59, 1351-1365.
110. Mow, V. C., Mak, A. F., Lai, W. M., Rosenberg, L. C., and Tang, L. H. (1984) Viscoelastic properties of proteoglycan subunits and aggregates in varying solution concentrations, *J Biomech* 17, 325-338.
111. Blom, A., Pertoft, H., and Fries, E. (1995) Inter-alpha-inhibitor is required for the formation of the hyaluronan-containing coat on fibroblasts and mesothelial cells, *The Journal of biological chemistry* 270, 9698-9701.
112. Zhuo, L., Hascall, V. C., and Kimata, K. (2004) Inter-alpha-trypsin inhibitor, a covalent protein-glycosaminoglycan-protein complex, *The Journal of biological chemistry* 279, 38079-38082.
113. Russell, D. L., and Salustri, A. (2006) Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex, *Semin Reprod Med* 24, 217-227.
114. de la Motte, C. A., Hascall, V. C., Drazba, J., Bandyopadhyay, S. K., and Strong, S. A. (2003) Mononuclear leukocytes bind to specific hyaluronan structures on colon mucosal smooth muscle cells treated with polyinosinic acid:polycytidylic acid: inter-alpha-trypsin inhibitor is crucial to structure and function, *Am J Pathol* 163, 121-133.
115. Zhuo, L., Kanamori, A., Kannagi, R., Itano, N., Wu, J., Hamaguchi, M., Ishiguro, N., and Kimata, K. (2006) SHAP potentiates the CD44-mediated leukocyte adhesion to the hyaluronan substratum, *The Journal of biological chemistry* 281, 20303-20314.
116. Zhuo, L., Salustri, A., and Kimata, K. (2002) A physiological function of serum proteoglycan bikunin: the chondroitin sulfate moiety plays a central role, *Glycoconj J* 19, 241-247.
117. Day, A. J., and de la Motte, C. A. (2005) Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation?, *Trends Immunol* 26, 637-643.
118. Salustri, A., Garlanda, C., Hirsch, E., De Acetis, M., Maccagno, A., Bottazzi, B., Doni, A., Bastone, A., Mantovani, G., Beck Peccoz, P., Salvatori, G., Mahoney, D. J., Day, A. J., Siracusa, G., Romani, L., and

- Mantovani, A. (2004) PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization, *Development* 131, 1577-1586.
119. Alles, V. V., Bottazzi, B., Peri, G., Golay, J., Introna, M., and Mantovani, A. (1994) Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes, *Blood* 84, 3483-3493.
120. Meyer, K. (1971) Hyaluronidases, in *The Enzymes* (Boyer, P. D., Ed.), pp 307-320, Academic press, New York.
121. Hotez, P. J., Narasimhan, S., Haggerty, J., Milstone, L., Bhopale, V., Schad, G. A., and Richards, F. F. (1992) Hyaluronidase from infective *Ancylostoma hookworm* larvae and its possible function as a virulence factor in tissue invasion and in cutaneous larva migrans, *Infect Immun* 60, 1018-1023.
122. Stern, R., and Jedrzejewski, M. J. (2006) Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action, *Chemical reviews* 106, 818-839.
123. Cramer, J. A., Bailey, L. C., Bailey, C. A., and Miller, R. T. (1994) Kinetic and mechanistic studies with bovine testicular hyaluronidase, *Biochim Biophys Acta* 1200, 315-321.
124. Kemparaju, K., and Girish, K. S. (2006) Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target, *Cell Biochem Funct* 24, 7-12.
125. Kreil, G. (1995) Hyaluronidases--a group of neglected enzymes, *Protein Sci* 4, 1666-1669.
126. Stern, R. (2004) Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway, *Eur J Cell Biol* 83, 317-325.
127. Roden, L., Campbell, P., Fraser, J. R., Laurent, T. C., Pertoft, H., and Thompson, J. N. (1989) Enzymic pathways of hyaluronan catabolism, *Ciba Found Symp* 143, 60-76; discussion 76-86, 281-285.
128. Frost, G. I., Csoka, T., Stern, R. (1996) The hyaluronidases: a chemical, biological and clinical overview., *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 8, 419-434.

129. Stern, R. (2003) Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet?, *Glycobiology* 13, 105R-115R.
130. Csoka, A. B., Scherer, S. W., and Stern, R. (1999) Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31, *Genomics* 60, 356-361.
131. Csoka, A. B., Frost, G. I., and Stern, R. (2001) The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes, *Matrix Biol* 20, 499-508.
132. Miller, K. A., Shao, M., and Martin-DeLeon, P. A. (2007) Hyalp1 in murine sperm function: evidence for unique and overlapping functions with other reproductive hyaluronidases, *J Androl* 28, 67-76.
133. Reitinger, S., Laschober, G. T., Fehrer, C., Greiderer, B., and Lepperdinger, G. (2007) Mouse testicular hyaluronidase-like proteins SPAM1 and HYAL5 but not HYALP1 degrade hyaluronan, *The Biochemical journal* 401, 79-85.
134. Baba, D., Kashiwabara, S., Honda, A., Yamagata, K., Wu, Q., Ikawa, M., Okabe, M., and Baba, T. (2002) Mouse sperm lacking cell surface hyaluronidase PH-20 can pass through the layer of cumulus cells and fertilize the egg, *The Journal of biological chemistry* 277, 30310-30314.
135. Zhang, H., Shertok, S., Miller, K., Taylor, L., and Martin-DeLeon, P. A. (2005) Sperm dysfunction in the Rb(6.16)- and Rb(6.15)-bearing mice revisited: involvement of Hyalp1 and Hyal5, *Mol Reprod Dev* 72, 404-410.
136. Kim, E., Baba, D., Kimura, M., Yamashita, M., Kashiwabara, S., and Baba, T. (2005) Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18028-18033.
137. Lin, Y., Kimmel, L. H., Myles, D. G., and Primakoff, P. (1993) Molecular cloning of the human and monkey sperm surface protein PH-20, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10071-10075.
138. Martin-DeLeon, P. A. (2006) Epididymal SPAM1 and its impact on sperm function, *Mol Cell Endocrinol* 250, 114-121.

139. Zhang, H., Morales, C. R., Badran, H., El-Alfy, M., and Martin-DeLeon, P. A. (2004) Spam1 (PH-20) expression in the extratesticular duct and accessory organs of the mouse: a possible role in sperm fluid reabsorption, *Biology of reproduction* 71, 1101-1107.
140. Afify, A. M., Stern, M., Guntenhoner, M., and Stern, R. (1993) Purification and characterization of human serum hyaluronidase, *Arch Biochem Biophys* 305, 434-441.
141. Csoka, A. B., Frost, G. I., Wong, T., and Stern, R. (1997) Purification and microsequencing of hyaluronidase isozymes from human urine, *FEBS letters* 417, 307-310.
142. Csoka, A. B., Frost, G. I., Heng, H. H., Scherer, S. W., Mohapatra, G., and Stern, R. (1998) The hyaluronidase gene HYAL1 maps to chromosome 3p21.2-p21.3 in human and 9F1-F2 in mouse, a conserved candidate tumor suppressor locus, *Genomics* 48, 63-70.
143. Chao, K. L., Muthukumar, L., and Herzberg, O. (2007) Structure of human hyaluronidase-1, a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis, *Biochemistry* 46, 6911-6920.
144. Lepperdinger, G., Mullegger, J., and Kreil, G. (2001) Hyal2--less active, but more versatile?, *Matrix Biol* 20, 509-514.
145. Lepperdinger, G., Strobl, B., and Kreil, G. (1998) HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity, *The Journal of biological chemistry* 273, 22466-22470.
146. Martin, D. C., Atmuri, V., Hemming, R. J., Farley, J., Mort, J. S., Byers, S., Hombach-Klonisch, S., Stern, R., and Triggs-Raine, B. L. (2008) A mouse model of human mucopolysaccharidosis IX exhibits osteoarthritis, *Hum Mol Genet* 17, 1904-1915.
147. Rai, S. K., Duh, F. M., Vigdorovich, V., Danilkovitch-Miagkova, A., Lerman, M. I., and Miller, A. D. (2001) Candidate tumor suppressor HYAL2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope protein of which

- mediates oncogenic transformation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4443-4448.
148. Dirks, C., Duh, F. M., Rai, S. K., Lerman, M. I., and Miller, A. D. (2002) Mechanism of cell entry and transformation by enzootic nasal tumor virus, *J Virol* 76, 2141-2149.
 149. Duh, F. M., Dirks, C., Lerman, M. I., and Miller, A. D. (2005) Amino acid residues that are important for Hyal2 function as a receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, *Retrovirology* 2, 59.
 150. Flannery, C. R., Little, C. B., Hughes, C. E., and Caterson, B. (1998) Expression and activity of articular cartilage hyaluronidases, *Biochemical and biophysical research communications* 251, 824-829.
 151. Nicoll, S. B., Barak, O., Csoka, A. B., Bhatnagar, R. S., and Stern, R. (2002) Hyaluronidases and CD44 undergo differential modulation during chondrogenesis, *Biochemical and biophysical research communications* 292, 819-825.
 152. Lathrop, W. F., Carmichael, E. P., Myles, D. G., and Primakoff, P. (1990) cDNA cloning reveals the molecular structure of a sperm surface protein, PH-20, involved in sperm-egg adhesion and the wide distribution of its gene among mammals, *J Cell Biol* 111, 2939-2949.
 153. Cherr, G. N., Yudin, A. I., and Overstreet, J. W. (2001) The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling, *Matrix Biol* 20, 515-525.
 154. Zheng, Y., Deng, X., Zhao, Y., Zhang, H., and Martin-DeLeon, P. A. (2001) Spam1 (PH-20) mutations and sperm dysfunction in mice with the Rb(6.16) or Rb(6.15) translocation, *Mamm Genome* 12, 822-829.
 155. Gmachl, M., and Kreil, G. (1993) Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3569-3573.
 156. Oetl, M., Hoechstetter, J., Asen, I., Bernhardt, G., and Buschauer, A. (2003) Comparative characterization of bovine testicular hyaluronidase

- and a hyaluronate lyase from *Streptococcus agalactiae* in pharmaceutical preparations, *Eur J Pharm Sci* 18, 267-277.
157. Feinberg, R. N., and Beebe, D. C. (1983) Hyaluronate in vasculogenesis, *Science (New York, N.Y)* 220, 1177-1179.
 158. Delmage, J. M., Powars, D. R., Jaynes, P. K., and Allerton, S. E. (1986) The selective suppression of immunogenicity by hyaluronic acid, *Annals of clinical and laboratory science* 16, 303-310.
 159. McBride, W. H., and Bard, J. B. (1979) Hyaluronidase-sensitive halos around adherent cells. Their role in blocking lymphocyte-mediated cytotoxicity, *The Journal of experimental medicine* 149, 507-515.
 160. West, D. C., Hampson, I. N., Arnold, F., and Kumar, S. (1985) Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid, *Science (New York, N.Y)* 228, 1324-1326.
 161. Noble, P. W. (2002) Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair, *Matrix Biol* 21, 25-29.
 162. Fieber, C., Baumann, P., Vallon, R., Termeer, C., Simon, J. C., Hofmann, M., Angel, P., Herrlich, P., and Sleeman, J. P. (2004) Hyaluronan-oligosaccharide-induced transcription of metalloproteases, *Journal of cell science* 117, 359-367.
 163. Taylor, K. R., Trowbridge, J. M., Rudisill, J. A., Termeer, C. C., Simon, J. C., and Gallo, R. L. (2004) Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4, *The Journal of biological chemistry* 279, 17079-17084.
 164. Xu, H., Ito, T., Tawada, A., Maeda, H., Yamanokuchi, H., Isahara, K., Yoshida, K., Uchiyama, Y., and Asari, A. (2002) Effect of hyaluronan oligosaccharides on the expression of heat shock protein 72, *The Journal of biological chemistry* 277, 17308-17314.
 165. Zhang, H., Barnoski, B. L., Sol-Church, K., Stabley, D. L., and Martin-Deleon, P. A. (2006) Murine Spam1 mRNA: involvement of AU-rich elements in the 3'UTR and antisense RNA in its tight post-transcriptional regulation in spermatids, *Mol Reprod Dev* 73, 247-255.

166. Triggs-Raine, B., Salo, T. J., Zhang, H., Wicklow, B. A., and Natowicz, M. R. (1999) Mutations in HYAL1, a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6296-6300.
167. Atmuri, V., Martin, D.C., Hemming, R., Gutsol, A., Byers, S., Sahebjam, S., Thliveris, J.A., Mort, J.S., Carmona, E., Anderson, J.E., Dakshinamurti, S., Triggs-Raine, B. (2008) Hyaluronidase 3 (HYAL3) knockout mice do not display evidence of hyaluronan accumulation, *Matrix Biol*, accepted.
168. Orimoto, A. M., Dumaresq-Doiron, K., Jiang, J. Y., Tanphaichitr, N., Tsang, B. K., and Carmona, E. (2008) Mammalian hyaluronidase induces ovarian granulosa cell apoptosis and is involved in follicular atresia, *Endocrinology* 149, 5835-5847.
169. Chun, S. Y., Eisenhauer, K. M., Minami, S., Billig, H., Perlas, E., and Hsueh, A. J. (1996) Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor, *Endocrinology* 137, 1447-1456.
170. Hsueh, A. J., Billig, H., and Tsafiriri, A. (1994) Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process, *Endocrine reviews* 15, 707-724.
171. Chun, S. Y., Billig, H., Tilly, J. L., Furuta, I., Tsafiriri, A., and Hsueh, A. J. (1994) Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I, *Endocrinology* 135, 1845-1853.
172. Tilly, J. L., and Tilly, K. I. (1995) Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles, *Endocrinology* 136, 242-252.
173. Hoess, R. H., and Abremski, K. (1985) Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system, *Journal of molecular biology* 181, 351-362.

174. Hsu, S. Y., Lai, R. J., Nanuel, D., and Hsueh, A. J. (1995) Different 5'-flanking regions of the inhibin- α gene target transgenes to the gonad and adrenal in an age-dependent manner in transgenic mice, *Endocrinology* 136, 5577-5586.
175. Boone, D. L., Carnegie, J. A., Rippstein, P. U., and Tsang, B. K. (1997) Induction of apoptosis in equine chorionic gonadotropin (eCG)-primed rat ovaries by anti-eCG antibody, *Biology of reproduction* 57, 420-427.
176. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method, *Methods* 25, 402-408.
177. Madsen, L., Labrecque, N., Engberg, J., Dierich, A., Svejgaard, A., Benoist, C., Mathis, D., and Fugger, L. (1999) Mice lacking all conventional MHC class II genes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10338-10343.
178. Cuzick, J. (1985) A Wilcoxon-type test for trend, *Stat Med* 4, 87-90.
179. Hogan, B., Constantini, F., Lacy, E (1994) *Manipulating the Mouse Embryo: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory.
180. Morita, Y., Perez, G. I., Paris, F., Miranda, S. R., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., Xie, Z., Reed, J. C., Schuchman, E. H., Kolesnick, R. N., and Tilly, J. L. (2000) Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy, *Nat Med* 6, 1109-1114.
181. Perez, G. I., Robles, R., Knudson, C. M., Flaws, J. A., Korsmeyer, S. J., and Tilly, J. L. (1999) Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency, *Nat Genet* 21, 200-203.
182. Tilly, J. L., Ratts, V.S. . (1996) Biological and clinical importance of ovarian cell death, *Contemp Obstet Gynecol* 41, 59-86.
183. Hunnicutt, G. R., Primakoff, P., and Myles, D. G. (1996) Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding, *Biology of reproduction* 55, 80-86.

184. Shuttleworth, T. L., Wilson, M. D., Wicklow, B. A., Wilkins, J. A., and Triggs-Raine, B. L. (2002) Characterization of the murine hyaluronidase gene region reveals complex organization and cotranscription of Hyal1 with downstream genes, Fus2 and Hyal3, *The Journal of biological chemistry* 277, 23008-23018.
185. Hemming, R., Martin, D. C., Slominski, E., Nagy, J. I., Halayko, A. J., Pind, S., and Triggs-Raine, B. (2008) Mouse Hyal3 encodes a 45- to 56-kDa glycoprotein whose overexpression increases hyaluronidase 1 activity in cultured cells, *Glycobiology* 18, 280-289.
186. Harada, H., and Takahashi, M. (2007) CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2, *The Journal of biological chemistry* 282, 5597-5607.
187. Dai, G., Freudenberger, T., Zipper, P., Melchior, A., Grether-Beck, S., Rabausch, B., de Groot, J., Twarock, S., Hanenberg, H., Homey, B., Krutmann, J., Reifenberger, J., and Fischer, J. W. (2007) Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic acid from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic acid synthases, *Am J Pathol* 171, 1451-1461.
188. Li, L., Asteriou, T., Bernert, B., Heldin, C. H., and Heldin, P. (2007) Growth factor regulation of hyaluronan synthesis and degradation in human dermal fibroblasts: importance of hyaluronan for the mitogenic response of PDGF-BB, *The Biochemical journal* 404, 327-336.
189. Chang, N. S. (2002) Transforming growth factor-beta1 blocks the enhancement of tumor necrosis factor cytotoxicity by hyaluronidase Hyal-2 in L929 fibroblasts, *BMC Cell Biol* 3, 8.
190. Chang, N. S. (1998) Transforming growth factor-beta protection of cancer cells against tumor necrosis factor cytotoxicity is counteracted by hyaluronidase (review), *Int J Mol Med* 2, 653-659.
191. Chang, N. S. (1997) Hyaluronidase enhancement of TNF-mediated cell death is reversed by TGF-beta 1, *Am J Physiol* 273, C1987-1994.
192. http://www.fertilite.ca/canada_fr/index.jsp.

193. Girish, K. S., and Kemparaju, K. (2007) The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview, *Life Sci* 80, 1921-1943.