

Université de Montréal

Régulation de la fonction ovarienne par la voie
de signalisation des WNTs

par

Evelyne Lapointe

Programmes de biologie moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de Ph.D.

en Biologie Moléculaire

septembre, 2012

© Evelyne Lapointe, 2012

Résumé

Les WNTs sont des glycoprotéines sécrétées impliquées dans plusieurs processus tels que la spécification cellulaire, la prolifération, la différenciation, et beaucoup d'autres. Pour transmettre leur signal, les WNTs se lient aux récepteurs Frizzled (FZD) et au co-récepteur « Low-density-lipoprotein receptor Related Protein » (LRP) 6 ou 5, activant ainsi l'une des trois principales voies de signalisation: la voie de signalisation WNT/ β -caténine (voie canonique), la voie « Planar Cell Polarity » (PCP) et la voie WNT/ Ca^{2+} (voies non-canoniques). Des antagonistes de cette voie, les « Secreted Frizzled Related Protein » (SFRPs), peuvent aussi se lier aux WNTs pour empêcher leur liaison aux récepteurs FZDs. Bien que des rôles importants aient été associés à plusieurs composants de la voie des WNTs lors de la régulation de l'ovaire adulte, le fonctionnement exact de cette signalisation reste nébuleux. L'objectif global de cette thèse visait donc à mieux comprendre la voie de signalisation des WNTs au niveau de l'ovaire adulte de souris, par la caractérisation de deux autres composants de cette voie, FZD1 et SFRP4. La création et l'analyse de souris *Fzd1* et *Sfrp4* KO ont démontré que FZD1 est nécessaire pour la régulation des gènes associés à l'expansion du cumulus, dans le complexe ovocyte-cumulus (COC). Nous avons aussi constaté que SFRP4 avait un rôle à jouer lors de la régulation des gènes associés à l'expansion du cumulus mais cette fois, au niveau des cellules de la granulosa. Finalement, les résultats *in vivo* et *in vitro* de cette étude ont suggéré que la voie PCP, contrairement à la voie canonique, pourrait être modulée dans les cellules de la granulosa des souris *Sfrp4* KO, possiblement grâce au signal induit par WNT4 et WNT5a. Ces données ont permis de créer un modèle hypothétique représentant la régulation de la signalisation ovarienne par les WNTs. Ce modèle servira de base pour l'élaboration de futurs projets de recherche visant à comprendre davantage la signalisation ovarienne et les possibles effets de sa dérégulation lors de processus pathologiques. Ces connaissances pourront ensuite être appliquées chez l'humain afin de traiter plusieurs maladies ou dérèglements ovariens.

Mots-clés : Cellules de la granulosa, fertilité, FZD, ovaire, WNT

Abstract

WNTs are secreted glycoproteins that act to regulate several processes such as cell fate determination, proliferation, differentiation and many more. To transmit their signal, WNTs bind the co-receptors Frizzled (FZD) and Low-density-lipoprotein receptor Related Protein (LRP) 6 or 5, which leads to the activation of one of three signaling pathways: WNT/ β -catenin (canonical), Planar Cell Polarity (PCP) or WNT/ Ca^{2+} pathways (both non-canonical). Secreted Frizzled Related Proteins (SFRPs) are antagonists of WNT signaling that act by directly binding WNTs and preventing their interaction with FZD receptors. Even if members of the WNT signaling pathway have been found to have important roles in adult ovarian regulation, the exact mechanism(s) involved remain poorly understood. The global objective of this thesis was to better understand WNT signaling in the adult rodent ovary, by characterizing two components of this pathway: FZD1 and SFRP4. Generation and analyses of *Fzd1* and *Sfrp4* KO mice first demonstrated that FZD1 is required for the induction of cumulus expansion-related genes, in the cumulus-oocyte complex (COC). Also, we demonstrated that SFRP4 is also required for the regulation of cumulus expansion-associated genes but this time, in mural granulosa cells. *In vivo* and *in vitro* data suggested that the PCP pathway, and not the canonical pathway, could be induced in granulosa cells of *Sfrp4* KO mice, possibly by WNT4 and WNT5a. All the data presented herein permitted the creation of a hypothetical model that summarizes the roles of WNT signaling in ovarian regulation. This model will serve to develop new projects that will ultimately result in the better understanding of ovarian signaling and related pathological processes. This knowledge may then be useful for the treatment of many human ovarian disorders.

Keywords : Fertility, FZD, granulosa cells, ovary, WNT

Table des matières

Résumé	ii
Abstract.....	iii
Table des matières	iv
Liste des tableaux	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations	x
Remerciements	xiv
Chapitre 1.....	1
1. Introduction.....	2
1.1 Développement embryonnaire des ovaires.....	2
1.1.1 Fertilisation et début de l’embryogenèse.....	2
1.1.2 Les cellules germinales primordiales et la détermination du sexe	4
1.1.3 Formation des follicules primordiaux.....	6
1.2 Structure et régulation de l’ovaire adulte.....	7
1.2.1 Folliculogénèse.....	9
1.2.1.1 Axe hypothalamique-hypophysaire-gonadique et déclenchement de la puberté 9	
1.2.1.2 Activation folliculaire.....	10
1.2.1.3 Formation du follicule secondaire	11
1.2.1.4 Formation du follicule antral	12
1.2.1.4.1 Stimulation par la FSH	12
1.2.1.4.2 Production d’estradiol.....	13
1.2.1.4.3 Production d’inhibine, d’activine et de follistatine.....	16
1.2.1.4.4 Vagues folliculaires et follicule dominant.....	18
1.2.2 Ovulation	19
1.2.2.1 Voies de signalisation responsables du processus ovulatoire.....	20
1.2.3 Le corpus luteum	25
1.2.3.1 Lutéinisation	26
1.2.3.2 Fonctions du CL	27

1.2.3.3 Régression ou subsistance du CL	28
1.3 Signalisation par les WNTs	30
1.3.1 Description des WNTs.....	30
1.3.1.1 Voie canonique WNT/ β -caténine	31
1.3.1.2 Les voies non-canoniques.....	34
1.3.1.2.1 La voie PCP	34
1.3.1.2.2 La voie WNT/ Ca^{2+}	35
1.3.2 Rôles de la voie des WNTs au niveau de l’ovaire	36
1.3.2.1 Voie de signalisation des WNTs lors du développement ovarien	37
1.3.2.1.1 Wnt4	37
1.3.2.1.2 R-Spondin 1	38
1.3.2.1.3 β -caténine.....	39
1.3.2.1.4 Follistatine, Activine β B et Stra8	39
1.3.2.2 Voie de signalisation des WNTs dans l’ovaire adulte	42
1.3.2.2.1 SFRP4	42
1.3.2.2.2 FZD4.....	43
1.3.2.2.3 WNT4 et WNT2	44
1.3.2.2.4 β -caténine et signalisation par les gonadotrophines	45
1.4 Hypothèse et objectifs de la thèse.....	47
Chapitre 2.....	48
2. Article 1	49
2.1 ABSTRACT	51
2.2 INTRODUCTION	51
2.3 MATERIALS AND METHODS	53
2.4 RESULTS	58
2.5 DISCUSSION.....	63
2.6 ACKNOWLEDGEMENTS.....	66
2.7 REFERENCES	67
2.8 FIGURES.....	71
2.9 TABLES	82
Chapitre 3.....	87

3. Article 2	88
3.1 ABSTRACT	90
3.2 INTRODUCTION	90
3.3 MATERIALS AND METHODS	92
3.4 RESULTS	97
3.5 DISCUSSION	103
3.6 ACKNOWLEDGEMENTS	105
3.7 REFERENCES	106
3.8 FIGURES	111
3.9 TABLE	122
3.10 SUPPLEMENTAL TABLES	123
Chapitre 4.....	128
4. Discussion.....	129
4.1 Étude de FZD1.....	131
4.2 Étude de SFRP4.....	133
4.3 Modélisation de la voie des WNTs au niveau de la fonction ovarienne	135
4.4 La voie des WNTs dans l’ovaire humain	139
4.5 Conclusion générale.....	141
Références.....	143

Liste des tableaux

Introduction et discussion

Tableau 1 : Classement des gènes par fonction.....	23
--	----

Article 1

TABLE 1: Oligonucleotides for RT-PCR analysis.....	82
TABLE 2: Mating trial.....	85
TABLE 3: Ovary weights.....	85
TABLE 4: Microarray analysis of gene expression in granulosa cells from <i>Fzd1</i> ^{-/-} mice.....	86

Article 2

TABLE 1: Mating trial.....	122
SUPPLEMENTAL TABLE 1 : Oligonucleotides for RT-PCR analysis.....	123
SUPPLEMENTAL TABLE 2 : Microarray analysis of gene expression in granulosa cells from <i>Sfrp4</i> ^{-/-} mice.....	125

Liste des figures

Introduction et discussion

Figure 1.1 : Description du blastocyste.....	4
Figure 1.2 : Emplacement et migration des CGPs.....	5
Figure 1.3 : Développement du testicule et de l’ovaire à partir de la gonade indifférenciée.	6
Figure 1.4 : Coupe transversale d’un ovaire.....	8
Figure 1.5 : Transformations enzymatiques permettant la synthèse d’estradiol par le follicule antral.....	15
Figure 1.6 : Modèle simplifié de la régulation de la sécrétion de FSH par l’axe HPG.....	17
Figure 1.7: Structures présentes dans le follicule antral pré-ovulatoire.....	19
Figure 1.8 : Schématisation d’une partie de la signalisation moléculaire induite par le pic de LH.....	22
Figure 1.9 : Transformations enzymatiques permettant la synthèse de progestérone par le corps jaune.....	28
Figure 1.10 : Voie de signalisation WNT/ β -caténine.....	32
Figure 1.11 : Voies non-canoniques activées par les WNTs.....	36
Figure 1.12 : Schéma représentant les relations possibles entre différents composants de la voie des WNTS au niveau du développement embryonnaire de l’ovaire.....	41
Figure 4.1 : Schématisation de la signalisation des WNTs dans les cellules de la granulosa.....	139

Article 1

Figure 1. Patterns of <i>Fzd1</i> and <i>Wnt4</i> mRNA regulation by hCG in granulosa cells and COCs.....	71
Figure 2 : Targeting of <i>Fzd1</i>	72
Figure 3 : A minority of <i>Fzd^{-/-}</i> female mice are sterile and possess abnormalities in their reproductive tissues.....	74
Figure 4 : Quantitative analysis of ovarian follicles in peri-pubertal and one year-old mice.....	76
Figure 5 : <i>In vivo</i> analysis of ovarian gene expression in <i>Fzd1^{-/-}</i> mice.....	77
Figure 6 : Regulation of COC gene expression by FZD1 but not by WNT4.....	79
Figure 7 : Cumulus expansion is not altered in <i>Fzd1^{-/-}</i> mice.....	81

Article 2

Figure 1 : Patterns of <i>Sfrp4</i> and <i>Wnt</i> mRNA regulation by hCG in granulosa cells and COCs.....	111
Figure 2 : Targeting of <i>Sfrp4</i>	113
Figure 3 : <i>In vivo</i> analysis of ovarian gene expression in granulosa cells from <i>Sfrp4^{-/-}</i> mice.....	115
Figure 4 : Cumulus expansion is not altered in <i>Sfrp4^{-/-}</i> mice.....	117
Figure 5 : The corpus luteum function is not impaired in <i>Sfrp4^{-/-}</i> mice.....	119
Figure 6 : Quantitative RT-PCR analysis in cultured granulosa cells.....	121

Liste des abréviations

20 α -HSD : 20- α -hydroxysteroid
dehydrogenase

AC : Adénylate Cyclase

ACTB : Actine bêta

ALCAM : Activated Leukocyte Cell
Adhesion Molecule

ALK : Activin-like Kinase

AMH : Anti-mullerian Hormone

APC : Adenomatous Polyposis Coli

AREG : Amphiréguline

ARNm : ARN messenger

BCL19 : B cell CLL/lymphoma 9

BMP : Bone Morphogenetic Protein

BP : Base Pair

BTC : Betacelluline

BTG2 : B cell Translocation Gene 2, anti-
proliferative

β -TRCP : β -transducing-repeat-containin

BSA : Bovine Serum Albumin

C/EBP : CCAAT/enhancer-binding Protein

CAMKII : Calcium/calmodulin-dependant
Kinase II

cAMP : Cyclic Adenosine Monophosphate

CBP/300 : CREB binding protein/p300

CBY1 : Chibby

CCND2 : Cyclin D2

CDKN1b : Cyclin-dependent kinase
inhibitor 1B

CGP : Cellule Germinale Primordiale

CK1 : Caseine Kinase 1

cKO : KO conditionnel

CL : Corpus luteum

CMV : Cytomegalovirus

COC : Complexe Ovocyte-cumulus

CRD : Cystein Rich Domain

CREB : cAMP Response Element-binding
protein

CTNNB1 : β -caténine

CYP: Cytochrome P450

DAAM : Dishevelled-associated Activator
of Morphogenesis

DAG : Diacylglycerol

DKK : Dickkopf homolog

DPPA3 : Developmental Pluripotency-associated 3
DSH : Disheveled
E2 : Estradiol
eCG : Equine Chorionic Gonadotropin
EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
EGR1 : Early Growth Response 1
ENC1 : Ectodermal-neural Cortex 1
ER : Estrogen receptor
EREG : Epireguline
ERK : Extracellular-signal-regulated Kinase
FAM126a : Family with sequence similarity 126, member A
FBS : Fetal Bovine Serum
FD : Follicle Dominant
FOXL2 : Forkhead box L2
FOXO1 : Forkhead box O1
FSH : Follicle-stimulating Hormone
FSHb : Sous-unité β de la FSH
FSHR : FSH receptor
FST : Follistatine
FZD : Frizzled

GDF : Growth Differentiation Factor
GnRH : Gonadotropin-releasing Hormone
GREM : Gremlin
GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 beta
HAS2 : Hyaluronan Synthase 2
hCG : Human Chorionic Gonadotropin
HCL : Hydrochloric acid
HDAC : Histone Désacétylase
HDL : High-density Lipoprotein
HPG : Hypothalamic–Pituitary–Gonadal
HSD17B1 : Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 1
HSD3B2 : Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 2
IGF : Insulin Growth Factor
IL : Interleukine
INH : Inhibine
IP₃ : Inositol trisphosphate
JNK : JUN N-terminal Kinase
KL : Kit Ligand
Klf4 : Kruppel-like factor 4
KO : Knock-out
LDL : Low-density Lipoprotein

LH : Luteinizing Hormone

LHR : LH receptor

LHX : Lim Homeobox

LOX : Lysyl Oxidase

LRP : Low-density-lipoprotein receptor
Related Protein

MMTV : Mouse mammary tumor virus

NF-AT: Nuclear Factor of Activated T cell

NLRP5 : NLR family, Pyrin domain
containing 5

NOBOX : Newborn Ovary homeobox

NR5a : Nuclear Receptor subfamily 5

NTS : Neurotensine

P4 : Progestérone

PBR : Peripheral-type Benzodiazepine
Receptor

PCP : Planar cell polarity

PI3K : Phosphatidylinositol 3- Kinase

PKA : Protéine Kinase A

PKG : Protéine Kinase G

PLC : Phospholipase C

PRL : Prolactine

PRLR : PRL receptor

PTDINS(4,5)P₂ : Phosphatidylinositol-4,5-
bisphosphate

PTGS2 : Prostaglandin-endoperoxide
synthase 2

PTX3 : Pentraxin related gene

PVDF : Polyvinylidene Fluoride

RA : Retinoic Acid

RAC1 : RAS-related C3 botulinum
substrate 1

RELN : Reelin

RHOA : RAS Homologue gene-family
member A

RNA : Ribonucleic Acid

ROCK : RHO-associated Coiled-coil
containing protein Kinase

RPL19 : Ribosomal Protein L19

RSPO : R-spondine

RT-PCR : Reverse Transcription-
Polymerase Chain Reaction

SCP-2 : Sterol Carrier Protein 2

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SEMA3a : Sema domain, Ig domain, short
basic domain, secreted, (semaphorin) 3A

SFRP : Secreted Frizzled-related Protein

SLC30a3 : Solute Carrier family 30 (zinc
transporter), member 3

SOHLH : Spermatogenesis and Oogenesis
specific basic Helix-loop-helix

SOST : Sclerostin

SOX9 : SRY-box containing gene 9

SRY : Sex-determining Region Y

STAR : Steroidogenic Acute Regulatory protein

STRA8 : Stimulated by Retinoic Acid 8

SULT1e1 : Sulfotransferase family 1E, member 1

TAK1 : TGF- β -activated Kinase 1

TCF/LEF : T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor

TGF- β : Transforming Growth Factor Beta

TNFAIP6 : Tumor Necrosis Factor Alpha Induced Protein 6

TRP63 : Transformation Related Protein 63

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling

ZP : Zona Pellucida

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord mon directeur de recherche, Derek Boerboom, de m'avoir accueillie et enseigné durant 5 ans. C'est en grande partie grâce à lui que j'ai réussi à développer une rigueur, un acharnement et une curiosité scientifique qui me seront utiles tout au long de ma vie professionnelle. Je serai aussi toujours reconnaissante du soutien que j'ai eu de sa part concernant mon parcours d'études doctorales peu traditionnel, qui m'a permis de concilier études et famille.

Je remercie les membres de mon laboratoire et du CRRA, passés ou présents, qui m'ont aidée à apprendre et à effectuer mes nombreuses expériences.

Merci également ma famille, qui, depuis mon plus jeune âge, m'appuie toujours dans les multiples projets que j'entreprends.

Je remercie mon conjoint Joël, qui m'a toujours fourni un appui inconditionnel face aux choix de carrières que j'ai effectués et que je continue à faire. Je le remercie aussi de s'occuper si bien de nos enfants, ce qui m'a permis de partir la tête tranquille à chacune des fois où j'ai dû travailler le soir. Il est mon complice, nous formons une équipe idéale.

Je réserve finalement un merci tout spécial à mes deux petites puces, Zoé et Romy, qui me rendent si heureuse et me comblent à chaque jour de ma vie.

Chapitre 1

1. Introduction

Les voies de signalisation activées par les WNTs sont importantes lors du développement embryonnaire des gonades mais aussi au niveau de la régulation de l'ovaire adulte. Pour bien saisir ces rôles distincts, une introduction concise sera d'abord faite sur la détermination sexuelle et sur la formation embryonnaire des ovaires. Par la suite, la régulation ovarienne postnatale ainsi que les voies de signalisation impliquées seront décrites. Finalement, les protéines WNTs ainsi que leur rôle ovarien au niveau développemental et postnatal seront extensivement expliqués. Cette revue de littérature permettra donc de comprendre l'importance de cette nouvelle voie de signalisation au niveau de l'ovaire et par le fait même, situera les résultats des articles inclus dans cette thèse.

À moins d'indications contraires, les concepts de base expliqués dans cette introduction (particulièrement durant l'embryogénèse) se rapporteront à l'humain, qui est l'espèce à qui nous portons le plus d'intérêt. En effet, bien que le modèle murin soit utilisé pour la majorité des expériences discutées dans cette thèse, il demeure évident que les données ainsi récoltées ont pour but ultime d'être appliquées à la santé humaine.

1.1 Développement embryonnaire des ovaires

Tout comme la majorité des autres organes, le développement du système reproducteur commence très tôt lors de l'embryogénèse. Plusieurs molécules, dont certaines protéines de la voie des WNTs, doivent être présentes à des moments-clés afin d'orchestrer avec précision ce processus développemental. Cette section décrira sommairement les origines et la formation des gonades femelles.

1.1.1 Fertilisation et début de l'embryogénèse

L'embryogénèse commence au moment où le spermatozoïde féconde l'ovule pour donner naissance au zygote, qui est la première cellule diploïde de l'organisme. Le zygote

commence alors le processus de segmentation qui se caractérise par une série de divisions cellulaires mitotiques se déroulant à l'intérieur de la zone pellucide inextensible entourant initialement l'ovule. Cet amas cellulaire subit ensuite l'étape de compaction, où les cellules s'attachent fermement les unes aux autres pour former une sphère. Du liquide commence alors peu à peu à s'accumuler à l'intérieur de la sphère de cellules pour former une cavité appelée blastocœle. Les cellules continuent de se diviser et commencent à se différencier pour former, environ 5 jours après la fécondation, le blastocyste (Figure 1.1). Cette structure comprend entre 70 et 100 cellules de deux types : les cellules du trophoblaste et les cellules de la masse cellulaire interne (aussi appelée embryoblaste). Les cellules du trophoblaste entourent l'embryoblaste et le blastocœle et contribueront à la formation du placenta. Les cellules de l'embryoblaste donneront quant à elles naissance à toutes les autres cellules de l'organisme adulte.

Les premières étapes de divisions et de différenciations cellulaires décrites précédemment se font au même moment que l'embryon migre depuis l'ampoule de la trompe de Fallope jusqu'à la cavité utérine. Rendu à cet endroit, le blastocyste se débarrasse de sa zone pellucide et commence à s'implanter dans l'endomètre utérin maternel. Dès ce moment, l'embryon commence une série de transformations complexes nécessitant la migration et le réarrangement des cellules dans un ordre très précis. Les cellules de l'embryoblaste formeront ultérieurement l'endoderme, l'ectoderme et le mésoderme.

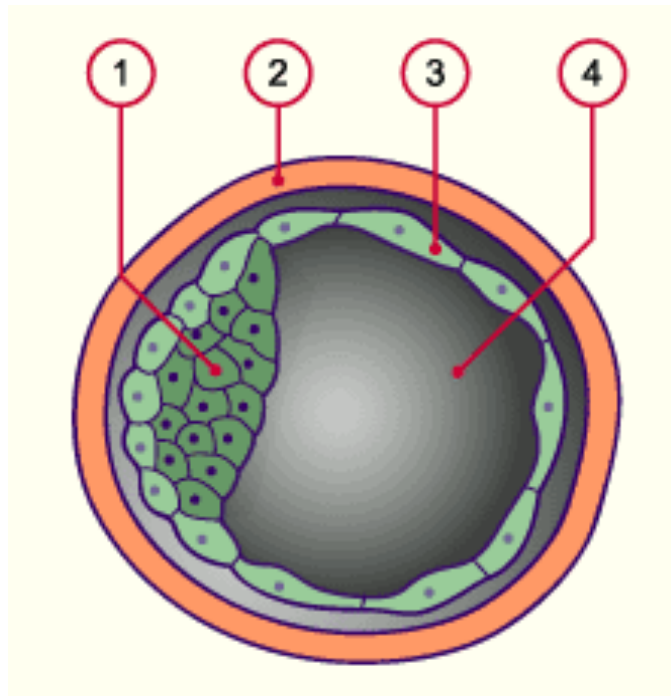
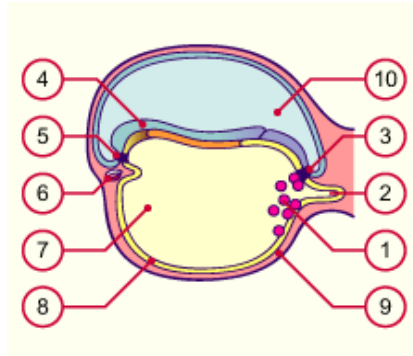


Figure 1.1 : Description du blastocyste. À ce stade, la structure embryonnaire est composée de 1) l'embryoblaste, 2) la zone pellucide, 3) du trophoblaste et 4) du blastocœle.
(Tiré d'embryology.ch)

1.1.2 Les cellules germinales primordiales et la détermination du sexe

Les cellules germinales primordiales (CGP) sont les cellules embryonnaires diploïdes qui donneront ultimement les gamètes, c'est-à-dire les spermatozoïdes et les ovocytes. Trois semaines après la conception de l'embryon, les CGPs débutent une migration depuis l'ectoderme jusqu'à la paroi de la vésicule vitelline, qui est une structure extra-embryonnaire (Figure 1.2 A). Les CGPs se retrouvent ainsi hors de l'embryon jusqu'à la quatrième semaine où elles recommencent à migrer dans l'embryon. Tout en continuant leurs divisions mitotiques, elles suivent un chemin spécifique qui les mène à un endroit appelé crête génitale (Figure 1.2 B).

A)



B)

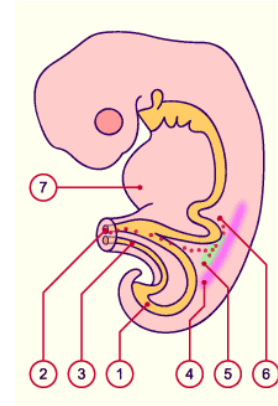


Figure 1.2 : Emplacement et migration des CGPs. A) Embryon de 3 semaines. 1) CGPs, 2) allantoïde, 3) intestin postérieur, 4) ectoderme, 5) intestin antérieur, 6) ébauche cardiaque, 7) vésicule vitelline, 8) endoderme, 9) mésoderme, 10) cavité amniotique. B) Embryon de 4 semaines. 1) intestin postérieur, 2) canal vitellin, 3) allantoïde, 4) crête néphrotique primitive, 5) crête génitale, 6) CGP, 7) éminence cardiaque. (Tiré d'embryology.ch)

La crête génitale, présente en paire, est le lieu de formation des futures gonades mâles et femelles. Elle se forme vers la cinquième semaine et sa colonisation par les CGPs est essentielle à son bon développement. À la fin de la sixième semaine, alors que les CGPs ont fini leur migration, il n'y a pas de différence entre les gonades mâles et femelles. Ce stade est par conséquent qualifié d'ébauche gonadique indifférenciée. Pour débiter sa différenciation sexuelle, l'ébauche gonadique indifférenciée doit recevoir des signaux moléculaires précis tels que ceux sommairement schématisés dans la Figure 1.3. Chez le mâle, c'est la présence du chromosome Y dans les cellules somatiques de la crête génitale qui déclenche la différenciation des cellules de l'ébauche gonadique. Sur le bras court du chromosome Y, on retrouve en effet le gène « Sex-determining Region Y » (Sry) qui code pour un facteur de transcription. Lorsqu'il est exprimé, SRY active la transcription de « SRY-box containing gene 9 » (Sox9) qui induit à son tour la transcription de plusieurs autres gènes permettant la formation du testicule et des gamètes mâles.

Il a longtemps été cru que l'absence de Sry menait automatiquement au développement de la gonade femelle. Cependant, on sait désormais qu'en plus de l'absence de Sry, plusieurs autres gènes agissent parallèlement pour gouverner la formation des cellules somatiques et

germinales femelles. De plus, l'expression de certains gènes-clés doit être maintenue constamment pour éviter la réversion de l'ovaire en gonade mâle. Deux gènes régulant la voie des WNTs, soit *Rspo1* et *Wnt4*, se montrent essentiels pour le développement de l'ovaire puisque leur absence dans les souris femelles provoque la réversion sexuelle partielle des gonades [1,2]. Les mécanismes impliqués seront d'ailleurs décrits un peu plus extensivement dans la section 1.3.2.1. Un autre gène, « Forkhead box L2 » (*Foxl2*), est aussi essentiel au développement de l'ovaire puisque son ablation mène à l'initiation de la réversion sexuelle de la gonade chez la souris femelle. Dans ce modèle, les cellules de la gonade se mettent en effet à exprimer fortement *Sox9* et prennent l'apparence de structures mâles [3]. Les mécanismes moléculaires régissant la détermination des gonades femelles sont donc très complexes et resteront à être clarifiés dans les prochaines années, probablement avec la découverte d'autres molécules-clés essentielles à la détermination sexuelle.

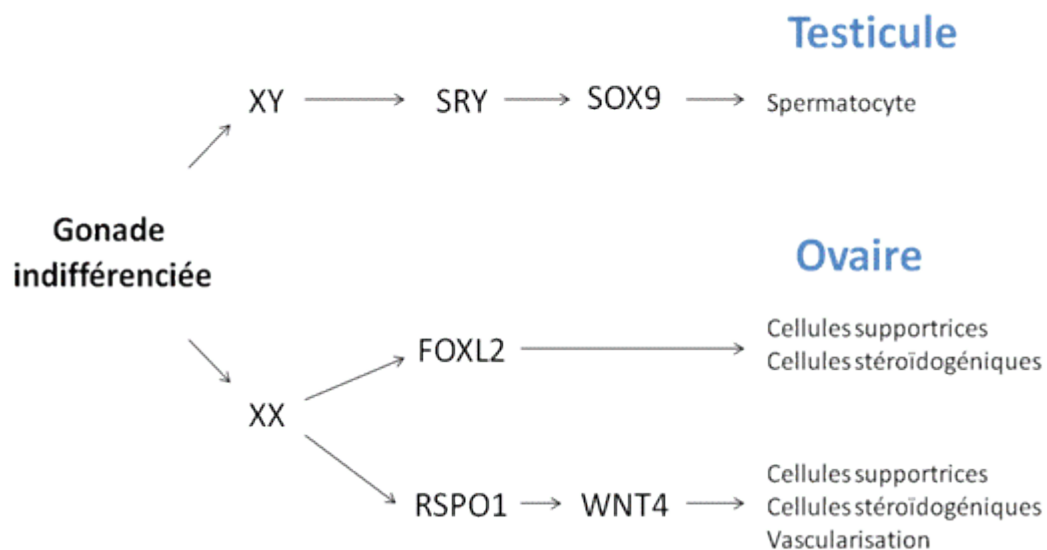


Figure 1.3 : Développement du testicule et de l'ovaire à partir de la gonade indifférenciée. Chez le mâle, l'expression du gène *Sry* déclenche une série d'évènements qui mèneront à la détermination du sexe et à la formation du testicule. Chez la femelle, en plus de l'absence de *Sry*, plusieurs gènes agissent de façon plus ou moins indépendante pour la détermination du sexe et la formation des différents types cellulaires qui composent l'ovaire.

1.1.3 Formation des follicules primordiaux

Lorsque le contexte moléculaire précédemment décrit correspond à la détermination femelle, la gonade indifférenciée poursuit sa différenciation vers la voie ovarienne. Ainsi, à partir de la neuvième semaine, les CGPs acquièrent un potentiel mitotique plus grand et changent légèrement de physiologie. Dès lors, ces cellules germinales sont appelées ovogonies [4]. À partir du quatrième mois, les ovogonies prolifèrent extensivement de façon synchrone et mitotique sans toutefois avoir une cytokinèse complète. Par conséquent, ces ovogonies se retrouvent presque toutes interreliées par un pont cytoplasmique et forme un amas appelé nid de cellules germinales ou cordons sexuels [5]. À l'intérieur de ce syncytium, les ovogonies vont alors entamer leur première division méiotique pour ainsi se transformer en ovocyte primaire. La méiose est subséquemment bloquée jusqu'à la puberté, les cellules étant alors au stade dictyotène. Durant cette période, une énorme réserve de plusieurs millions d'ovocytes se retrouve dans l'ovaire de l'embryon.

Au cours du deuxième trimestre de gestation, les cordons sexuels vont se désagréger possiblement grâce à l'action des protéases produites par les cellules somatiques de l'ovaire [6]. Chaque ovocyte, alors entouré d'une couche de cellules folliculaires aplaties provenant des cordons désagrégés, est désormais défini comme un follicule primordial. Finalement, une membrane basale se forme et entoure chaque nouveau follicule primordial. À la fin du processus de désagrégation des cordons sexuels, la réserve en follicules primordiaux est estimée à moins d'un million de follicules.

1.2 Structure et régulation de l'ovaire adulte

L'ovaire adulte est un organe possédant plusieurs caractéristiques morphologiques importantes (Figure 1.4). Tout d'abord, l'ovaire peut être divisé en deux zones: la zone médullaire et la zone corticale. La zone médullaire comprend le stroma et est formée de tissu conjonctif contenant les vaisseaux sanguins et lymphatiques. La zone corticale comprend, en plus du stroma, le parenchyme ovarien où se trouvent des follicules à différents stades de développement. La surface de l'ovaire est quant à elle formée par l'épithélium germinale qui est

composé de cellules cubiques simples. La folliculogénèse, l'ovulation et la régulation du corps jaune seront décrites dans les sections qui suivent afin de bien comprendre le fonctionnement de l'ovaire ainsi que le rôle des nouvelles molécules caractérisées dans cette thèse.

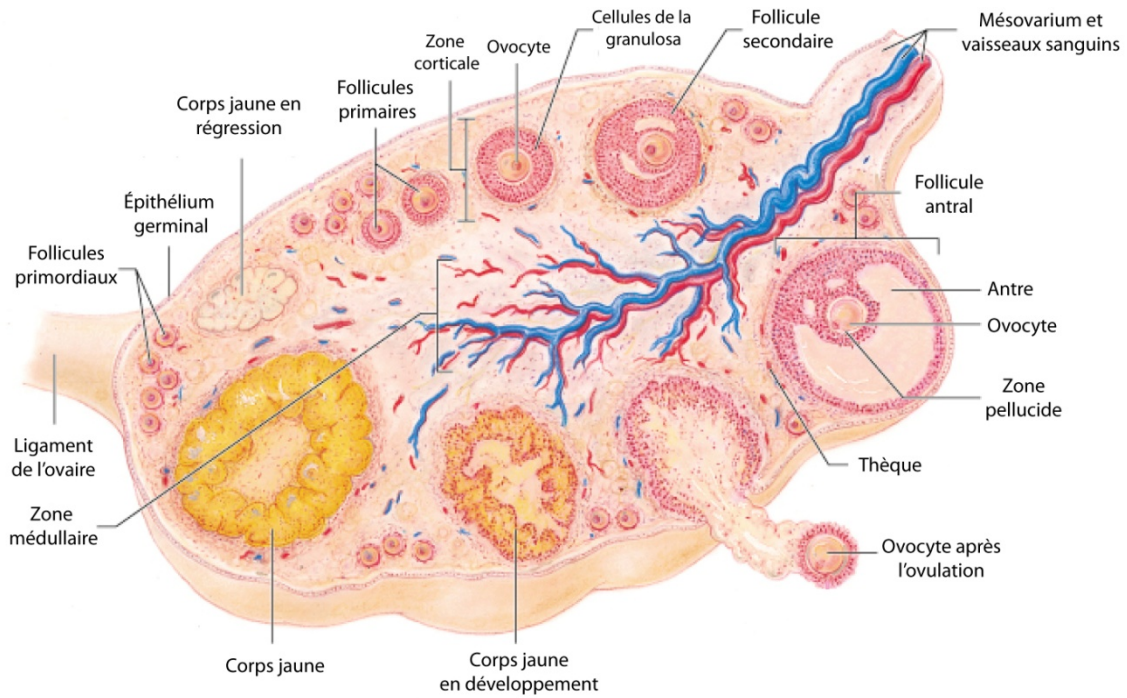


Figure 1.4 : Coupe transversale d'un ovaire montrant les différentes structures décrites dans le texte. (Adapté de Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc., 2001)

1.2.1 Folliculogénèse

Comme mentionné précédemment, les ovaires contiennent déjà tous leurs follicules primordiaux à la naissance et sont ainsi quasi quiescents jusqu'à l'arrivée de la puberté. À ce moment, le système reproducteur femelle redevient actif et permet aux follicules primordiaux de se développer en follicules primaires, secondaires et antraux. La majorité des follicules seront alors destinés à mourir dans un processus que l'on appelle atresie tandis que quelques follicules poursuivront leur développement pour permettre l'ovulation. Les étapes comprises entre la formation des follicules primordiaux et l'ovulation font partie d'un processus appelé folliculogénèse. Ce mécanisme est très complexe et nécessite la sécrétion de molécules spécifiques à des temps précis.

1.2.1.1 Axe hypothalamique-hypophysaire-gonadique et déclenchement de la puberté

Une des protéines indispensables lors de la folliculogénèse se nomme la gonadolibérine (GnRH, Gonadotropin-releasing hormone). Sommairement, ce décapeptide est sécrété par l'hypothalamus et se lie à son récepteur spécifique qui est présent sur les gonadotropes, qui sont des cellules sécrétrices de l'hypophyse. Dépendamment de la façon dont la GnRH est sécrétée, les gonadotropes se mettent à leur tour à sécréter l'hormone folliculostimulante (FSH, Follicle-Stimulating Hormone) ou l'hormone lutéinisante (LH, Luteinizing Hormone) qui se rendent aux ovaires en empruntant la circulation sanguine. Les ovaires peuvent par la suite sécréter l'estradiol, la progestérone et d'autres molécules qui empruntent aussi la circulation sanguine pour se rendre à l'hypothalamus et ainsi créer une rétrosignalisation positive ou négative. Ce système complexe, nommé l'axe hypothalamique-hypophysaire-gonadique (HPG, Hypothalamic-Pituitary-Gonadal), est essentiel à la reproduction femelle.

L'établissement de l'axe HPG commence à se forger dès la période fœtale. À ce stade, la sécrétion d'hormones par les gonades a un rôle essentiel sur la différenciation de certaines cellules neuronales qui feront partie de l'axe HPG. Ainsi, contrairement aux gonades embryonnaires femelles qui sont presque en dormance, les testicules embryonnaires sécrètent une quantité importante de testostérone et d'estradiol. La présence d'estradiol chez le fœtus

amène une masculinisation de la région de contrôle hypothalamique alors que son absence mène à un système féminisé [7]. Une fois le développement embryonnaire terminé, les systèmes neuraux hypothalamiques mâle et femelle ont ainsi les particularités nécessaires pour répondre adéquatement au contexte hormonal sexuel dans lequel ils se situent.

Malgré le fait que le réseau de contrôle neural hypothalamique soit morphologiquement développé très tôt, il ne devient actif qu'à l'adolescence. En effet, la molécule-clé GnRH commence à être sécrétée seulement à la puberté, lorsque la situation moléculaire spécifique le permet. Pour ce faire, des signaux excitatifs de sécrétion sont émis alors que des signaux inhibiteurs sont réprimés. Parmi les signaux transynaptiques déclenchant la sécrétion de GnRH, on retrouve le glutamate [8], la kisspeptine [9] et la neurokinine B [10]. Le contrôle répressif de la GnRH est quant à lui assuré par la sécrétion de molécules neuronales telles que le GABA, des opioïdes et le produit du gène *Rfrp* [8]. Finalement, en plus des molécules neuronales décrites précédemment, le contrôle de la sécrétion de la GnRH lors de la puberté se fait aussi grâce aux informations provenant des cellules gliales, c'est-à-dire les cellules supportrices du réseau de neurones. Le déclenchement de la puberté est donc un processus très complexe nécessitant l'orchestration de plusieurs molécules qui mènent ultimement à la sécrétion de GnRH [8].

1.2.1.2 Activation folliculaire

L'activation folliculaire est le processus irréversible par lequel un follicule passe du stade primordial à primaire. Cette transition se caractérise par un élargissement de l'ovocyte et une transformation des cellules de la granulosa qui l'entourent, qui passent de forme squameuse à cubique [11] (Figure 1.4). Ce processus s'effectue de façon continue, ce qui suggère qu'il serait indépendant de la sécrétion cyclique de gonadotrophines. En effet, à ce stade, l'activation folliculaire serait plutôt dirigée par la communication moléculaire bidirectionnelle entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa. De nombreuses études, effectuées majoritairement chez la souris, ont d'ailleurs démontré l'importance de molécules-clés importantes lors de l'activation folliculaire.

D'abord, plusieurs membres de la famille « Transforming Growth Factor Beta » (TGF- β), tels que les protéines « Bone Morphogenetic Protein » (BMP) 4, 5, 15 et « Growth Differentiation Factor » (GDF) 9, ont été identifiés comme étant des molécules activatrices sécrétées par l'ovocyte au stade du follicule primordial [12,13]. L'ovocyte sécrète aussi des molécules impliquées dans le contrôle négatif de l'activation folliculaire telles que les facteurs de transcription « Newborn Ovary homeobox » (NOBOX), « Lim Homeobox » (LHX) 8 et « Spermatogenesis et Oogenesis basic Helix-loop-helix » (SOHLH) 2.

La sécrétion de molécules par l'ovocyte ne permet cependant pas à elle seule de déclencher l'activation folliculaire. Il est désormais établi que les cellules squameuses de la granulosa qui entourent l'ovocyte assurent aussi ce contrôle grâce à des molécules précises. Par exemple, les cellules de la granulosa sécrètent le « Kit Ligand » (KL) qui est essentiel à l'activation folliculaire [12] ainsi que l'« Anti-Mullerian Hormone » (AMH) qui modère le niveau d'activation pour éviter une perte précoce de la réserve folliculaire [11]. Finalement, des données récoltées chez le bovin suggèrent que la production d'hormones stéroïdes par les cellules de la granulosa pourrait aussi avoir un rôle à jouer lors de l'activation folliculaire [11].

1.2.1.3 Formation du follicule secondaire

Une fois activé, le follicule est désormais libéré de sa phase quiescente et poursuit son développement afin de devenir un follicule secondaire (aussi appelé préantral). Cette transition est caractérisée par la croissance de l'ovocyte, la multiplication des cellules de la granulosa et l'addition d'une couche cellulaire supplémentaire appelée la thèque. La thèque se situe à l'extérieur de la membrane basale et commence à être visible dans un follicule qui contient deux couches ou plus de cellules de la granulosa (Figure 1.4). Plusieurs études suggèrent que les cellules de la thèque proviennent de précurseurs fibroblastiques originellement présents dans le stroma ovarien [14]. Au niveau morphologique, les cellules thécales ont des structures caractéristiques aux cellules stéroïdogéniques, c'est-à-dire une abondance de mitochondries avec des cristaes tubulaires, un réticulum endoplasmique lisse et une abondance de vésicules lipidiques. Au tout début de sa formation, la thèque sert plutôt de support structural au follicule. Cependant, en se développant, la thèque acquiert des récepteurs LH et développe un

réseau de capillaires qui lui permet de produire des hormones androgènes. L'implication de la thèque lors de la stéroïdogénèse sera d'ailleurs discutée en détail dans la section 1.2.1.4.2.

Tout comme pour l'étape de l'activation folliculaire décrite précédemment, le processus de transformation du follicule primaire à secondaire est aussi indépendant de la sécrétion de gonadotrophines et doit être dirigé par une signalisation autocrine et paracrine. Des études effectuées chez la souris et le mouton indiquent d'ailleurs que le GDF9, le TGF β , les « Activin-like Receptor kinases » (ALK) 3, 5 et 6, la follistatine, l'inhibine A, l'AMH et « l'Insulin Growth Factor » (IGF) 1 et 2 seraient impliqués dans ce processus [11,15].

1.2.1.4 Formation du follicule antral

Alors qu'il poursuit son expansion, le follicule secondaire commence à se remplir de liquide pour former une cavité appelée antra. Dès ce moment, le follicule est qualifié d'antral (Figure 1.4). L'augmentation substantielle de la taille du follicule est non seulement due à l'accumulation de liquide dans l'antra, mais aussi aux divisions successives des cellules de la granulosa. La vaste majorité de ces follicules antraux mourront cependant par atresie folliculaire, qui est un processus apoptotique complexe et régulé par une multitude de protéines et d'hormones [16]. Les sous-sections suivantes décriront quelques particularités et fonctions du follicule antral en croissance.

1.2.1.4.1 Stimulation par la FSH

Une des caractéristiques du follicule au stade antral est désormais la nécessité de dépendre à une signalisation extra-ovarienne gouvernée par la FSH. Cette hormone est une glycoprotéine sécrétée par l'hypophyse suite à la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus. La FSH est constituée d'une sous-unité α commune à toutes les gonadotrophines et d'une sous-unité β permettant la liaison spécifique de l'hormone avec son récepteur (FSHR), qui est lui-même couplé à une protéine G. De façon classique, la liaison de la FSH à son récepteur active la voie de signalisation Adénylate Cyclase (AC)/« cyclic Adenosine Monophosphate » (cAMP)/Protéine Kinase A (PKA). Cette voie active ensuite la protéine « cAMP Response

Element Binding » (CREB) par phosphorylation. Ce facteur de transcription phosphorylé induit alors la transcription de plusieurs gènes cibles tels que l'aromatase, les sous-unités α et β de l'inhibine, le récepteur de la LH et plusieurs autres [17]. La FSH régule aussi certains gènes de façon PKA-indépendante, en passant par la voie Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K).

La régulation du follicule antral par la FSH devient essentielle car elle permet la survie du follicule, la synthèse d'estradiol et la prolifération des cellules de la granulosa [17].

1.2.1.4.2 Production d'estradiol

L'estradiol est produit principalement par les ovaires chez les femmes adultes non ménopausées. Cette hormone est essentielle à la reproduction femelle mais agit aussi sur plusieurs autres tissus non reproducteurs. Par exemple, à la puberté, l'estradiol est responsable du développement des caractéristiques sexuelles secondaires telles que le développement des seins et le changement de forme corporelle. De plus, tout au long de la vie adulte, l'estradiol régule plusieurs fonctions telles que le comportement sexuel, le remodelage osseux, le métabolisme lipidique, la carcinogenèse et beaucoup d'autres [18]. Par ailleurs, c'est majoritairement la baisse d'estradiol lors de la ménopause qui cause tant d'inconforts et de problèmes aux femmes. La production d'estradiol se fait chez le follicule antral grâce à la coopération de deux types cellulaires : les cellules de la thèque et les cellules de la granulosa (Figure 1.5). Puisque les cellules de la thèque répondent à la gonadotrophine LH et que les cellules de la granulosa répondent à la gonadotrophine FSH, ce processus est souvent nommé « deux cellules-deux gonadotrophines ».

Ainsi, la première étape de la production d'estradiol dans le follicule antral s'effectue lorsque la LH se lie à son récepteur spécifique (LHR) situé sur les cellules de la thèque. Ceci active alors la signalisation cAMP et mène conséquemment à l'expression de plusieurs enzymes stéroïdogéniques-clés telles que « P450 cholesterol side-chain cleavage » (CYP11A1), « cytochrome P450 17A1 » (CYP17), « 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/delta(5)-delta(4)isomerase type II » (HSD3B2) et « Steroidogenic Acute Regulatory Protein » (StAR) [19] (Figure 1.5). La cellule thécale, qui possède dorénavant cette

panoplie d'enzymes, obtient d'abord du cholestérol circulant grâce aux lipoprotéines de haute et faible densités (HDL et LDL, High et Low Density Lipoprotein). À cause de sa nature hydrophobe, le cholestérol doit ensuite se lier à une protéine de transport telle que « Sterol Carrier Protein 2 » (SCP-2) pour circuler à l'intérieur de la cellule thécale et atteindre la membrane externe de la mitochondrie. De là, l'enzyme StAR le transporte vers la membrane mitochondriale interne où l'enzyme CYP11A1 effectue la première étape de la stéroïdogénèse en transformant le cholestérol en pregnenolone. Les enzymes HSD3B2 et CYP17 transforment alors successivement la pregnenolone en androstenedione, qui diffuse ensuite à travers la membrane basale pour se rendre aux cellules de la granulosa. Pendant ce processus, d'autres hormones stéroïdes peuvent aussi être synthétisées par la cellule thécale mais de façon plus modeste [20].

Tandis que le contrôle de la synthèse d'androstenedione se fait par la LH chez les cellules de la thèque, la production finale d'estradiol par les cellules de la granulosa se fait plutôt grâce à l'action de la FSH (Figure 1.5). Tout comme pour la LH, la liaison de la FSH à son récepteur sur les cellules de la granulosa active la signalisation cAMP qui induit cette fois la production d'enzymes telles que l'aromatase (CYP19) et l'« hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 1 » (HSD17B1). Les cellules de la granulosa ont ainsi la capacité de transformer l'androstenedione d'origine thécale en estrone grâce à l'enzyme CYP19. L'enzyme HSD17B1 permet finalement la transformation de l'estrone en une hormone stéroïde plus active, l'estradiol [20].

L'estradiol, en plus des fonctions basales énumérées précédemment, permet aussi la régulation négative de FSH par les gonadotropes (Figure 1.6). La croissance des follicules antraux amène ainsi une augmentation des niveaux d'estradiol circulant qui résulte en la diminution de la sécrétion de FSH.

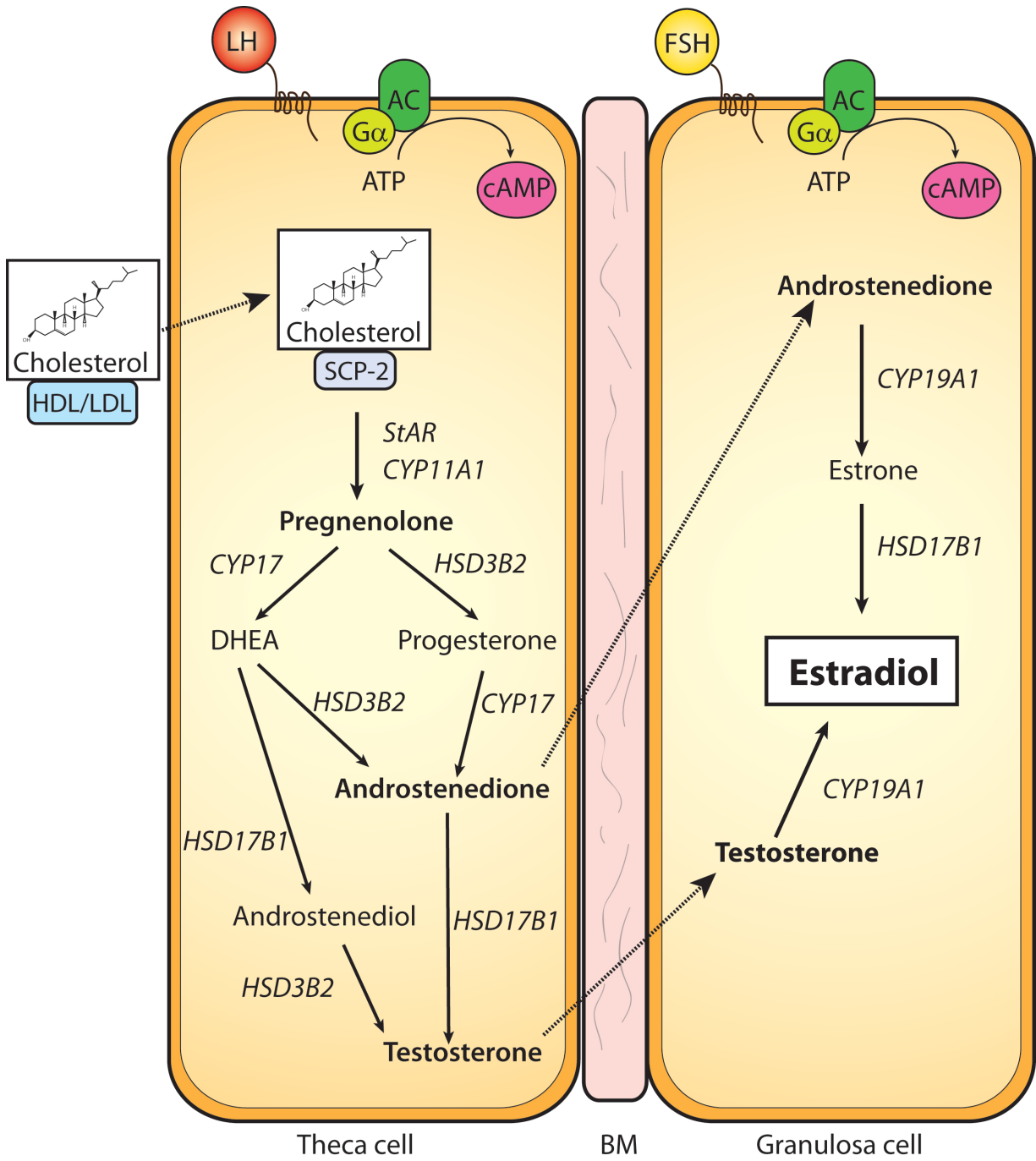


Figure 1.5 : Transformations enzymatiques permettant la synthèse d'estradiol par le follicule antral. (Tiré de Lapointe et *al.*, *Frontiers in Bioscience*, 2011)

1.2.1.4.3 Production d'inhibine, d'activine et de follistatine

En plus de l'estradiol, d'autres molécules sont sécrétées par le follicule antral et ont une importance majeure dans la régulation de l'axe HPG. Tout d'abord, deux membres de la famille TGF- β sont particulièrement importants dans la signalisation ovarienne-hypothalamique : l'inhibine et l'activine. Ces deux protéines sont formées de dimères reliés par un pont disulfure. Dans le cas de l'inhibine, une sous-unité α est reliée à une sous-unité β_A ou à une sous-unité β_B . Il y a donc deux types d'inhibine conséquemment nommées inhibine A (INHA) ou inhibine B (INHB), selon la nature de la sous-unité β . Dans le cas de l'activine, les deux sous-unités composant le dimère sont du type β_A ou β_B , les mêmes que celles retrouvées chez l'inhibine. Dépendamment de l'agencement des dimères, il peut donc y avoir de l'activine A ($\beta_A \beta_A$), de l'activine AB ($\beta_A \beta_B$) ou de l'activine B ($\beta_B \beta_B$). Des combinaisons de dimères avec des sous-unités β de natures différentes sont aussi possibles mais non présentes dans le contexte de la reproduction. Un autre membre important pour la régulation de l'axe HPG est la glycoprotéine nommée follistatine (FST). Cette protéine ubiquitaire a une très forte affinité pour l'activine et tend ainsi à neutraliser celle-ci. La FST peut aussi se lier faiblement à l'inhibine sans toutefois l'empêcher d'effectuer sa signalisation.

Tandis que les gonadotrophines FSH et LH permettent la communication provenant de l'hypophyse/hypothalamus vers les ovaires, les activines, inhibines et follistatine permettent plutôt une communication inverse provenant des ovaires jusqu'à l'hypophyse/hypothalamus (Figure 1.6). L'activine B, qui est sécrétée par les gonadotropes, induit premièrement la synthèse et la sécrétion de FSH via l'augmentation de la transcription du gène *Fshb*, qui code pour la sous-unité β de la FSH [21]. Les ovaires sécrètent quant à eux les INHA et INHB qui agissent de façon endocrine sur les gonadotropes afin inhiber la production de FSH. Pour ce faire, l'INHA et l'INHB neutralisent l'action des activines locales en se liant de façon compétitive au même récepteur présent sur les gonadotropes [22]. Quant à la follistatine, il semblerait qu'elle agirait de façon autocrine ou paracrine au niveau des gonadotropes. En effet, même si la FST est présente en circulation, elle est pratiquement toute liée aux activines circulantes ce qui élimine une possible régulation endocrine par cette molécule.

Le modèle général de signalisation par l'axe HPG a été majoritairement construit grâce à des données expérimentales provenant d'animaux de diverses espèces. Cependant, différents

résultats obtenus jusqu'à présent chez les humains de façon *in vivo* ou *in vitro* supportent ce modèle même chez l'espèce humaine.

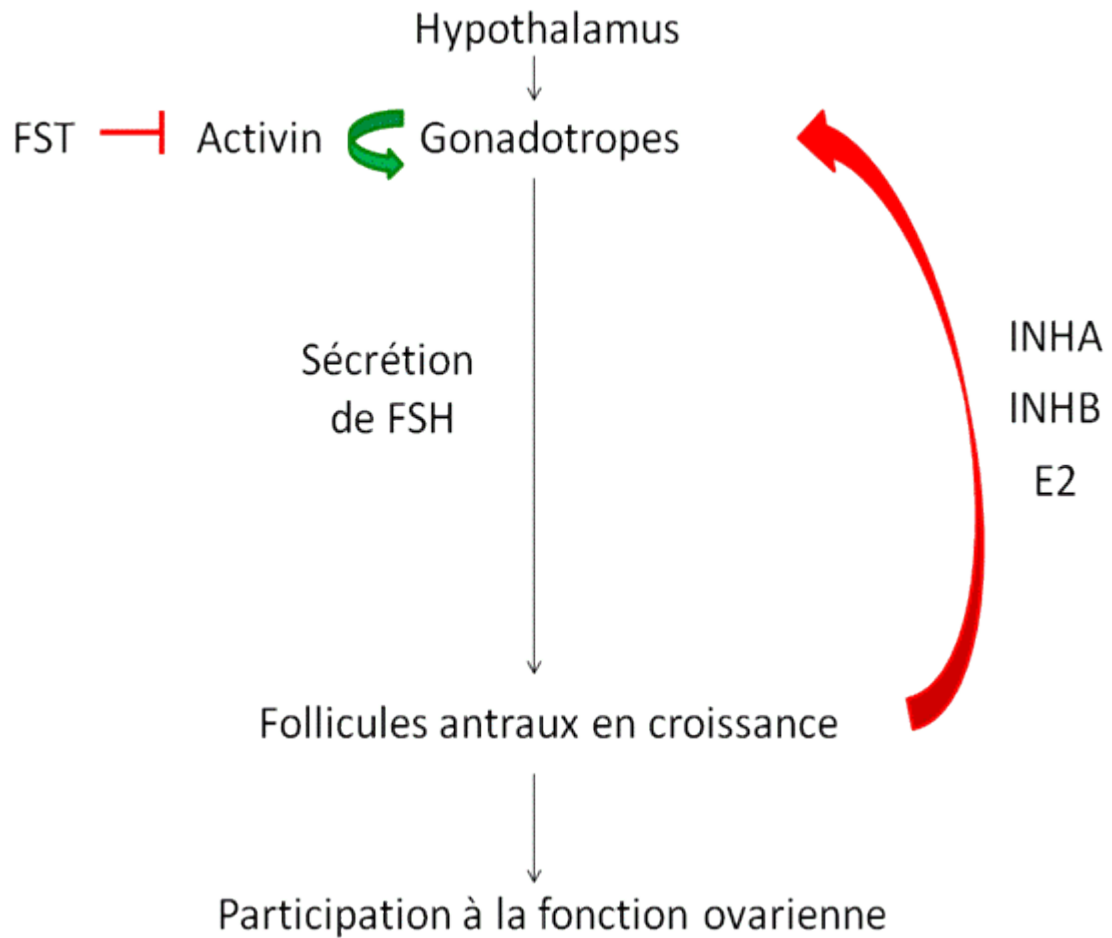


Figure 1.6 : Modèle simplifié de la régulation de la sécrétion de FSH par l'axe HPG. Le rouge et le vert indique respectivement un contrôle négatif et positif de la sécrétion de FSH.

1.2.1.4.4 Vagues folliculaires et follicule dominant

Chez plusieurs espèces étudiées, telles que l'humain, la souris et la vache, la croissance folliculaire s'effectue par vague. On définit ainsi une vague folliculaire comme étant la croissance d'un groupe de follicules de façon synchrone. Selon les espèces, qu'il y ait deux, trois ou quatre vagues folliculaires, seule la dernière sera ovulatoire [23]. Chez les espèces mono-ovulatoires, un seul follicule par vague parviendra à l'étape finale d'ovulation. Le mécanisme permettant la maturation complète d'un seul follicule par cohorte est divisé en plusieurs étapes : le recrutement, la sélection et la dominance. Le recrutement d'une cohorte de follicules se fait grâce à l'augmentation de FSH, qui est essentielle à la survie des follicules antraux. Ainsi, les follicules qui possèdent suffisamment de FSHR peuvent échapper à l'apoptose et être « recrutés » pour poursuivre leur développement. Parmi ceux-ci, un seul follicule sera ensuite sélectionné et sera désormais qualifié de dominant (FD). Ce FD a une croissance particulièrement rapide et produit des niveaux plus élevés d'estradiol et d'inhibine. Les mécanismes par lesquels ce follicule devient dominant restent à être élucidés, mais il semblerait que celui-ci soit plus sensible à la FSH grâce à l'augmentation de récepteur FSH/LH et à la sécrétion de divers facteurs locaux [24].

L'estradiol et les inhibines produits par le FD et la cohorte, comme mentionné précédemment, créent ensuite un signal rétroactif vers les gonadotropes qui résulte en la diminution marquée de la sécrétion de FSH. Puisque les follicules antraux dépendent de la présence de la FSH pour survivre, la diminution de cette gonadotrophine entraîne l'atrésie de tous les follicules de la cohorte recrutée, à l'exception du FD qui demeure sensible à ce faible niveau hormonal [24]. De plus, le FD réussit aussi à croître en passant graduellement de FSH-dépendant à LH-dépendant, ce qui lui permet de poursuivre les étapes nécessaires à l'ovulation dans un environnement pauvre en FSH et riche en LH [25].

Tout au long de la croissance du FD, les cellules de la granulosa composant celui-ci subissent elles aussi plusieurs modifications morphologiques et fonctionnelles. Deux types de cellules de la granulosa sont alors distinguables: les cellules entourant l'ovocyte forment ce qu'on appelle le cumulus alors que les cellules distales sont qualifiées de murales (Figure 1.7). À ce stade, les cellules du cumulus sont reliées entre elles par des jonctions intercellulaires et possèdent un index mitotique élevé. De plus, les cellules du cumulus ont des extensions

cellulaires qui les relie à l'ovocyte afin de permettre une bonne communication. L'ovocyte et les cellules du cumulus qui entourent celui-ci forment désormais un complexe dynamique qui est appelé le complexe ovocyte-cumulus (COC). Les cellules murales, accolées à la membrane basale, participent quant à elles aux étapes de la stéroïdogénèse précédemment décrites [25].

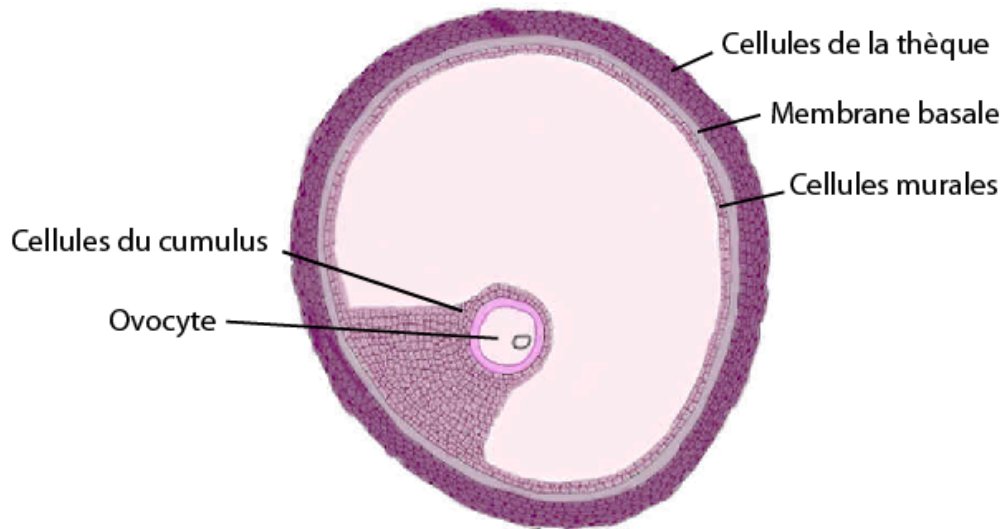


Figure 1.7: Structures présentes dans le follicule antral pré-ovulatoire. (Adapté d'embryology.ch)

1.2.2 Ovulation

La sécrétion importante d'estradiol par le FD lors de sa croissance a pour effet de déclencher la modification du pulse de GnRH par l'hypothalamus et d'augmenter ainsi de façon substantielle la sécrétion de LH par les gonadotropes. Ce processus, communément appelé pic de LH, dirige plusieurs étapes qui mèneront ultimement à la libération d'un ovocyte fécondable. D'abord, le COC subit une transformation morphologique appelée expansion du cumulus. Pour ce faire, les cellules du cumulus rétractent leurs projections cellulaires et perdent les ponts intercellulaires qu'elles ont entre elles et avec l'ovocyte [26]. Ensuite, les

cellules du cumulus commencent à sécréter de l'acide hyaluronique, des protéoglycans et d'autres molécules structurales qui formeront une riche matrice fonctionnellement indispensable à l'ovulation et à la fécondation [27]. En effet, cette matrice extracellulaire collante entourera l'ovocyte lors de l'ovulation pour lui permettre d'être attrapé plus facilement par les fimbriaes et pour être retenu plus longtemps dans la trompe de Fallope [26]. De plus, comme discuté précédemment, les ovocytes ont entamé leur première division méiotique dans l'embryon mais l'ont arrêtée au stade de prophase I. Le pic de LH préovulatoire permet donc à l'ovocyte du FD de poursuivre sa méiose, un processus nommé reprise méiotique.

Finalement, l'augmentation soudaine de LH induit aussi l'expression d'une série de protéases qui permettent la dégradation de la matrice extracellulaire à un endroit précis du follicule appelé apex. Cette dégradation, en plus de la pression hydrostatique provenant du liquide intrafolliculaire, permet ultimement la rupture du follicule et la libération de l'ovocyte dans la cavité abdominale. L'ovocyte, alors entouré de cellules du cumulus, se rend subséquemment dans une trompe de Fallope pour être fécondé ou non par un spermatozoïde.

1.2.2.1 Voies de signalisation responsables du processus ovulatoire

C'est l'activation de multiples voies de signalisation par la gonadotrophine LH qui assure le déclenchement de tous les processus ovulatoires brièvement résumés ci-dessus. Pour ce faire, la LH se lie d'abord au LHR présent seulement sur les cellules de la thèque et sur les cellules de la granulosa murales [28]. Cette liaison active par la suite une série complexe de voies de signalisation dont la voie cAMP/PKA (la plus connue), la voie PI3K /AKT et plusieurs autres [29]. Le signal cAMP/PKA induit alors rapidement et de façon transitoire l'expression de plusieurs protéines telles que l'amphiréguline (AREG), l'épiréguline (EREG) et la betacelluline (BTC) (Figure 1.8). Ces protéines solubles se rendent ensuite aux cellules du cumulus qui ne possèdent pas les récepteurs nécessaires pour répondre directement à la LH. De là, lorsque ces protéines effectrices se lient au récepteur de l'« Epidermal Growth Factor » (EGFR), elles activent la protéine RAS qui induit à son tour la transcription de gènes importants tels que la « hyaluronan synthase 2 » (*Has2*), la « prostaglandin-endoperoxide

synthase 2 » (*Ptgs2*) et le « TNF- α -induced protein 6 » (*Tnfaip6*) chez les cellules du cumulus. Des études suggèrent aussi que les protéines « Extracellular-signal-regulated Kinases » 1 et 2 (ERK1/2) agiraient en aval d'AREG, EREG et BTC pour activer les gènes nécessaires au bon déroulement de l'ovulation [30]. En plus des effecteurs nommés ci-dessus, plusieurs régulateurs transcriptionnels ont aussi des rôles essentiels à jouer dans l'induction de gènes nécessaires aux processus ovulatoires. Les facteurs de transcription « Nuclear Receptor subfamily 5 » (NR5) A2 (aussi connue sous le nom LHR1) et « CCAAT/enhancer-binding Protein » (C/EBP) β sont ainsi indispensables à l'ovulation et régulent la transcription de plusieurs gènes tels que *Cyp19*, «sulfotransferase family 1E member 1 » (*Sult1e1*), *Cyp11a1*, « nitric oxide synthase 3 » (*Nos3*) et *Ptgs2* [31,32] (Figure 1.8). Un autre membre important pour la régulation transcriptionnelle de l'ovulation est sans aucun doute le récepteur de la progestérone (PR) [33]. Ce récepteur nucléaire, qui agit comme un facteur de transcription lorsque lié à la progestérone, active la transcription de plusieurs gènes tels que « Pentraxin related gene » (*Ptx3*) et *Adamts1*, en plus de permettre l'expression de plusieurs autres facteurs de transcription qui activent à leur tour une panoplie de gènes ovulatoires [28].

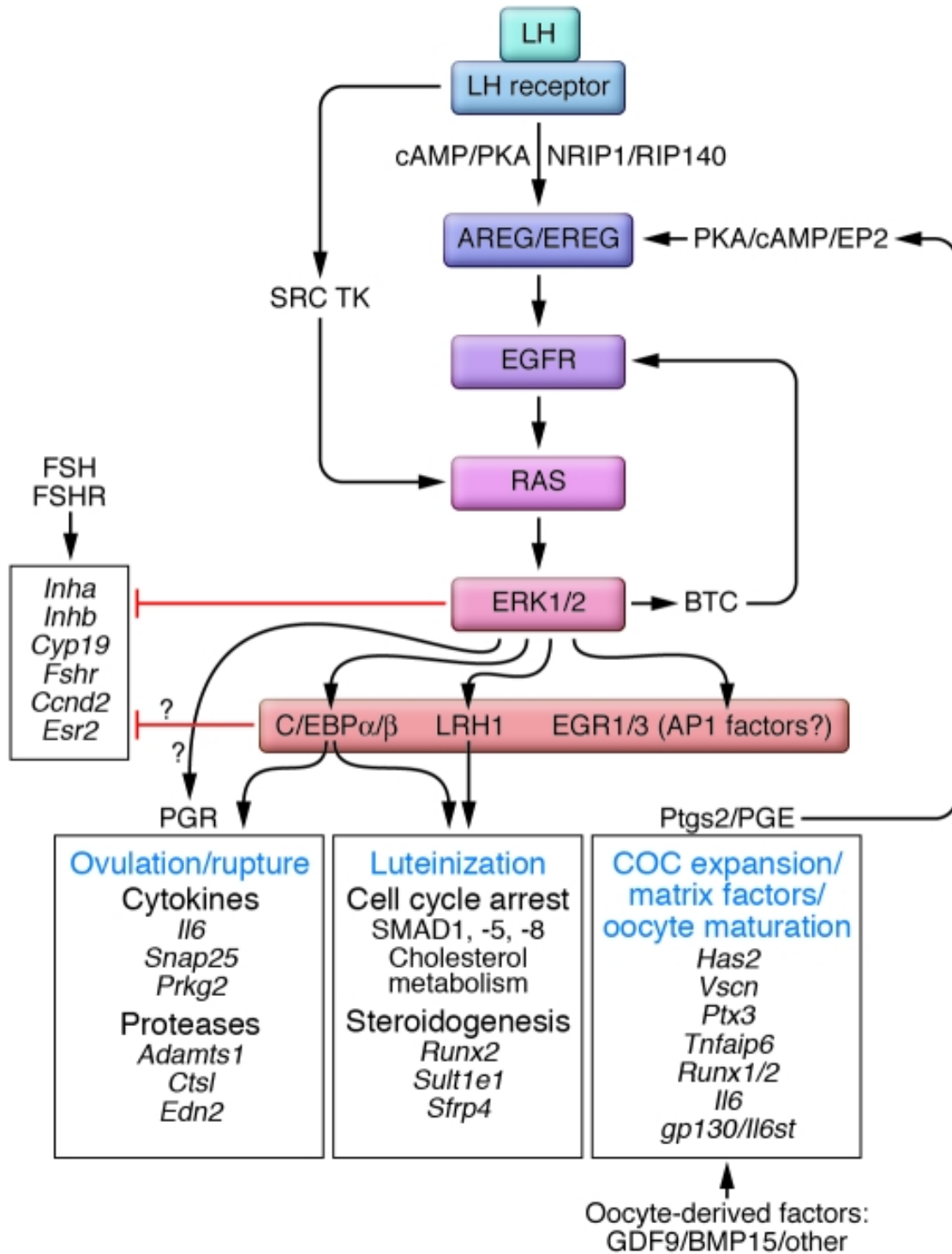


Figure 1.8 : Schématisation d'une partie de la signalisation moléculaire induite par le pic de LH. (Tiré de Richards et *al.*, Journal of Clinical Investigation, 2010)

Les voies de signalisation menant à l'ovulation sont donc considérablement complexes et leur élucidation n'est certainement pas terminée. De plus, les gènes induits par celles-ci sont très nombreux et la compréhension de leurs fonctions au niveau de l'ovulation est souvent incomplète. Le tableau ci-dessous (Tableau 1) atténue légèrement cette complexité et sert de référence pour situer de façon approximative les fonctions de certains gènes ovariens présentés dans cette thèse. Il est à noter qu'une classification plus exhaustive trierait les gènes dans plus d'une catégorie.

Tableau 1 : Classement, par fonction, de différents gènes discutés dans cette thèse.

Gènes et fonctions		Réf.
<i>Développement folliculaire</i>		
<i>Fshr</i>	follicle stimulating hormone receptor	[34]
<i>Reln</i>	reelin	[35]
<i>Cyp19a1</i>	cytochrome P450, family 19, subfamily a, polypeptide 1	[20]
<i>Expansion du cumulus-régulation</i>		
<i>Areg</i>	amphiregulin	[30]
<i>Btc</i>	betacellulin	[30]
<i>Ereg</i>	epiregulin	[30]
<i>Il6</i>	Interleukin 6	[36]
<i>Sult1e1</i>	sulfotransferase family 1E, member 1	[37]
<i>Expansion du cumulus- matrice extracellulaire</i>		
<i>Cspg2</i>	versican	[38]

<i>Has2</i>	hyaluronan synthase 2	[38]
<i>Lox</i>	lysyl oxidase	[39]
<i>Ptgs2</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	[38]
<i>Ptx3</i>	pentraxin related gene	[38]
<i>Tnfaip6</i>	tumor necrosis factor alpha induced protein 6	[38]

Formation et fonction du corpus luteum

<i>Ccnd2</i>	cyclin D2	[40]
<i>Cdkn1b</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	[41]
<i>Cyp11a1</i>	cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1	[20]
<i>Hsd3b2</i>	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 2	[20]
<i>Lhcgr</i>	lutinizing hormone/choriogonadotropin receptor	[40]
<i>StAR</i>	steroidogenic acute regulatory protein	[20]

Fonction ovarienne exacte à être déterminée

<i>Alcam</i>	activated leukocyte cell adhesion molecule	[42]
<i>Btg2</i>	B cell translocation gene 2, anti-proliferative	[43]
<i>Egr1</i>	early growth response 1	[44]
<i>Enc1</i>	ectodermal-neural cortex 1	[45]
<i>Grem1</i>	gremlin 1	[46]
<i>Grem2</i>	gremlin 2	[42]
<i>Il18</i>	interleukin 18	[42]
<i>Klf4</i>	Kruppel-like factor 4	[42]
<i>Nts</i>	neurotensin	[42]
<i>Sema3a</i>	sema domain, Ig domain, short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A	[42]
<i>Slc30a3</i>	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 3	[47]
<i>Tgfb1</i>	transforming growth factor, beta 1	[48]

Fonctionnement de l'ovocyte

<i>Bmp15</i>	bone morphogenetic protein 15	[49]
<i>Dppa3</i>	developmental pluripotency-associated 3	[50]
<i>Nlrp5</i>	NLR family, pyrin domain containing 5	[51]
<i>Zp1</i>	zona pellucida glycoprotein 1	[42]
<i>Zp2</i>	zona pellucida glycoprotein 2	[42]
<i>Zp3</i>	zona pellucida glycoprotein 3	[42]

Voie des WNTs

<i>Fzd1</i>	frizzled homolog 1 (Drosophila)	Voir section 1.3
<i>Fzd2</i>	frizzled homolog 2 (Drosophila)	
<i>Fzd4</i>	frizzled homolog 4 (Drosophila)	
<i>Wnt4</i>	wingless-related MMTV integration site 4	
<i>Wnt5a</i>	wingless-related MMTV integration site 5a	
<i>Wnt11</i>	wingless-related MMTV integration site 11	
<i>Sfrp2</i>	secreted frizzled-related protein 2	
<i>Sfrp4</i>	secreted frizzled-related protein 4	
<i>Axin2</i>	axin2	
<i>Fam126a</i>	family with sequence similarity 126, member A	[52]

1.2.3 Le corpus luteum

Suite à la libération du COC par le follicule, les cellules de la granulosa et de la thèque restantes subissent une transformation qui leur permet d'acquies de toutes nouvelles caractéristiques et fonctions. Ce processus, appelé lutéinisation, mène à la formation du corpus luteum (CL, aussi appelé corps jaune) qui est une glande essentielle à la fertilité grâce à sa production de progestérone. Si l'ovocyte n'est pas fécondé, le corps jaune régresse et un nouveau cycle peut alors recommencer. Les sections suivantes résument quelques

particularités associées à cette structure. Vu l'accessibilité réduite d'échantillons cliniques servant à l'étude du corps jaune, la majorité des données présentées dans les prochaines sections proviendront d'études faites chez les rongeurs.

1.2.3.1 Lutéinisation

La lutéinisation est caractérisée par la réorganisation et la différenciation des cellules de la granulosa et de la thèque. Ainsi, suite à l'ovulation, la membrane basale folliculaire se désagrège et permet la rapide infiltration de cellules de la thèque, de fibroblastes et de cellules endothéliales. L'intense vascularisation du CL qui s'effectue durant cette période permet à chaque cellule lutéale d'avoir un apport sanguin direct pour bien accomplir ses fonctions.

En plus de cette réorganisation cellulaire, une multitude de gènes sont modulés afin de permettre la différenciation terminale des cellules de la granulosa et des cellules de la thèque. Tout d'abord, plusieurs protéines impliquées au niveau du contrôle du cycle cellulaire sont régulées de façon complexe afin d'arrêter la division cellulaire des cellules en différenciation. Par exemple, il a été montré que le signal émis par la LH inhibe l'expression de la cycline D2 (*Ccnd2*) et induit l'expression de l'inhibiteur de cyclines « Cyclin-dependent Kinase inhibitor 1B » (*Cdkn1b*). Ainsi, dans le CL, les cellules lutéales sont majoritairement arrêtées au stade G₀/G₁ du cycle cellulaire [53].

Les cellules en lutéinisation se mettent également à exprimer une toute nouvelle combinaison de récepteurs leur permettant de répondre de façon appropriée aux stimuli post-ovulatoires. Tout d'abord, le pic de LH amène une diminution marquée de l'expression du FSHR qui n'est désormais plus nécessaire dans les cellules lutéales [54]. L'expression du LHR est quant à elle d'abord induite suite à l'augmentation de LH pour ensuite être atténuée peu après [53]. Ainsi, les bas niveaux de FSHR et de LHR dans le CL ne permettent plus aux cellules lutéales d'être régulées par la FSH et la LH. Le pic de LH précédant la lutéinisation permet finalement la surexpression de récepteurs qui n'avaient peu ou pas de fonctions lors du développement folliculaire. Par exemple, des données démontrent que les cellules lutéales se mettent à exprimer le récepteur de la prolactine (PRL-R) et le récepteur de l'œstrogène (ER)- α plutôt que le ER- β [53].

1.2.3.2 Fonctions du CL

Lors du développement folliculaire, les cellules de la granulosa en coopération avec les cellules de la thèque effectuaient majoritairement la sécrétion d'estradiol. La lutéinisation, manifestée par des changements de récepteur cellulaire et par des modifications d'expression génique, permet désormais aux cellules différenciées d'accomplir la synthèse de progestérone, une hormone essentielle au maintien de la gestation (Figure 1.9). Grâce à l'importante vascularisation du CL, les cellules lutéales peuvent obtenir leur cholestérol directement par la circulation sanguine. Rendu dans la cellule, le cholestérol se lie à SCP-2 et est transloqué à l'intérieur de la mitochondrie grâce à l'action de plusieurs protéines telles que StAR et «Peripheral-type Benzodiazepine Receptor» (PBR) [53,55]. L'action successive des enzymes CYP11a1 et HSD3B2 mène finalement à la formation de progestérone qui est relâchée dans la circulation sanguine (Figure 1.9). En plus d'être régulé au niveau de sa synthèse par le CL, le niveau de progestérone circulante semble aussi être contrôlé par la présence d'enzymes inactivantes. Par exemple, chez les rongeurs, l'expression de «20- α -hydroxysteroid dehydrogenase» (20 α -HSD) permet la conversion de la progestérone en progestine inactive [53]. Ce mécanisme, qui amène une réduction efficace du niveau de progestérone sécrétée par le CL, permettrait le déclenchement de la parturition qui nécessite de bas niveaux de progestérone circulante. D'autres études sont cependant nécessaires pour mieux caractériser les enzymes impliquées dans ce processus et pour vérifier si le contrôle des niveaux de progestérone circulante est similaire chez l'humain [53]. Finalement, en plus de la sécrétion abondante de progestérone, le CL permet aussi la synthèse d'infimes quantités d'androgènes et d'estrogènes grâce à l'expression mineure d'enzymes telles que CYP17, CYP19 et HSD17B1.

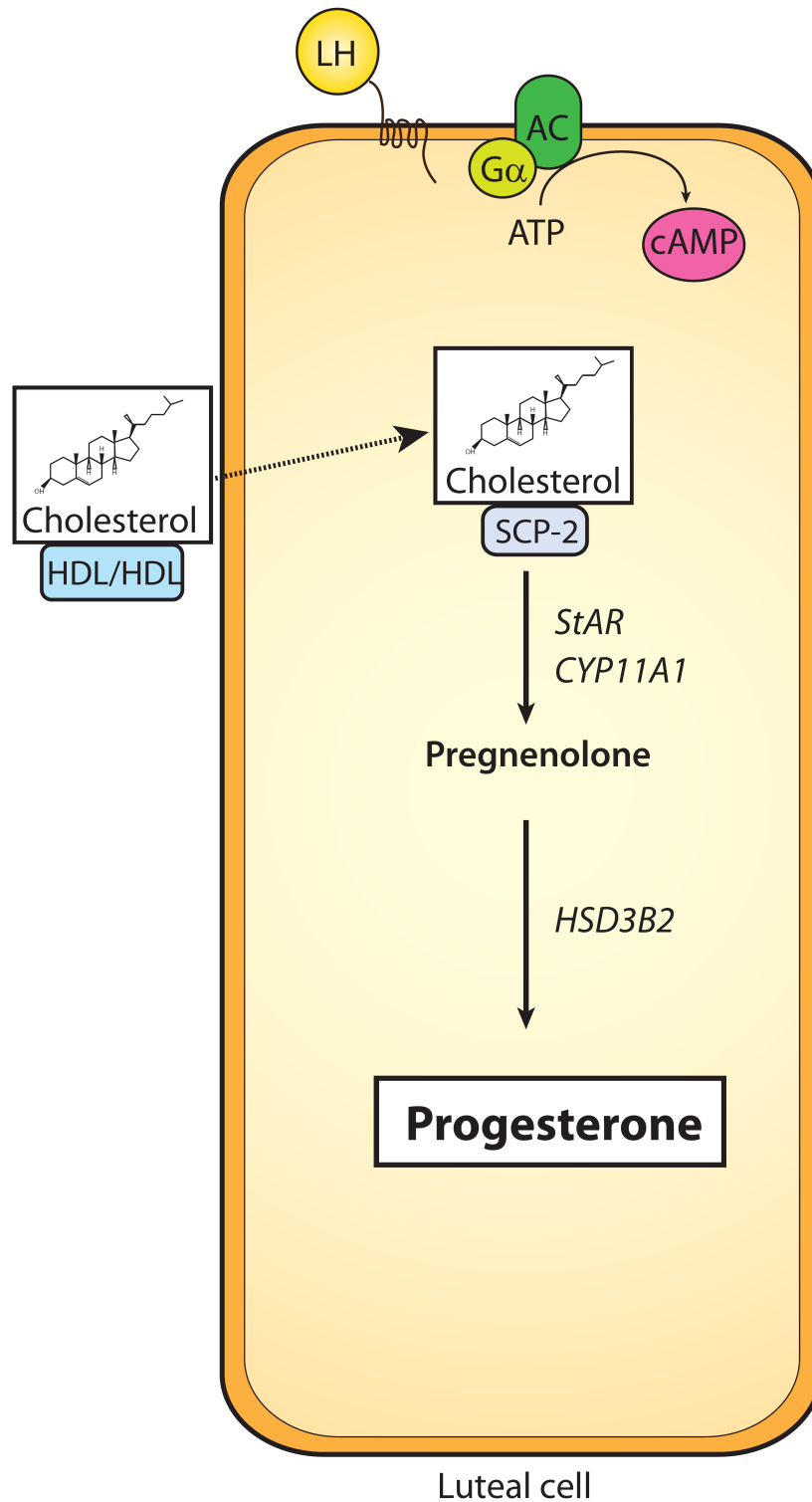


Figure 1.9 : Transformations enzymatiques permettant la synthèse de progestérone par le corps jaune. (Tiré de Lapointe et *al.*, *Frontiers in Bioscience*, 2011)

1.2.3.3 Régression ou subsistance du CL

La fonction du CL est de permettre l'établissement et le maintien de la grossesse. Une fois formé, le CL peut ainsi connaître deux destinées. Tout d'abord, si l'ovocyte relâché n'est pas fertilisé, le CL régresse pour permettre le retour normal au cycle et le relâchement de futurs ovocytes. Cette régression se produit en deux phases : une régression fonctionnelle puis une régression structurale [53]. La régression fonctionnelle est caractérisée par une diminution marquée de la sécrétion de progestérone. De nombreuses études faites chez les espèces mono-ovulatoires montrent que $PGF2\alpha$ est d'ailleurs un acteur majeur lors de la régression fonctionnelle du CL, mais d'autres molécules seraient aussi impliquées [53].

La régression structurale est quant à elle caractérisée par la diminution de la taille du CL. Cette phase, déclenchée par la réduction du taux de progestérone circulante, mène à l'apoptose des cellules lutéales et endothéliales grâce à l'activation de voies de signalisation complexes impliquant plusieurs molécules [53]. Par la suite, les tissus restants sont remplacés par des fibres de collagène, des fibroblastes et des macrophages. Cet amas cellulaire forme une masse cicatricielle désormais appelée corpus albicans (corps blanc) qui fini éventuellement par disparaître de l'ovaire pour être remplacé par du stroma ovarien [53].

Lorsque l'ovocyte est fertilisé par un spermatozoïde, le CL subit une toute nouvelle destinée et doit subsister pour permettre l'établissement de la grossesse. Chez les humains, lorsque le blastocyste s'implante dans l'endomètre utérin, son syncytiotrophoblaste commence ainsi à sécréter le « human chorionic gonadotropin » (hCG) qui ordonne au CL de continuer sa production de progestérone. La sécrétion ininterrompue de progestérone permet alors à l'endomètre de conserver une épaisseur et une vascularisation appropriées pour la croissance de l'embryon.

1.3 Signalisation par les WNTs

Depuis quelques années, plusieurs études tendent à démontrer qu'une nouvelle voie de signalisation jouerait aussi un rôle important au niveau du développement et de la régulation de l'ovaire. Cette voie, appelée WNT/ β -caténine, est connue grâce à sa participation à de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Les sections suivantes décriront le fonctionnement général de cette voie de signalisation et par la suite, une emphase sera mise sur son rôle au niveau de l'ovaire.

1.3.1 Description des WNTs

La découverte des gènes WNTs a débuté en 1982 lorsque des chercheurs ont réalisé que des souris infectées avec le virus « Mouse mammary tumor virus » (MMTV) développaient des tumeurs dans lesquelles le gène *Int1* était activé [56,57]. En 1987, des chercheurs ont par la suite constaté que le gène *Int1* était l'homologue du gène *Wg* présent chez la drosophile et étudié depuis plusieurs années. Ainsi, la combinaison des noms des deux gènes homologues (*Wg +Int1*) a donné naissance au nom WNT, désormais utilisé par des milliers de chercheurs. Les protéines WNTs sont très importantes et impliquées dans une variété de processus tels que la spécification cellulaire, la prolifération, la différenciation, la survie, l'apoptose et la migration cellulaire [58]. Leur implication dans de multiples systèmes physiologiques et pathologiques a donné lieu à d'intenses recherches qui ont permis de découvrir, jusqu'à ce jour, 19 protéines WNTs chez l'humain et la souris [59].

Les gènes *Wnt* codent pour des glycoprotéines sécrétées d'une longueur de 350 à 400 acides aminés [60]. Même si ces protéines portent le signal N-terminal permettant leur sécrétion, elles restent peu solubles à cause de la palmitoylation de leurs cystéines, qui est une modification post-traductionnelle essentielle à leur fonction [61]. Les voies de signalisation et les molécules activées par ces protéines sont multiples et très complexes. Les sections suivantes décriront sommairement trois des voies de signalisation activées par les WNTs qui sont connues à ce jour : la voie de signalisation WNT/ β -caténine, la voie « Planar Cell

Polarity » (PCP) et la voie WNT/Ca²⁺. Il est à noter que la majorité des données présentées dans cette section proviennent d'études faites chez la souris.

1.3.1.1 Voie canonique WNT/ β -caténine

La plus connue et étudiée des voies de signalisation activées par les protéines WNTs est la voie de signalisation WNT/ β -caténine, aussi appelée voie canonique. La régulation de cette voie est basée sur la dégradation ou la stabilisation de la protéine centrale β -caténine (CTNNB1). En l'absence de protéines WNTs (figure 1.10, à gauche), il se forme un complexe de destruction formé de l'axine, de l'« Adenomatous Polyposis Coli » (APC), de la « Glycogen Synthase Kinase 3 beta » (GSK3 β) et de la « Casein Kinase 1 » (CK1). L'action séquentielle de la CK1 et de la GSK3 β permet la phosphorylation de plusieurs résidus Ser/Thr situés sur la partie N-terminale de la β -caténine. Celle-ci peut alors être reconnue et ubiquitinée par la « β -transducing-repeat-containing Protein » (β -TrCP), une sous-unité de la E3 ubiquitine ligase, et ensuite être dégradée par le protéasome [62].

Lorsqu'il y a une stimulation par les WNTs (figure 1.10, à droite), deux récepteurs cellulaires forment un hétérodimère pour transmettre le signal; le récepteur Frizzled (FZD) et le récepteur « Low-density-lipoprotein receptor Related Protein » (LRP) 6 ou 5. La protéine « Disheveled » (DSH) permet ensuite le recrutement de la protéine axine à la membrane cellulaire. Sans la présence de cette axine, le complexe de destruction est alors incapable de se former et la β -caténine ne peut pas être phosphorylée et dégradée. La β -caténine stabilisée s'accumule alors dans le cytosol puis se rend au noyau. De là, elle agit comme un co-régulateur transcriptionnel en déplaçant des inhibiteurs de transcription de la famille Groucho et des Histones Désacétylases (HDAC) qui sont liés au facteur de transcription « T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor » (TCF/LEF). La β -caténine permet alors le recrutement d'histones acétylases et des protéines « B cell CLL/lymphoma 9 » (BC19) et « CREB binding protein/p300 » (CBP/p300) par le TCF/LEF, qui activent la transcription de certains gènes cibles [63]. La β -caténine peut aussi interagir avec d'autres facteurs de transcription, tels que « Forkhead box O1 » (FOXO1) ou des récepteurs nucléaires, pour réguler la transcription d'autres gènes cibles [64-66].

En plus de permettre la régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes, la β -caténine est aussi une composante importante des jonctions d'adhérence et du cytosquelette, qui sont nécessaires à l'adhésion intercellulaire et à la migration. Une relation entre le rôle structural et signalétique de la β -caténine pourrait être possible mais plusieurs études seront nécessaires pour prouver et caractériser ce phénomène [67].

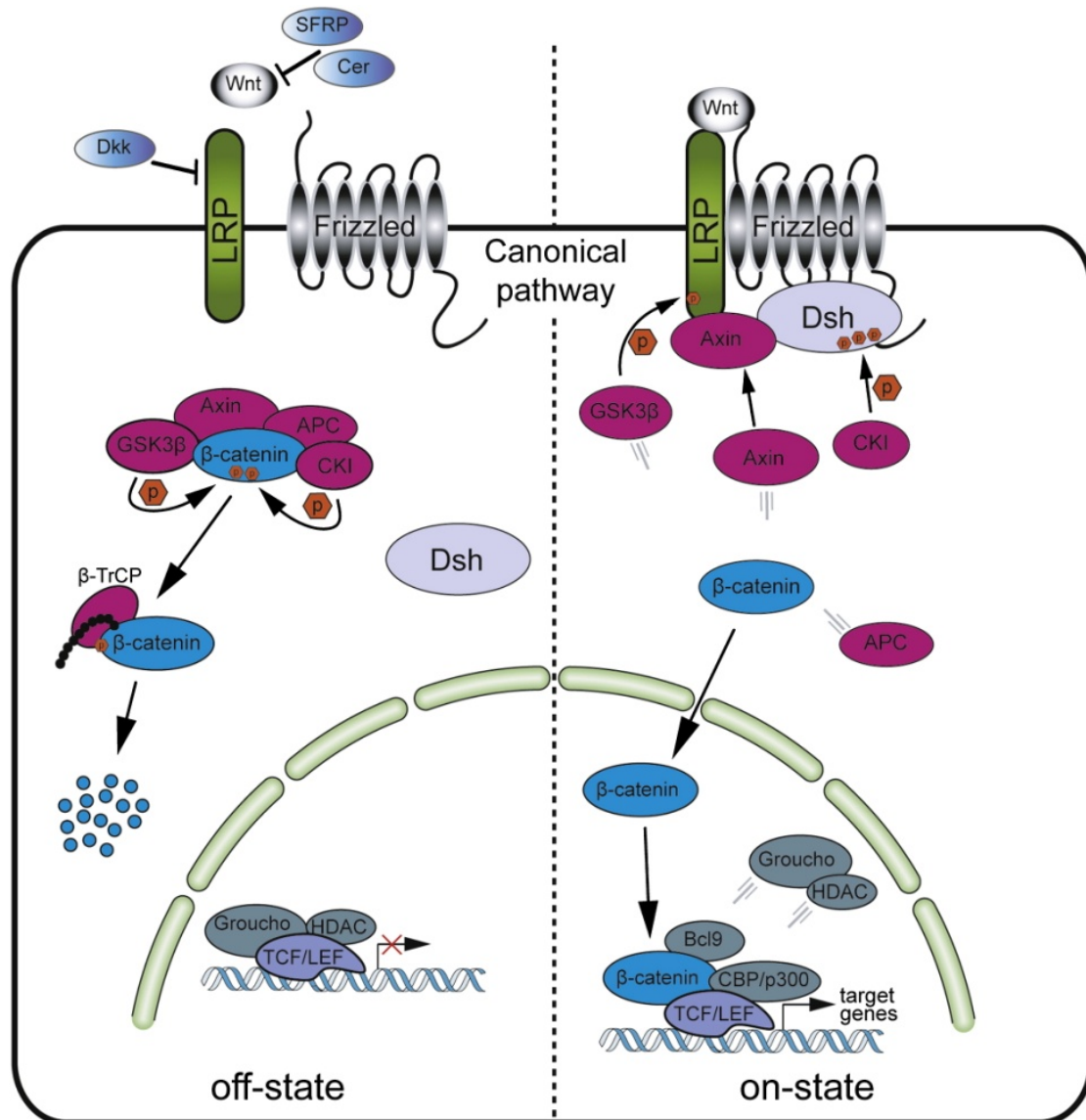


Figure 1.10 : Voie de signalisation WNT/ β -caténine. (Tiré de Sonderegger et *al.*, Placenta, 2010)

La régulation appropriée de la voie de signalisation WNT/ β -caténine demande la coopération de plusieurs composants tels que les récepteurs FZD/LRP, des agonistes et des antagonistes. Les récepteurs FZDs sont des protéines transmembranaires « seven-pass » avec un domaine N-terminal extracellulaire riche en résidus cystéine (CRD) tandis que les récepteurs LRPs sont des récepteurs transmembranaires simples [61]. À ce jour, 10 récepteurs FZDs ont été découverts chez l'humain et la souris. Chez les vertébrés, les relations exactes entre les 19 WNTs et les 10 récepteurs FZDs sont encore très peu comprises vu les affinités non-spécifiques qu'ont ces protéines l'une pour l'autre. En effet, un récepteur FZD peut lier plusieurs protéines WNTs différentes et vice versa [59].

Certaines protéines, autres que les WNTs, peuvent aussi servir d'agonistes et activer la voie WNT/ β -caténine. Par exemple, la protéine Norrin, impliquée dans la maladie de Norrie, peut se lier à FZD4 et activer la voie canonique [68]. D'autres protéines, les R-spondines (RSPO), sont aussi des agonistes qui interagissent avec les récepteurs FZDs et LRPs pour permettre le déclenchement de la voie WNT/ β -caténine [61]. Plusieurs autres composants peuvent quant à eux servir d'antagonistes à cette voie. Par exemple, les protéines « Dickkopf homolog » (DKK), « sclerostin domain containing 1 » (WISE) et « Sclerostin » (SOST) se lient aux protéines LRPs et provoquent leur internalisation ou leur neutralisation [69-71]. La protéine CHIBBY (CBY1) peut quant à elle se lier à la β -caténine pour empêcher la liaison avec son co-facteur LEF et ainsi nuire à la transcription de certains gènes [72].

Les protéines « Secreted Frizzled Related Protein » (SFRP) servent finalement aussi d'antagonistes à la voie des WNTs (canonique ou non) sans interagir avec les récepteurs LRPs. En effet, comme leur nom le suggère, les SFRPs sont des protéines sécrétées qui possèdent un domaine riche en cystéines homologue au domaine CRD des récepteurs FZDs. Les SFRPs solubles peuvent donc se lier aux WNTs et empêcher l'interaction avec leurs récepteurs FZDs. Cependant, dans certains contextes qui restent à être élucidés, il se pourrait que les SFRPs facilitent l'interaction entre les protéines WNTs et les récepteurs FZDs, devenant ainsi des agonistes de la voie de signalisation [73]. Présentement, 5 protéines SFRPs, contenant environ 300 acides aminés, ont été décrites chez l'humain et la souris.

1.3.1.2 Les voies non-canoniques

Les protéines WNTs peuvent réguler différents processus cellulaires via l'activation de voies de signalisation ne nécessitant pas les récepteurs LRPs ni la β -caténine. Ces voies de signalisation, qui sont à ce jour moins bien décrites que la voie canonique, se nomment la voie PCP et la voie WNT/ Ca^{2+} . Certaines protéines, telles que WNT5a ou WNT11, sont connues pour activer les voies non-canoniques plutôt que canoniques [63]. Cependant, il se pourrait que le contexte cellulaire ait un rôle à jouer dans le choix de la voie de signalisation activée par une protéine WNT, dépendamment de la présence de certains récepteurs FZDs et/ou co-récepteurs [74].

1.3.1.2.1 La voie PCP

Cette voie, comme son nom le suggère, a un rôle majeur dans le contrôle de la polarité cellulaire. La régulation adéquate de la polarité est fondamentale puisque la position cellulaire spatiale est critique lors de l'organogénèse. Des études chez la souris commencent d'ailleurs à indiquer le rôle crucial de la voie PCP puisque des aberrations de signalisation de cette voie mènent à de multiples défauts développementaux et fonctionnels [75].

Pour activer cette voie, les protéines WNTs se lient aux récepteurs FZDs sans nécessiter la présence de récepteurs LRPs (figure 1.11, à gauche). Par la suite, la protéine DSH, en association avec la protéine « Dishevelled-associated Activator of Morphogenesis » (DAAM), active les voies de signalisation « RAS Homologue gene-family member A » (RHOA) et « RHO-associated Coiled-coil containing protein Kinase » (ROCK). L'activation de ces effecteurs permet une réorganisation du cytosquelette [76]. La liaison des WNTs à un récepteur FZD peut aussi engendrer l'activation de « RAS-related C3 botulinum substrate 1 » (RAC1) par DSH. Cette petite GTPase peut alors activer la voie de signalisation « JUN N-terminal kinase » (JNK) qui a aussi un effet sur la réorganisation du cytosquelette et sur la transcription de certains gènes. En plus, par des mécanismes encore mal compris, l'activation de la voie PCP permettrait aussi d'inhiber la voie de signalisation canonique en modulant les niveaux de β -caténine disponible [76].

1.3.1.2.2 La voie WNT/Ca²⁺

L'autre voie de signalisation non-canonique activée par les WNTs se nomme la voie WNT/Ca²⁺ et nécessite aussi la liaison d'une protéine WNT à un récepteur FZD (figure 1.11, à droite). Par la suite, la protéine G couplée à FZD active la phospholipase C (PLC) qui mène à son tour au clivage du « Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate » (PtdIns(4,5)P₂) en inositol trisphosphate (IP₃) et en diacylglycerol (DAG). L'IP₃ se lie alors à ses récepteurs situés sur le réticulum endoplasmique qui contient les réserves de calcium cellulaire. La liaison de l'IP₃ à son récepteur permet aussitôt le relâchement de Ca²⁺ dans le cytosol causant ainsi l'activation de la phosphatase calcineurine et de kinases dépendantes de calcium telles que la Protéine Kinase C (PKC) et la « Calcium/calmodulin-dépendant Kinase II » (CAMKII). Tandis que la PKC a un rôle à jouer pour la régulation de plusieurs mécanismes dont ceux impliqués dans la réorganisation du cytosquelette, la calcineurine permet plutôt l'activation de facteurs transcriptionnels tels que le « Nuclear Factor of Activated T cell » NF-AT [76]. La CAMKII peut quant à elle activer la « TGF-β-activated Kinase 1 » (TAK1) qui peut à son tour phosphoryler le TCF et causer ainsi l'inhibition de la signalisation WNT/β-caténine [77]. Finalement, les WNTs peuvent aussi activer la voie WNT/Ca²⁺ en inhibant la protéine kinase G (PKG) qui normalement bloque le relâchement de Ca²⁺ dans les cellules non-stimulées [63].

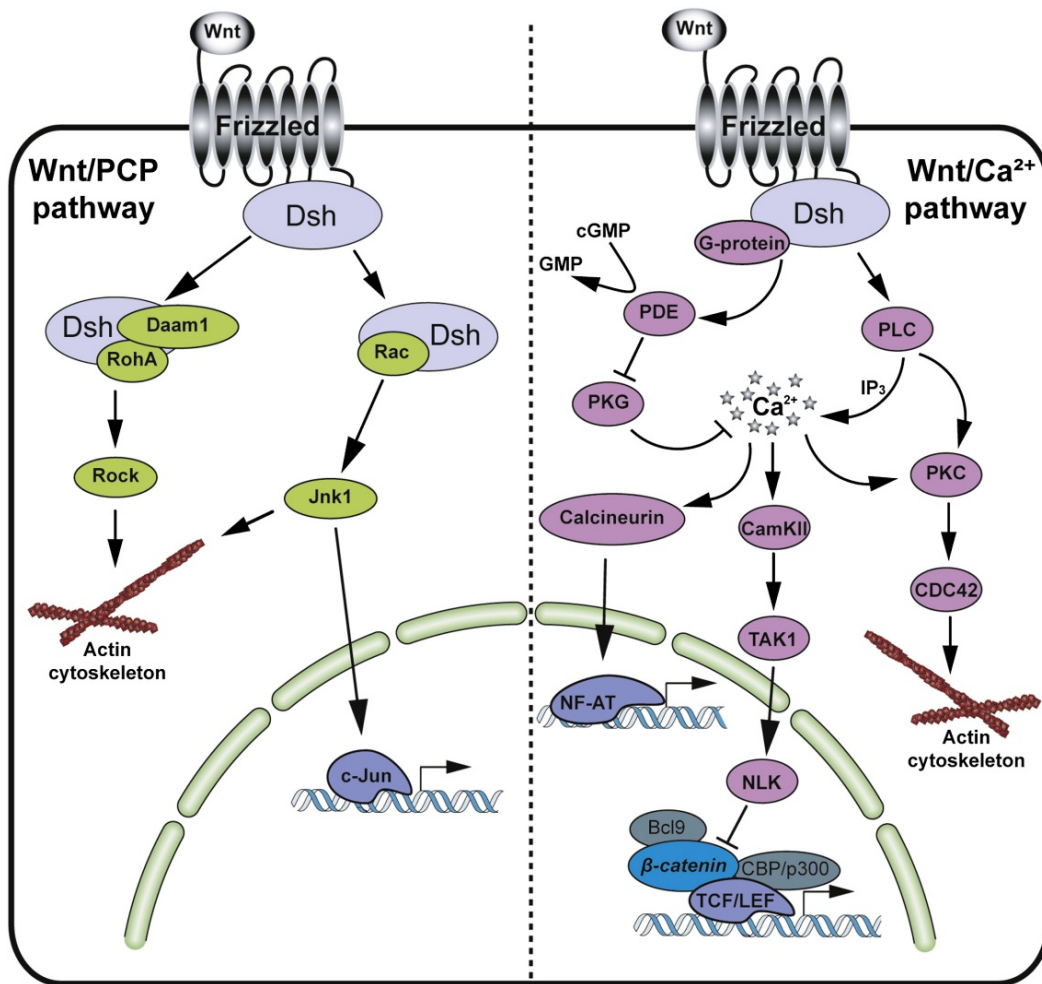


Figure 1.11 : Voies non-canoniques activées par les WNTs. (Tiré de Sonderegger et *al.*, Placenta, 2010)

1.3.2 Rôles de la voie des WNTs au niveau de l’ovaire

Peu d’années se sont écoulées depuis le début des recherches sur la voie des WNTs au niveau de l’ovaire, mais déjà de multiples découvertes ont été faites. Les sections suivantes décriront les connaissances actuelles que la communauté scientifique possède à propos des constituants de la voie des WNTs impliqués lors du développement de l’ovaire ou lors de la régulation de la fonction ovarienne adulte.

1.3.2.1 Voie de signalisation des WNTs lors du développement ovarien

Plusieurs voies de signalisation entrent en jeu lorsque la gonade indifférenciée emprunte la destinée mâle ou femelle. Comme mentionné précédemment, la voie des WNTs lors de ce processus est primordiale et le rôle de plusieurs de ses composants commence à être élucidé. Les sous-sections ci-dessous, ainsi que la figure 1.12, résument les molécules de la voie des WNTs impliquées lors du développement ovarien.

1.3.2.1.1 *Wnt4*

La première évidence que les protéines WNTs sont impliquées au niveau de l'ovaire vient d'une étude faite en 1999 qui démontrait que les souris n'exprimant pas *Wnt4* avaient des défauts majeurs lors du développement ovarien [2]. À la naissance, les ovaires de ces souris étaient masculinisés et avaient une déplétion presque complète de leur réserve en ovocytes. Cette étude a aussi montré que *Wnt4* était exprimé dans les gonades murines indifférenciées au jour E9.5 mais que son expression se restreignait seulement aux gonades femelles au moment de la différenciation sexuelle au jour E11.5. Des études subséquentes attribuent, à ce jour, trois rôles probables que WNT4 pourrait jouer au niveau du développement ovarien (Figure 1.12). D'abord, il a été suggéré que WNT4 serait important au niveau de la migration et de la sélection des cellules formant la glande surrénale et la gonade, et interviendrait aussi lors de la vascularisation embryonnaire permettant la différenciation sexuelle [78,79]. Deuxièmement, des données démontrent que WNT4 aurait un rôle crucial au niveau de la survie des cellules germinales femelles [80,81]. Finalement, une étude démontre aussi que WNT4 inhibe la sécrétion de testostérone chez les femelles, ce qui permet la régression de structures mâles telles que les canaux de Wolff. Les niveaux circulants de testostérone ainsi que l'expression d'enzymes nécessaires à la synthèse de cette hormone sont d'ailleurs significativement plus élevés chez les souris *Wnt4* KO [82]. Même si WNT4 a un rôle essentiel lors de la formation des ovaires, d'autres facteurs doivent aussi être présents pour permettre la différenciation des gonades femelles. En effet, la surexpression seule de WNT4 dans les gonades XY ne suffit pas à induire une réversion mâle-femelle [78,83].

Récemment, une étude a été conduite afin de vérifier si la signalisation induite par WNT4 lors du développement embryonnaire de l'ovaire se faisait via la β -caténine. Des souris qui n'expriment pas *Wnt4* au niveau de la gonade embryonnaire ont été croisées avec des souris qui surexpriment, aussi au niveau de la gonade embryonnaire, une forme stable de la β -caténine. Alors que l'absence de WNT4 mène à la masculinisation des ovaires, l'ajout d'une expression constitutive de β -caténine lors de l'embryogenèse permet quant à elle de rétablir un phénotype normal au niveau des ovaires [84]. Les données issues de cette expérience permettent donc d'affirmer que la régulation de la différenciation sexuelle par WNT4 au niveau de l'ovaire se fait via l'activation de la β -caténine.

Au niveau clinique, des études ont aussi établi que des patientes souffrant du syndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser avaient des mutations dans le gène *Wnt4*. Ces patientes avaient d'ailleurs des caractéristiques similaires aux souris *Wnt4* KO telles que l'aplasie du canal Mullérien ainsi que des signes d'hyperandrogénisme. Ces cas cliniques viennent donc appuyer l'hypothèse que *Wnt4* joue un rôle important au niveau du développement de l'ovaire [85-88].

Finalement, d'autres gènes codant pour des protéines WNTs, tels que *Wnt5a*, *Wnt6* et *Wnt9a*, sont aussi exprimés spécifiquement dans l'ovaire lors du développement [89,90]. Ces résultats suggèrent donc que ces protéines WNTs pourraient agir de façon redondante ou synergique, mais des études fonctionnelles seront nécessaires pour vérifier cette éventualité.

1.3.2.1.2 R-Spondin 1

Comme mentionné précédemment, les RSPOs sont des agonistes de la voie WNT/ β -caténine puisqu'ils se lient aux récepteurs LRPs et FZDs pour activer la signalisation. L'étude clinique d'une grande famille Italienne consanguine a d'abord démontré que l'inactivation du gène *Rspo1* dans l'ovaire peut mener à la réversion complète femelle-mâle, même sans la présence du gène SRY (voir Figure 1.3) [1]. Des études chez la souris ont par la suite démontré que l'inactivation de *Rspo1* mène à la réversion sexuelle partielle femelle-mâle d'une façon similaire à l'inactivation de *Wnt4* [91,92]. Ce phénotype peut cependant être rétabli grâce à la stabilisation de la β -caténine, ce qui indique que la β -caténine agit aussi en

aval de RSPO1 pour bloquer le développement de structures mâles dans l’ovaire [91] (Figure 1.12). Une étude chez l’humain a aussi confirmé que l’expression de *Rspo1* est augmentée de façon significative dans l’ovaire à un moment critique du développement de la gonade [93]. Finalement, une étude récente précise que RSPO1 induirait en partie l’expression de « *Stimulated by Retinoic Acid 8* » (*Stra8*), un gène impliqué dans le processus de méiose des cellules germinales [94]. Mises ensemble, ces données suggèrent donc que RSPO1 et WNT4 agissent via la même voie de signalisation pour activer la β -caténine lors du développement embryonnaire ovarien.

1.3.2.1.3 β -caténine

Afin de confirmer que la β -caténine était bel et bien un joueur majeur dans la différenciation sexuelle de l’ovaire, une étude de surexpression de cette protéine chez la souris a été conduite. Les souris utilisées exprimaient, au niveau de la gonade, une forme mutante de la β -caténine qui ne pouvait être dégradée et qui était donc constamment active. Les données ont ainsi montré que l’expression ectopique de la β -caténine dans les gonades XY mène à l’abolition des structures mâles et à la réversion sexuelle mâle-femelle [95]. Une autre étude, étudiant cette fois les effets de l’abolition de la β -caténine au niveau des gonades embryonnaires mâles et femelles, a aussi confirmé le rôle de cette protéine lors de la différenciation sexuelle femelle. En effet, les données ont montré que l’absence de β -caténine lors du développement ovarien mène à la présence d’une vascularisation mâle, de cellules produisant des androgènes ainsi qu’à la déplétion des cellules germinales femelles [96]. Ce phénotype possède d’ailleurs une ressemblance frappante à ceux des souris *Wnt4* et *Rspo1* KO, ce qui appuie de nouveau l’hypothèse que WNT4 et RSPO1 signalent via la β -caténine lors du développement embryonnaire de l’ovaire (Figure 1.12).

1.3.2.1.4 Follistatine, Activine βB et *Stra8*

De façon intéressante, des études vont jusqu’à identifier d’autres joueurs en aval de la signalisation WNT4/ β -caténine qui auraient une importance capitale lors du développement de

l'ovaire. Des données ont d'abord montré que le gène codant pour la follistatine (*Fst*) n'était pas exprimé dans les ovaires des souris *Wnt4* KO au moment de la différenciation embryonnaire, comme il se devrait normalement [80]. De plus, une vascularisation mâle des ovaires et une diminution de la survie des cellules germinales sont observées chez les souris *Fst* KO, comme il a été observé chez les souris *Wnt4* KO. Néanmoins, les défauts ovariens observés chez les souris *Wnt4* KO, tels que l'expression du marqueur stéroïdogénique *Cyp11a1*, ne sont pas tous retrouvés chez les souris *Fst* KO. Les données qui ressortent de ces études suggèrent donc premièrement que WNT4 contrôle l'expression de *Fst*, qui à son tour, permet l'inhibition de la vascularisation mâle et favorise la survie des cellules germinales (Figure 1.12). Vu les différences phénotypiques entre la souris *Fst* KO et la souris *Wnt4* KO, il est cependant probable que la follistatine ne contrôle seulement qu'une partie de la voie de signalisation en aval de WNT4.

Une autre protéine, l'activine β B (INHBB), semble aussi être un effecteur de la voie WNT4/ β -caténine responsable du développement de l'ovaire. En effet, une étude a démontré une augmentation des niveaux ovariens d'activine β B chez les souris *Wnt4* et *Ctnnb1* KO [84]. De plus, l'inactivation de l'activine β B chez les souris *Wnt4* KO permet de maintenir la survie des cellules germinales qui autrement serait compromise en l'absence de WNT4. Ces données démontrent que la régulation de l'activine β B est en aval de WNT4/ β -caténine et que sa régulation négative est essentielle au développement ovarien (Figure 1.12).

Finalement, l'expression du facteur de transcription *Stra8* est essentielle à l'entrée en méiose des cellules germinales femelles [97]. Ce gène est majoritairement, mais non exclusivement, sous le contrôle de l'acide rétinoïque (RA, Retinoic Acid) [98]. Chez le mâle, le RA est dégradé par l'activité de l'enzyme « Cytochrome P450 26B1 » (CYP26B1), empêchant ainsi l'initiation de la méiose. Puisque le nombre de cellules germinales est dramatiquement affecté chez les souris *Wnt4* KO, une étude a cherché à savoir si l'activation inappropriée de la voie de signalisation du RA était impliquée dans ce phénotype. Les résultats ont en effet démontré que *Cyp26b1* était exprimé de façon ectopique dans les ovaires de souris *Wnt4* KO et qu'il y avait une diminution de *Stra8* chez ces cellules germinales [99]. Cette même étude a aussi montré qu'il existait une certaine redondance entre WNT4 et WNT5a au niveau de l'entrée en méiose des cellules germinales puisque l'expression ovarienne de *Wnt5a*

est augmentée chez les souris *Wnt4* KO. De plus, chez la souris *Wnt5a* KO, les niveaux de *Stra8* sont aussi inférieurs à la normale. La création d'une lignée de souris *Wnt4/Wnt5a* KO montre quant à elle une abolition totale de l'expression de *Stra8* dans les cellules germinales de ces souris. Ces données suggèrent donc que WNT4 et WNT5a favorisent l'entrée en méiose des cellules germinales en induisant l'expression de *Stra8* par le RA.

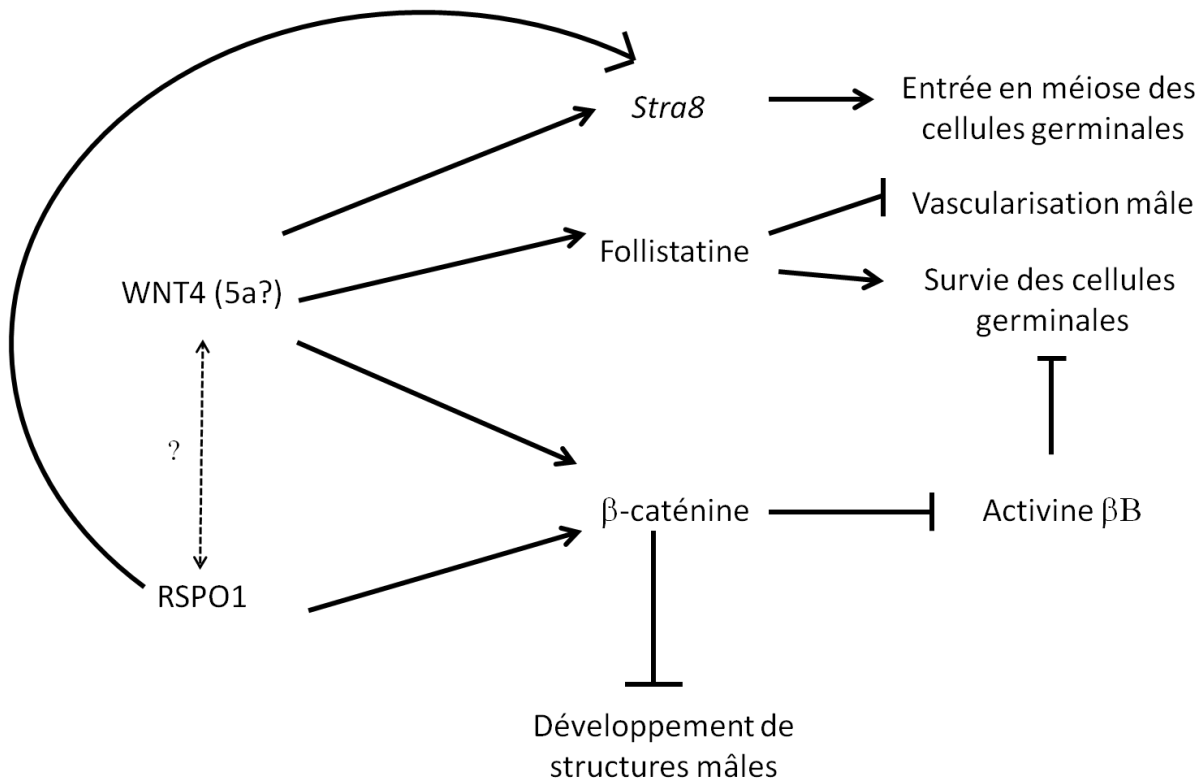


Figure 1.12 : Schéma représentant les relations possibles entre différents composants de la voie des WNTs au niveau du développement embryonnaire de l'ovaire.

1.3.2.2 Voie de signalisation des WNTs dans l'ovaire adulte

La section précédente a clairement démontré que la voie des WNTs est essentielle à la détermination du sexe et à la différenciation de la gonade femelle. Les premières études descriptives chez la souris ont quant à elles permises de détecter et localiser, pour la première fois, les ARNm de plusieurs gènes de la voie des WNTs au niveau de l'ovaire adulte à des moments spécifiques pendant le cycle ovarien [100,101] : *Fzd1* dans les cellules de la granulosa au moment de l'ovulation, *Wnt4* à tous les stades du cycle ovarien et *Fzd4* au niveau du corps jaune seulement. Bien que ces études n'aient été que descriptives, elles ont servi d'excellents points de départ pour les recherches fonctionnelles qui ont suivi.

Les sections suivantes décriront les composants de la voie des WNTs qui ont été associés à la régulation de la fonction ovarienne adulte. Il sera ainsi possible de comprendre les données qui ont servi de base pour l'élaboration des projets de recherche inclus dans cette thèse.

1.3.2.2.1 SFRP4

Puisqu'il avait été brièvement énoncé que l'antagoniste de la voie des WNTs, *Sfrp4*, était exprimé au niveau du corps jaune [102], une première étude a d'abord été faite chez la souris pour localiser spécifiquement et de façon complète l'expression de ce gène à différents moments du cycle ovarien [103]. Il a ainsi été démontré que l'expression de *Sfrp4* est régulée par les gonadotrophines puisqu'une augmentation de l'ARNm est perçue dans les cellules de la granulosa des gros follicules destinés pour l'ovulation. De plus, l'expression de *Sfrp4* s'est révélée particulièrement forte dans les corps jaunes de souris traitées aux gonadotrophines et dans les corps jaunes de souris gestantes, deux moments auxquels les cellules lutéales sont particulièrement actives. Les données *in vivo* et *in vitro* de cette étude ont par ailleurs suggéré que *Sfrp4*, au niveau des cellules lutéales, était régulé par la sécrétion pituitaire de prolactine (PRL). Aussi, vu leur patron d'expression similaire, il a été proposé que *Sfrp4* agissait possiblement comme un antagoniste des voies de signalisation impliquant *Wnt4* et *Fzd4*. Une autre étude descriptive a par la suite précisé que *Sfrp4* était exprimé tant au niveau du COC que des cellules de la granulosa et que son expression était soutenue dans les COCs après

l'ovulation [42]. Des recherches ont aussi été conduites pour tenter d'élucider le rôle fonctionnel de SFRP4 au niveau de l'ovaire. Il a ainsi été proposé que SFRP4 serait un antagoniste de la voie des WNTs qui régulerait l'apoptose associée à la rupture folliculaire [104,105]. Cependant, mis à part quelques liens circonstanciels entre l'expression de *Sfrp4* et l'apoptose dans les follicules ovulatoires, aucune évidence n'appuie fermement cette hypothèse.

Finalement, une étude employant des cellules folliculaires ovulatoires humaines a permis de constater que *Sfrp4* était plus fortement exprimé dans les cellules du cumulus que dans les cellules murales [106]. De plus, l'expression de *Sfrp4* dans les cellules du cumulus semble inversement corrélée avec le niveau de maturation de l'ovocyte, ce qui suggère un nouveau rôle pour cette protéine quant à la régulation de l'ovocyte ou l'expansion du cumulus. Aussi, pour des raisons encore obscures, il semblerait que l'expression de *Sfrp4* soit régulée de façon négative chez l'humain par la LH/hCG, comparativement aux données observées chez la souris [106].

Malgré sa forte expression au niveau des follicules en voie d'ovulation et du corps jaune, le rôle de SFRP4 demeure encore inconnu. Outre quelques données descriptives sur son expression ovarienne, aucune étude fonctionnelle complète n'a été conduite pour comprendre l'utilité de cette protéine. Les nouvelles données incluses dans cette thèse parviennent donc à cerner la réelle fonction de SFRP4 dans l'ovaire.

1.3.2.2.2 FZD4

Le récepteur FZD4 a été étudié grâce à une lignée de souris *Fzd4* KO dont les femelles étaient reconnues pour être stériles. Cette étude a permis de caractériser, pour la première fois, le rôle fonctionnel d'un des composants de la voie des WNTs au niveau de la régulation de l'ovaire adulte. Les données issues de cette étude ont permis de constater que l'ablation de *Fzd4* n'a aucune conséquence au niveau du développement folliculaire et de l'ovulation. Cependant, les résultats ont démontré que les souris *Fzd4* KO ont de graves défauts au niveau de la formation et de la fonction du corps jaune, possiblement dû à un problème d'angiogenèse [107]. Chez ces souris, il y a en effet une diminution de l'expression de gènes spécifiques à la

formation et à la fonction du corps jaune (*Lhr*, *Cyp11a1*, *Sfrp4*) menant ainsi à une diminution des niveaux circulants de progestérone. Comme discuté précédemment, l'insuffisance de progestérone empêche les ovocytes fertilisés de s'implanter et mène à la stérilité observée. Les résultats de cette étude suggèrent aussi que FZD4 pourrait réguler l'expression de *Prlr*, qui à son tour contrôlerait les gènes nécessaires au fonctionnement du CL. Les données excluent finalement la possibilité que la protéine Norrin, un agoniste de la voie des WNTs, puisse contrôler la régulation du CL dans l'ovaire. Ceci suggère donc que ce sont de véritables protéines WNTs, encore inconnues à ce jour, qui utilisent le récepteur FZD4 pour réguler la fonction du CL.

1.3.2.2.3 WNT4 et WNT2

Jusqu'à tout récemment, il était impossible de connaître le rôle de WNT4 au niveau de la régulation de l'ovaire adulte. En effet, le modèle murin utilisé pour l'étude de cette protéine était une lignée de souris *Wnt4* KO total qui ne pouvait survivre plus que quelques jours à cause de troubles rénaux majeurs [2]. En 2009, grâce à un modèle de souris *Wnt4* KO conditionnel conçu par notre équipe de recherche, il a été possible d'initier l'étude du rôle de WNT4 au niveau de la fonction ovarienne [108]. La baisse de l'expression de *Wnt4* au niveau des ovaires a provoqué l'infertilité des souris due à une diminution du nombre de follicules antraux. De plus, les résultats ont démontré que l'ablation de WNT4 diminue, chez les cellules de la granulosa, l'expression de gènes impliqués lors de la stéroïdogénèse tels que *Star*, *Cyp19* et *Cyp11a1*, ce qui résulte en une baisse du niveau de progestérone circulante. Des données obtenues par microarray suggèrent finalement que WNT4 signalerait via la β -caténine puisqu'il y a un chevauchement important dans les gènes régulés par chacune de ces deux molécules. Le récepteur ovarien de WNT4, ainsi que la voie de signalisation impliquée, restent cependant à être élucidés et/ou confirmés.

Deux études récentes ont aussi décrit un possible rôle pour WNT2 au niveau de l'ovaire. Des premiers résultats ont d'abord montré que WNT2 régule positivement la prolifération des cellules de la granulosa murines via l'activation de la β -caténine [109]. Par la suite, une étude faite à partir d'une lignée de cellules de la granulosa de rat a démontré que la

surexpression de *Wnt2* amène une accumulation nucléaire de β -caténine ne résultant cependant pas en une augmentation de l'activité transcriptionnelle induite par la β -caténine/TCF-LEF. Les résultats proposent que l'antagoniste nucléaire CBY1 (voir section 1.3.1.1) viendrait se lier à la β -caténine pour neutraliser son activité [110]. Cette étude suggère donc que WNT2 pourrait réguler des gènes ovariens via différents effecteurs qui sont encore inconnus pour le moment.

1.3.2.2.4 β -caténine et signalisation par les gonadotrophines

Finalement, plusieurs études ont aussi été faites pour tenter d'élucider le rôle ovarien exact de la β -caténine, indépendamment des molécules régulatrices en amont de celle-ci. Pour ce faire, les équipes de recherche ont eu recours à l'utilisation de modèles de souris KO conditionnel développés grâce au système traditionnel LoxP/Cre. Les premières études utilisaient d'abord un modèle de souris dans lequel la β -caténine était stabilisée (*Ctnnb1*^{(Ex3)*fl/+*}; *Amhr2-cre*) ou abolie (*Ctnnb1* cKO), grâce à l'expression de l'enzyme Cre sous le contrôle du promoteur du gène ovarien *Amhr2*. Or, les études étaient difficiles à interpréter puisque le promoteur du gène *Amhr2* est aussi actif dans l'ovaire embryonnaire et dans d'autres tissus non-spécifiques. Par exemple, les souris *Ctnnb1*^{(Ex3)*fl/+*}; *Amhr2-cre* développaient des lésions pré-tumorales dès l'âge de 6 semaines, possiblement à cause de l'expression précoce de la Cre dans l'ovaire embryonnaire [111]. Les souris *Ctnnb1* cKO étaient quant à elles infertiles dû à l'expression de la Cre dans l'utérus et l'oviducte [112], et n'avaient pas de défauts ovariens à cause du manque d'efficacité de la Cre au niveau de l'ovaire [113].

La récente disponibilité d'une souris transgénique exprimant la recombinase Cre sous le contrôle du promoteur du gène *Cyp19* (exprimé dans les follicules en développement) a finalement permis d'élucider le rôle important que joue la β -caténine au niveau de l'ovaire adulte. En utilisant en parallèle un modèle de souris gain-de-fonction (*Ctnnb1*^{(Ex3)*fl/fl*}; *Cyp19-Cre*) et perte-de-fonction (*Ctnnb1*^{*fl/fl*}; *Cyp19-Cre*), il a été possible de constater que la β -caténine favorise le développement folliculaire induit par la FSH mais bloque l'ovulation et la lutéinisation induites par la LH [40]. En effet, la surexpression de la β -caténine diminue

l'apoptose, augmente le nombre de follicules en croissance et accroît l'expression des gènes *Cyp19a1*, *Fshr* et *Nr5a1*. De façon contraire, la surexpression de la β -caténine nuit à l'ovulation et diminue l'expression de gènes tels qu'*Areg*, *Ereg*, *Ptgs2*, *Cyp11a1*, *Star*, *Sfrp4* et *Lhcgr*. Les données issues de ces expériences suggèrent d'ailleurs que l'effet inhibiteur de la β -caténine serait dû à l'inactivation du facteur de transcription CREB, un effecteur important de la LH.

Ces résultats montrent donc une importante relation entre la voie des WNTs et les voies régulées par les gonadotrophines FSH et LH. Des études antérieures avaient d'ailleurs suggéré que ces deux voies interagissaient ensemble lors de la régulation post-natale de l'ovaire. Par exemple, sous le contrôle de la FSH, la PKA et l'AKT peuvent stabiliser la β -caténine, en la phosphorylant ou indirectement, en inactivant la GSK3 β (voir figure 1.10) [20]. De nombreux autres points de convergence existent aussi entre ces deux voies de signalisation au niveau de l'ovaire [20], mais la complexité de ce patron de signalisation rend sa compréhension extrêmement difficile et incomplète. Ce sera par la découverte d'autres molécules, par exemple les protéines FZD1 et SFRP4 qui sont décrites dans cette thèse, qu'il sera possible de bien comprendre la dynamique de la régulation ovarienne. Cet avancement permettra ainsi de mieux cerner les troubles ovariens tels que le syndrome des ovaires polykystiques ou le cancer de l'ovaire et par conséquent, facilitera la découverte de traitements.

1.4 Hypothèse et objectifs de la thèse

L'accumulation grandissante de publications portant sur la régulation ovarienne par les WNTs démontre l'importance cruciale de cette voie et l'intérêt que la communauté scientifique porte envers celle-ci. Bien que le rôle développemental des WNTs soit établi, beaucoup de progrès devront être accomplis pour comprendre la nature exacte de la signalisation des WNTs au niveau de l'ovaire adulte. Des études ont montré l'implication de multiples composants de cette voie, mais de nombreuses questions restent encore sans réponses : 1) Quel récepteur est responsable de la transduction du signal par WNT4? 2) Quelles voies de signalisation ovariennes sont activées par WNTs? 3) Quelles relations fonctionnelles existe-t-il entre les voies induites par les gonadotrophines et celles induites par les WNTs? Grâce aux données publiées dans la littérature et présentées dans les sections précédentes, notre hypothèse générale était donc que des composants de la voie des WNTs, en particulier le récepteur FZD1 et l'antagoniste SFRP4, sont nécessaires à la régulation de la fonction ovarienne.

Pour vérifier notre hypothèse, nous avons émis deux sous-objectifs qui nous permettaient d'évaluer le rôle de la voie de signalisation des WNTs au niveau de l'ovaire adulte, chez la souris. Cette voie est complexe et c'est obligatoirement par la caractérisation individuelle de chacune de ses composantes qu'il sera possible d'établir les liens nécessaires à l'élaboration d'un rigoureux modèle de signalisation.

Sous-objectifs

1) Le premier sous-objectif de cette thèse était de caractériser le rôle du récepteur FZD1 au niveau de l'ovaire. Les résultats répondant à cet objectif ont été publiés et sont décrits dans le Chapitre 2.

2) Le deuxième sous-objectif était de déterminer le rôle de l'antagoniste SFRP4 lors de la régulation ovarienne. Les données reliées à ce sous-objectif sont décrites dans le Chapitre 3.

Chapitre 2

2. Article 1

FZD1 Regulates Cumulus Expansion Genes and is Required for Normal Female Fertility¹

Evelyne Lapointe², Alexandre Boyer², Charlène Rico², Marilène Paquet³, Heather Franco⁴, Jan Gossen⁵, Francesco J DeMayo⁴, JoAnne S Richards⁴ and Derek Boerboom^{2,4,6}

² Centre de Recherche en Reproduction Animale, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6

³ Comparative Medicine & Animal Resources Centre and Goodman Cancer Research Centre, McGill University, Montreal, Québec, Canada, H3G 1Y6

⁴ Department of Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, 77030

⁵ Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, Women's Health Department, Oss, The Netherlands

¹ Supported by an operating grant from the Canadian Institutes of Health Research and the Canada Research Chair in Ovarian Molecular Biology and Functional Genomics. The University of Virginia Center for Research in Reproduction Ligand Assay and Analysis Core is supported by the National Institutes of Health NICHD (SCCPRR) Grant U54-HD28934.

⁶ Correspondence and current address: Derek Boerboom, Centre de Recherche en Reproduction Animale, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6.

Publié dans : *Biology of Reproduction*. 2012 Sep 5. [Epub ahead of print]

Contribution des auteurs : Ma contribution globale concerne le design expérimental, la conception et préparation des protocoles, l'exécution des manipulations, l'interprétation des résultats, la préparation des figures et l'écriture de l'article. Dans l'ensemble, ma contribution relative est de 85%. AB, CR, MP, HF et FJD ont contribué à l'exécution des manipulations et à l'interprétation des résultats. JG et JSR ont matériellement contribué à la recherche. DB a dirigé le projet et a aidé à l'écriture de l'article.

2.1 ABSTRACT

WNT4 is required for normal ovarian follicle development and female fertility in mice, but how its signal is transduced remains unknown. *Fzd1* encodes a WNT receptor whose expression is markedly induced in both mural granulosa cells and cumulus cells during the preovulatory period, in a manner similar to *Wnt4*. To study the physiological roles of FZD1 in ovarian physiology and to determine if it serves as receptor for WNT4, *Fzd1*-null mice were created by gene targeting. Whereas rare *Fzd1*^{-/-} females were sterile due to uterine fibrosis and ovarian tubulostromal hyperplasia, the majority were subfertile, producing ≈ 1 less pup per litter on average relative to controls. Unlike WNT4-deficient mice, ovaries from *Fzd1*^{-/-} mice had normal weights, numbers of follicles, steroid hormone production and WNT4 target gene expression levels. Microarray analyses of granulosa cells from periovulatory follicles revealed few genes whose expression was altered in *Fzd1*^{-/-} mice. However, gene expression analyses of cumulus-oocyte complexes (COCs) revealed a blunted response of both oocyte (*Zp3*, *Dppa3*, *Nlrp5*, *Bmp15*) and cumulus (*Btc*, *Ptgs2*, *Sema3a*, *Ptx3*, *Il6*, *Nts*, *Alcam*, *Cspg2*) genes to the ovulatory signal, whereas the expression of these genes was not altered in WNT4-deficient COCs from *Wnt4*^{tm1.1Boer/tm1.1Boer;Tg(CYP19A1-cre)}1Jri mice. Despite altered gene expression, cumulus expansion appeared normal in *Fzd1*^{-/-} COCs both *in vitro* and *in vivo*. Together, these results indicate that *Fzd1* is required for normal female fertility and may act in part to regulate oocyte maturation and cumulus cell function, but is unlikely to function as the sole ovarian WNT4 receptor.

2.2 INTRODUCTION

The WNTs are an expansive family of secreted glycoproteins known mostly for their roles in embryonic development and tumorigenesis [1,2]. To transduce their signal, WNTs bind to a receptor complex consisting of a Frizzled (FZD) seven transmembrane-spanning cell surface receptor and the lipoprotein-related receptor proteins LRP5 and LRP6 that act as co-receptors. This interaction can activate three distinct intracellular pathways known as the

planar cell polarity (c-jun kinase), WNT/Ca²⁺ and WNT/CTNNB1 (or canonical) pathways [3-5]. The activation of the latter pathway results in the hypophosphorylation and stabilization of CTNNB1 (β -catenin), which accumulates in the cell and translocates to the nucleus, where it serves as a transcriptional co-regulator of a number target genes, the identity of which varies according to cell type and physiological context [6].

The roles of WNT signaling during the embryonic development of the female gonad are now well established. Indeed, WNT4 and the WNT signaling effectors CTNNB1 and RSPO1 are essential for female sex determination, and act by controlling female somatic cell differentiation, germ cell commitment to meiosis, gonadal cell migration and sorting, and sex-specific vasculogenesis [7-17]. In addition to its functions during embryogenesis, a growing body of evidence now indicates that WNT signaling plays multiple important roles in the adult ovary as well. For instance, CTNNB1 has been shown to regulate CYP19 expression in a human granulosa cell line and in primary cultures of rat granulosa cells [18]. Further *in vitro* experiments using the Cre/LoxP system to knock down CTNNB1 expression in primary cultured granulosa cells confirmed its requirement for FSH-induced estrogen synthesis [19]. Likewise, CTNNB1 has been shown to regulate StAR expression in luteal cells, and can enhance LH-stimulated progesterone secretion [20]. A recent study also demonstrated that sustained overexpression of CTNNB1 in granulosa cells *in vivo* promotes preovulatory follicular development, but represses LH-induced gene expression [21]. WNT2 stimulates proliferation in cultured mouse granulosa cells, and acts via the CTNNB1 pathway [22]. Beyond its roles in gonadal development, WNT4 has also recently been shown to play important roles in follicle development. Its conditional inactivation in granulosa cells in the *Wnt4*^{tm1.1Boer/-}; *Amhr2*^{tm3(cre)Bhr/+} model resulted in reduced fertility linked to inadequate antral follicle development [23]. Moreover, *in vivo* and *in vitro* experiments demonstrated that WNT4 regulates the expression of the steroidogenic enzymes StAR, CYP19 and CYP11A1, and *Wnt4*^{tm1.1Boer/-}; *Amhr2*^{tm3(cre)Bhr/+} mice also had reduced circulating progesterone levels. Although StAR and CYP19 are CTNNB1 transcriptional targets as mentioned above, whether or not WNT4 signals via the canonical pathway in granulosa cells has not yet been determined [24].

Little is known of the functions of FZDs in the mammalian ovary, with the exception of FZD4. Female *Fzd4*-null mice are sterile, at least in part due to improper formation and function of their corpora lutea [25]. FZD4 does however appear to be dispensable for follicle development, rendering unclear which FZD(s) may serve as receptors for follicular WNTs such as WNT2 and WNT4. One strong candidate is FZD1, as its expression in granulosa cells is markedly induced prior to ovulation, in a manner similar to WNT4 [23,26]. We therefore hypothesized that FZD1 serves to transduce the WNT4 signal in preovulatory follicles, and that loss of FZD1 would result in ovarian defects similar to those observed in the *Wnt4*^{tm1.1Boer/-};*Amhr2*^{tm3(cre)Bhr/+} model. To test this hypothesis, we generated *Fzd1* knockout mice and assessed their fertility, follicular development, cumulus expansion, ovarian gene expression and WNT signaling pathway activity.

2.3 MATERIALS AND METHODS

Gene targeting

A floxed *Fzd1* allele (Fig. 2Ac) was created using a standard gene targeting approach. Briefly, a targeting construct was built using the pKOII vector [27] into which was inserted a modified genomic fragment containing the single *Fzd1* exon flanked by two loxP sites. An *Mfe1* restriction site was also included for Southern blot screening of embryonic stem (ES) cell clones (Fig. 2Ab). All genomic sequences were cloned from R1 ES cell genomic DNA by PCR using the Expand Long Template PCR system (Roche Molecular Biochemicals, Laval, QC, Canada); LoxP and restriction sites were included in the primers used to amplify the genomic fragments. The targeting vector was linearized prior to electroporation into in R1 ES cells. Clonal selection was achieved by growing the cells in a medium containing 400 µg/ml Geneticin (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) for 8-9 days. Selected colonies were cultured in triplicate, and duplicate sets were analyzed by Southern blotting to screen for proper homologous recombinants as previously described [28]. Three of 384 colonies screened showed a second band consistent with the expected size for the targeted allele (Fig. 2B). All three targeted cell lines were subsequently microinjected into blastocysts and transferred to

pseudopregnant recipients according to standard protocols. Chimeric males derived from all cell lines sired pups heterozygous for the targeted allele.

Animal model

To generate a null *Fzd1* allele (Fig. 2Ad), *Fzd1*^{lox/+} mice were mated to the Tg(CMV-cre)1Cgn/J “cre deleter” strain (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), which expresses Cre in all tissues including the germline. After PCR verification of the *Fzd1*⁻ allele (Fig. 2D), the Cre transgene was eliminated from *Fzd1*^{-/+}; Tg(CMV-cre)1Cgn/J mice in the following generation by mating to C57BL/6J wild-type mice (The Jackson Laboratory). *Fzd1*-null mice were then obtained by backcrossing *Fzd1*^{+/-} mice. Genotyping analyses were performed by PCR on DNA obtained from tail biopsies, using the oligonucleotide primers 5'-CCTGGACCACTCTTGCTCTCCT-3' (*Fzd1* genotype S), 5'-GGGTGGTGGCTCCCCTGTGAT-3' (*Fzd1* genotype AS) and 5'-TAGGAACTTCAATTCCCCGCAAGA-3'(KOII loxP/flip) using the following PCR conditions; 1 min at 95°C for 1 cycle, 45 sec at 95°C, 45 sec at 58°C and 1 min at 72°C for 35 cycles, and 7 min at 72°C for 1 cycle (Fig. 2C). Primers were designed to generate PCR products of ~175 bp for the wild-type *Fzd1* allele, ~299 bp for the floxed allele, and ~136 bp for the knockout (*i.e.*, Cre-recombined) allele (Fig. 2C-E). All animal procedures were approved by the institutional animal care and use committee and conformed to the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as promulgated by the Society for the Study of Reproduction.

Mating trial

The mating trial was conducted using 8 week-old *Fzd1*^{-/-} (n=7) and control littermate *Fzd1*^{+/-} (n=9) female mice. Adult C57BL/6J males were placed in the cages for 12 months and the experiment terminated 22 days after their removal to allow for the final litter. Males were changed after 6 months to avoid a possible decline in fertility.

Follicle counting

Left ovaries from 6 week-old and one year-old mice were collected, fixed in Bouin's fixative for 24h and washed for 3 days with 70% ethanol before being paraffin-embedded. Serial sections were prepared at a thickness of 6 μm and every seventh (42 day old) or fifth (1 year old) section was counterstained with hematoxylin and eosin. Photomicrographs of all follicles containing a visible oocyte nucleus were taken for all the sections. Blind classification of the follicles based on Pedersen's system was then performed as previously described [23].

Tissue collection

Ovaries, granulosa cells and COCs were obtained from 23 to 26 day-old mice 48h following treatment with eCG (5 IU i.p., Folligon; Intervet, Whitby, ON, Canada), and with or without the subsequent administration of an ovulatory dose of hCG (5 IU i.p., Chorulon; Intervet). Intact ovaries (isolated 24h post-hCG) were frozen at -80°C until the time of RNA extraction. Ovaries from mice obtained 0, 4, 6, 8, 10 or 12h post-hCG were placed in HBSS and punctured to release granulosa cells and COCs as previously described [29]. COCs were then isolated from granulosa cells by pipette, pooled, centrifuged at 1000g and frozen at -80°C until RNA or protein extraction. For *in vivo* gene expression analysis of COCs at 12h and 20h post hCG, oviducts were dissected, placed in HBSS and flushed to release their contents. COCs were collected by pipette, pooled, and frozen at -80°C until RNA or protein extraction. COCs isolated at 12h post-hCG were collected by both methods (ovary puncture + oviduct flushing) as not all follicles had ovulated at that time.

To evaluate *Fzd1* expression in the uterus, uterine tissue was obtained from non-pregnant mice and at different times during gestation. C57BL/6J female mice were housed with males and checked in the morning for vaginal plugs. Females were sacrificed 9, 11 or 14 days after mating, uteri were collected and fetal tissues flushed from the uterine horns. Uterine tissue was placed immediately in lysis buffer, and RNA extracted as described below.

Real-time RT-PCR and microarray analyses

RNA from whole ovaries, granulosa cells, COCs and uteri was purified using the RNeasy mini kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada), except for RNA from granulosa cells used to determine *Fzd1* expression (Fig. 2F), which was purified with the RNeasy micro kit. RT-PCR analyses of granulosa cell (Fig. 2F only) and uterine gene expression were performed using the SuperScript® III Platinum® Two-Step RT-PCR kit with SYBR® Green (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) using the oligonucleotides listed in Table 1. Quantitative PCR analysis was done using the Rotor-Gene RG-3000 apparatus (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia) and gene expression was determined using Rotor-Gene 6.0 software (Corbett Research). Relative gene expression was calculated by dividing individual gene expression values by their corresponding *Rpl19* housekeeping control gene expression values. All other RT-PCR analyses (i.e., Figures 1, 5, 6) were done using the SuperScript® Vilo™ cDNA synthesis kit (Invitrogen) and Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Streetsville, Ontario, Canada) with the primers listed in Table 1. These analyses were conducted on an ABI Prism 7300 instrument, and gene expression was normalized to the reporter gene *Rpl19*. RT-PCR data obtained with this method were presented as fold increases in gene expression relative to a reference sample for each gene analyzed.

Microarray analyses were done using triplicate RNA samples from granulosa cells collected from *Fzd1*^{-/-} and *Fzd1*^{+/+} mice treated with eCG for 48h and with hCG for 12h, as described above. MouseRef-6 v.2.0 expression BeadChips technology (Illumina, San Diego, CA, USA) was used, and all steps of RNA quality control, probe synthesis, hybridization, washing and array scanning were done by the McGill University Génome Québec Innovation Center (Montréal, Qc, Canada). Microarray data were analyzed using FlexArray 1.6.1 software (Génome Québec). Data from both genotypes were processed using the lumi package followed by a *t*-test. A P-value threshold of 0.05 and 1.5-fold change cut-off values were used for identification of differentially expressed genes. All array data were deposited in the MIAME compliant database GEO, with accession number GSE38315.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical analyses of StAR and TRP63 were done on formalin-fixed, paraffin-embedded, 7 μ m ovary (StAR) or uterus (TRP63) sections using the Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) as directed by the manufacturer. Sections were probed with a primary antibody against StAR (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) or against TRP63 (anti-p63, Santa Cruz), and staining was done using a 3,3'-diaminobenzidine peroxidase substrate kit (Vector Laboratories). Sections of ovaries were briefly counterstained with hematoxylin before mounting.

Immunoblotting

Frozen granulosa cells (corresponding to 0.5 ovary/sample) or COCs (25 COCs/sample), collected as described above, were lysed in SDS loading buffer (50mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 1% β -Mercaptoethanol, 12.5 mM EDTA and 0.02% bromophenol blue). Samples were resolved on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and transferred to Hybond-P PVDF membrane (GE Amersham, Piscataway, NJ). The membrane was then sequentially probed with antibodies against active CTNNB1, total CTNNB1 (Cell Signaling, Danvers, MA) and ACTB (Santa Cruz) diluted in 5% BSA. Following incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary anti-rabbit antibody (GE Amersham), the protein bands were visualized by chemiluminescence using the ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Amersham) and High Performance Chemiluminescence film (GE Amersham).

COC expansion analysis

For *in vitro* COC expansion, non expanded COCs from immature mice treated for 48 hours with eCG were plated (~15/well) in separate wells of a 24-well plate (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) in 50 μ l of defined COC medium (MEM, 25 mM HEPES, 0.25 mM sodium

pyruvate, 3 mM L-glutamine, 1 mg/ml BSA, 100 U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin and 1% FBS (Invitrogen)) with or without bovine FSH (100 ng/ml, National Hormone & Peptide Program, NIDDK) or forskolin (10 µM) (Cedarlane Laboratories, Burlington, ON, Canada). Expansion was assessed by microscopic examination 0, 8, 12, 16 and 20h after the plating. COC diameters were calculated as the means of 4 separate measurements/COC.

Steroid hormone measurement

Estradiol (E2) and progesterone (P4) levels were determined by Calbiotech ELISA and radioimmunoassay, respectively. All assays were performed by the ligand assay and analysis core laboratory of the University of Virginia (Charlottesville, Virginia, USA).

Statistical analyses

Effects of genotype on total pups, total litters, litter sizes, ovary weights, follicle numbers, and mRNA, protein and steroid hormone levels were analyzed by unpaired *t*-tests. Effects of hCG on *Fzd1* and *Wnt4* expression in both granulosa cells and COCs and *Fzd1* expression in the uterus were analyzed by one-way ANOVA. Log transformation of data was performed before statistical analysis when unequal variances were detected using Bartlett's test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Analyses were done using Prism 4.0a (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) software.

2.4 RESULTS

Fzd1 is Required for Normal Female Fertility

Our previous work identified the requirement for WNT4 for normal follicular development, ovarian steroidogenesis and female fertility in mice [23]. To identify the

receptor for WNT4 in ovarian granulosa cells, we first searched available databases and literature describing ovarian *Fzd* gene expression. *Fzd1* is expressed in granulosa cells, and its expression was shown to be induced by hCG in the immature mouse model [26] in a manner similar to that of *Wnt4* [23,26]. Furthermore, microarray analyses identified *Fzd1* as one of the genes that is most strongly induced in cumulus cells 8h after hCG administration [30]. Our studies of *Fzd1* expression in immature mouse ovarian granulosa cells demonstrated a significant induction of *Fzd1* expression 4h post-hCG, with maximal levels attained by 6h and maintained until ovulation (Fig. 1A). *Wnt4* expression followed a similar pattern (Fig. 1B), confirming previous studies [26]. In cumulus-oocyte complexes (COCs), *Fzd1* expression was induced 4h post-hCG, and levels remained high following ovulation at 20h post-hCG (Fig. 1C), similar to results obtained in an earlier study [30]. As for *Fzd1*, we found that *Wnt4* expression was induced at 4h post-hCG, but then further increased at 12h and remained high in ovulated COCs (Fig. 1D). Together, these and previous studies indicate that *Wnt4* and *Fzd1* show similar expression patterns in granulosa and cumulus cells, and may therefore be functionally related.

To study the physiological functions of *Fzd1*, we performed conditional gene targeting. A targeting construct was devised to insert LoxP sites into the 5' untranslated region and downstream of the coding region of the single exon (Fig. 2A). Three correctly-targeted embryonic stem cell lines were obtained (Fig. 2B and not shown) and used to generate chimeric mice, all of which gave germline transmission of the floxed allele. Mice bearing the floxed allele were mated to the Tg(CMV-cre)1Cgn/J “cre deleter” strain, in order to obtain recombination of the floxed allele in the germline, and hence generate a knockout allele (Fig. 2A, D-F). *Fzd1*-null mice were found to be viable, healthy, and otherwise indistinguishable from their wild-type littermates, and male mice were fertile (data not shown), confirming the results of a recent study [31].

To assess the fertility of female *Fzd1*-null mice, 7 week-old females were individually housed with fertile wild-type males for a period of 12 months, and litter frequency and size were recorded. Whereas *Fzd1*^{-/-} females produced a normal number of litters, their average litter size was ≈ 1 pup smaller ($P < 0.05$) than that of controls (Table 2),

indicating that *Fzd1* is required for normal female fertility. Interestingly, of the 17 initial mating pairs involving *Fzd1*^{-/-} females that were formed to generate experimental animals, 3 (17.6%) failed to produce offspring. Histopathologic examination of the reproductive tissues of the sterile *Fzd1*^{-/-} females revealed striking abnormalities. The ovaries of these animals were very small and were devoid of follicles (Fig. 3A). Numerous invaginations of the ovarian surface epithelium formed tube-like structures in the ovarian cortex (Fig. 3A), and multiple nests of StAR-positive cells resembling lutein cells were present throughout the ovary (Fig. 3B). This phenotype was diagnosed as tubulostromal hyperplasia, which is thought to be a consequence of premature follicle depletion in rodents [32]. The uteri of the sterile *Fzd1*^{-/-} females were also grossly abnormal, having fewer glands and severe stromal fibrosis, as revealed by Masson trichrome staining (Fig. 3C). Some (~15%) uterine glands in these mice featured an ectopic layer of cells immediately beneath the columnar epithelial layer that was positive for the basal cell marker TRP63 (Fig. 3D), an anomaly that also occurs in mice with conditional ablation of *Wnt4* in the uterus [33]. *Fzd1*^{-/-} females that did not have the sterility phenotype had ovaries and uteri that were indistinguishable from those of wild-type mice (Fig. 3 and not shown). A uterine phenotype in *Fzd1*^{-/-} mice was not expected, as *Fzd1* expression in this tissue had not been previously characterized. We therefore examined uterine *Fzd1* mRNA levels throughout gestation, and found it to be expressed at high but unvarying levels in pregnant and non-pregnant mice (Fig. 3E).

Follicle Development, Steroidogenesis and Wnt4 Target Gene Expression are Normal in Fzd1-null Mice

Mice with *Wnt4*-deficient granulosa cells are subfertile, which was attributed in part to their having reduced numbers of healthy antral follicles, with resultant decreased ovarian weights [23]. We therefore determined ovary weights and follicular reserves in *Fzd1*^{-/-} mice. *Fzd1*^{-/-} ovary weights at 6 and 28 weeks of age were slightly lower than controls, although the difference was not statistically significant (Table 3). Likewise, no statistically significant difference was observed between 6 week or 1 year-old *Fzd1*-null and age-matched control

animals with regards to primordial, primary, secondary or antral follicle abundance, or relative proportions of atretic follicles of any size or at either age (Fig. 4).

WNT4 was previously shown to regulate the expression of various granulosa cell genes, including *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp19*, *Ptgs2*, and *Fshr*. WNT4 deficiency also resulted in reduced serum progesterone levels in eCG/hCG-treated immature *Wnt4*^{tm1.1Boer/-}; *Amhr2*^{tm3(cre)Bhr/+} mice [23]. Analyses of gene expression in granulosa cells from eCG/hCG-treated immature *Fzd1*^{-/-} mice revealed no differences in the expression of the aforementioned WNT4 target genes relative to controls (Fig. 5A). Expression of *Cyp11a1*, *Cyp19* and *Ptgs2* in whole ovaries from immature *Fzd1*^{-/-} mice 24h after hCG administration (i.e., following CL formation) was likewise unaffected (Fig. 5A). Analyses of circulating estradiol and progesterone levels in eCG-primed immature *Fzd1*^{-/-} and control mice prior to and 12h or 24h following an ovulatory dose of hCG revealed no differences between genotypes in levels of either hormone (Fig. 5B). Together, these data suggest that the decreased fertility observed in *Fzd1*^{-/-} females was not due to a follicle development or steroidogenesis defect, and that FZD1 is unlikely to function as the sole WNT4 receptor in granulosa cells.

To identify genes whose expression was altered in *Fzd1*^{-/-} ovaries, granulosa cells were isolated from immature *Fzd1*^{-/-} and control mice 12h post-hCG, and mRNA from these cells was used for microarray analyses. Surprisingly, these analyses identified very few differentially expressed genes, with only 13 being at least 1.5-fold up- or down-regulated in cells from *Fzd1*^{-/-} mice (Table 4). Furthermore, real-time RT-PCR studies conducted using separate granulosa cell mRNA samples could only confirm the differential expression of three of the 13 genes identified by microarray; *Fam126a* and *Slc30a3*, whose expression were downregulated in *Fzd1*^{-/-} mice, and *Reln*, whose expression was upregulated (Fig. 5A and not shown). *Fam126a* was previously characterized as a gene whose expression is down-regulated by CTNNB1 [34], suggesting that increased CTNNB1 signaling may occur in the granulosa cells of *Fzd1*^{-/-} mice. To verify this, we compared total and “activated” (i.e., typhosphorylated) CTNNB1 levels in *Fzd1*^{-/-} and control granulosa cells isolated from eCG/hCG treated immature mice. Results showed comparable levels of total and activated CTNNB1 protein in both models at all timepoints examined (Fig. 5C), suggesting that the

level of WNT/CTNNB1 pathway signaling activity in granulosa cells was not altered by the loss of *Fzd1*, at least not at the level (or upstream) of CTNNB1.

Fzd1, but not Wnt4, is Required for Normal Cumulus-Oocyte Complex Gene Expression

As *Wnt4* and *Fzd1* are similarly regulated in cumulus cells (Fig. 1), we next sought to determine if FZD1 could serve as a WNT4 receptor specifically in that cell type, and if cumulus expansion is altered by *Fzd1* and/or *Wnt4* loss. COCs were harvested from eCG-primed immature *Fzd1*^{-/-} and control ovaries prior to or 4h following hCG administration, and collected from the oviducts 20h post-hCG. These COCs were then analyzed for the expression of a series of genes known to be regulated in oocytes or cumulus cells during cumulus expansion [30,35]. Results revealed a number of genes involved in cumulus expansion to be underexpressed in *Fzd1*^{-/-} COCs, including *Areg*, *Btc*, *Ptgs2*, *Sema3a*, *Ptx3*, *Il6*, *Nts*, *Alcam* and *Cspg2* (Fig. 6A), with the differences occurring mostly at 4h post-hCG. Expression of *Fam126a* was decreased and that of *Axin2*, a well-established CTNNB1 target gene, was increased in *Fzd1*^{-/-} COCs, again suggesting increased CTNNB1 signaling activity. However, as for granulosa cells, we were not able to detect differences in total or activated CTNNB1 protein levels in COCs from *Fzd1*^{-/-} and control animals at any of the timepoints examined (not shown). We also analyzed the expression of a number of oocyte-specific genes whose expression is normally down-regulated by hCG during cumulus expansion ([30] and unpublished observations). For a number of these genes (*Zp3*, *Dppa3*, *Nlrp5*, *Bmp15*), hCG failed to down-regulate their expression to the same extent as the controls at 20h post-hCG (Fig. 6A). Together, these results indicate that the loss of *Fzd1* delayed or blunted the gene expression changes associated with COC expansion in both the oocyte and the cumulus cells.

To verify if WNT4 is similarly required for normal cumulus gene expression, we conditionally inactivated *Wnt4* in granulosa and cumulus cells using strains bearing the *Wnt4*^{tm1.1Boer} floxed allele [23] and the (*CYP19A1*-cre)1Jri transgene, in which Cre expression is driven by the human *CYP19A1* promoter [36]. *Wnt4* expression in COCs from *Wnt4*^{tm1.1Boer/tm1.1Boer};Tg(*CYP19A1*-cre)1Jri mice was efficiently knocked down, with reduction

in mRNA levels attaining 98% at 20h post-hCG (Fig. 6C). The expression of the genes differentially expressed in *Fzd1*^{-/-} COCs was then evaluated in *Wnt4*^{tm1.1Boer/tm1.1Boer};Tg(*CYP19A1*-cre)1Jri COCs. Results showed that the expression of none of the putative *Fzd1* target genes was altered in *Wnt4*^{tm1.1Boer/tm1.1Boer};Tg(*CYP19A1*-cre)1Jri COCs relative to *Wnt4*^{tm1.1Boer/tm1.1Boer} controls (Fig. 6C), indicating that WNT4 is not required for their normal expression. These results suggest WNT4 is unlikely to function as the sole ligand for FZD1 in cumulus cells.

To study the functional consequences of altered COC gene expression *in vivo*, histological analyses of *Fzd1*^{-/-} ovaries from immature mice were done throughout hCG-induced COC expansion and ovulation. Cumulus expansion occurred in *Fzd1*^{-/-} follicles at the same apparent rate and to the same extent as in controls, without any obvious morphological differences (Fig. 7A and B). Cumulus expansion was also studied *in vitro* on isolated COCs from eCG-treated *Fzd1*^{-/-} and control mice. Upon treatment with either FSH or forskolin, *Fzd1*^{-/-} COCs expanded in a manner indistinguishable from controls (Fig. 7C and not shown).

2.5 DISCUSSION

Whereas the physiological roles of WNTs in ovarian function are gradually being defined, little remains known of the mechanisms whereby their signals are transduced. In this report, we show that the WNT receptor FZD1 is required for normal female fertility, and that it appears to act (at least in part) by regulating the expression of genes involved in cumulus expansion. Although a recent study found *Fzd1*-null mice to be completely normal and fertile [31], the manner in which female fertility was assessed was not described, and may have failed to detect the relatively mild subfertility phenotype reported herein. The requirement of *Fzd1* for normal female fertility therefore represents the first non-redundant physiological role for *Fzd1* described thus far. Furthermore, our discovery that *Fzd1* regulates the expression of cumulus and oocyte genes represents the first functional evidence that WNT signaling may be involved in the regulation of cumulus expansion. Although *Wnt4* and *Fzd1* share similar LH/hCG-regulated expression patterns in both granulosa and cumulus cells, we found

essentially no phenotypic similarities between *Fzd1*- and *Wnt4*-deficient mice at the level of follicle development or ovarian steroidogenesis or gene expression. It would therefore seem very unlikely that WNT4 and FZD1 function in a non-redundant manner as a ligand-receptor pair in the adult ovary. Further experiments will therefore be required to elucidate the mechanisms of FZD1 signaling in cumulus cells, as well as to define the various components of the signaling pathway(s) that it mediates, including its ligand(s).

Although we found that the COC response to hCG was blunted at the level of gene expression in *Fzd1*-null mice, the manner and extent to which this may have contributed to the subfertility phenotype remains unclear. Indeed, cumulus expansion proceeded unabated both *in vitro* and *in vivo* in the *Fzd1*^{-/-} model. However, altered COC gene expression could lead to subtle changes in the composition of the cumulus extracellular matrix and/or the maturation of the oocyte that would be difficult to detect, and that could lead to altered survival, transport in the oviduct, fertilization and/or post-fertilization development. Further studies will be required to determine if any of the aforementioned processes are compromised in *Fzd1*^{-/-} mice. Another possibility is that additional functional defects occur outside the ovary. Indeed, we found *Fzd1* to be highly expressed in the uterus throughout gestation, indicating that it may play a role in implantation or some aspect of fetal development. Although we were not able to detect any histological anomalies in the uteri of *Fzd1*^{-/-} mice (other than in the rare subset that were sterile), this certainly does not exclude the possibility of more subtle defects.

The up-regulation of the canonical WNT signaling target gene *Axin2* and the down-regulation of *Fam126a* in the COCs of *Fzd1*^{-/-} mice strongly suggests that FZD1 normally acts to repress CTNNB1 signaling in cumulus cells. Whereas some reports have characterized FZD1 as a possible canonical pathway agonist [37,38], repression of CTNNB1 signaling by FZD1 has also been reported [39], perhaps indicating that the nature of the signal transduced by FZD1 can vary according to factors such as the WNT ligand that it binds, cell type and physiological context. In spite of altered *Axin2* and *Fam126a* expression, we found that levels of active (hypophosphorylated) CTNNB1 were not changed in *Fzd1*^{-/-} COCs, suggesting that ovarian FZD1 signaling does not involve the canonical pathway. However,

the mechanism whereby FZD1 represses the canonical pathway may not involve the modulation of CTNNB1 phosphorylation. Indeed, non-canonical WNTs such as WNT5a do not alter CTNNB1 expression, but nonetheless repress CTNNB1-mediated transcriptional activity [40,41]. FZD1 may therefore act downstream of CTNNB1 to modulate the expression of *Axin2*, *Fam126a*, and potentially the other target genes identified in this study. That FZD1 does this by activating a non-canonical signaling pathway (i.e., the WNT/Ca²⁺ or planar cell polarity pathway) is a distinct possibility, but remains to be determined.

Our observation of severe ovarian and uterine defects in a small subset of *Fzd1* KO mice was somewhat paradoxical, as it could be compatible with FZD1 functioning as a receptor for WNT4. Indeed, *Wnt4*-null mice are characterized by the depletion of nearly their entire oocyte reserve [8], but do not survive beyond 48h after birth due to kidney defects, precluding any study of adult ovaries. As the tubulostromal hyperplasia observed in the ovaries of sterile *Fzd1*^{-/-} mice may be the consequence of premature follicle depletion [32], it may be related to the phenotype observed in *Wnt4*-null mice, suggesting that FZD1 may function as a WNT4 receptor in the pre/peri-natal ovary. Likewise, the conditional inactivation of *Wnt4* in the mouse uterus results in a decreased number of uterine glands and the ectopic appearance of TRP63-positive basal cells in a manner similar to what we observed in the sterile *Fzd1*^{-/-} mice [33]. *Fzd1* has also previously been shown to be expressed in the epithelium and mesenchyme of the Müllerian duct (the anlage that gives rise to the uterus and other structures), and was proposed to be the receptor for WNT4 in that tissue [42]. Together, these observations support the notion that FZD1 functions as a uterine WNT4 receptor, at least during a limited developmental period. However, the reason why the severe ovarian and uterine phenotypes occur so infrequently in *Fzd1*^{-/-} mice remains a mystery. As our *Fzd1*^{-/-} mice were created on a mixed genetic background, we postulated that other FZD(s) may compensate for the loss of *Fzd1* during development in most strains, but certain genetic backgrounds may be more susceptible to the loss of *Fzd1*. Our efforts to breed our *Fzd1*^{-/-} mice into a balb/c or C57BL/6 genetic background failed to increase the frequency of the sterility phenotype or the ovarian/uterine anomalies, and in fact seemed to make them rarer still (not shown). Presuming that functional redundancy occurs in both the ovary and uterus,

the ultimate identification of the FZDs involved in transducing the WNT4 signal will likely require mice with the concomitant inactivation of multiple *Fzd* genes.

In summary, we have determined that *Fzd1* expression is required for normal female fertility, probably in part due to its regulation of genes required for cumulus expansion. *Fzd1* KO mice did not reproduce the ovarian phenotype of *Wnt4*-deficient mice, indicating that WNT4 and FZD1 are unlikely to function non-redundantly as a ligand-receptor pair in the adult ovary. Additional studies will be required to define the mechanisms and signaling pathways whereby FZD1 regulates COC gene expression, and whether FZD1 regulates reproductive processes other than cumulus expansion.

2.6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Ms Meggie Girard for assistance with mouse colony management. The R1 embryonic stem cell line was provided by Dr Andras Nagy, Reka Nagy, Dr Janet Rossant and Dr Wanda Abramow-Newerly (University of Toronto). We also thank Dr. A.F. Parlow and National Hormone & Peptide Program, NIDDK for providing bovine FSH.

2.7 REFERENCES

1. Nusse R, Fuerer C, Ching W, et al. Wnt signaling and stem cell control. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2008;73:59-66.
2. Lustig B, Behrens J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol.* Apr 2003;129(4):199-221.
3. Karner C, Wharton KA, Jr., Carroll TJ. Planar cell polarity and vertebrate organogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* Apr 2006;17(2):194-203.
4. Kohn AD, Moon RT. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium.* Sep-Oct 2005;38(3-4):439-446.
5. Huang H, He X. Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr Opin Cell Biol.* Apr 2008;20(2):119-125.
6. Archbold HC, Yang YX, Chen L, Cadigan KM. How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/beta-catenin pathway. *Acta Physiol (Oxf).* Jan 2012;204(1):74-109.
7. Jaaskelainen M, Prunskaitė-Hyyryläinen R, Naillat F, et al. WNT4 is expressed in human fetal and adult ovaries and its signaling contributes to ovarian cell survival. *Mol Cell Endocrinol.* Apr 12 2010;317(1-2):106-111.
8. Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature.* Feb 4 1999;397(6718):405-409.
9. Jeays-Ward K, Hoyle C, Brennan J, et al. Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad. *Development.* Aug 2003;130(16):3663-3670.
10. Heikkilä M, Peltoketo H, Leppaluoto J, Ilves M, Vuolteenaho O, Vainio S. Wnt-4 deficiency alters mouse adrenal cortex function, reducing aldosterone production. *Endocrinology.* Nov 2002;143(11):4358-4365.
11. Yao HH, Matzuk MM, Jorgez CJ, et al. Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Dev Dyn.* Jun 2004;230(2):210-215.
12. Liu CF, Parker K, Yao HH. WNT4/beta-catenin pathway maintains female germ cell survival by inhibiting activin betaB in the mouse fetal ovary. *PLoS One.* 2010;5(4):e10382.

13. Chassot AA, Ranc F, Gregoire EP, et al. Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum Mol Genet.* May 1 2008;17(9):1264-1277.
14. Tomizuka K, Horikoshi K, Kitada R, et al. R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Hum Mol Genet.* May 1 2008;17(9):1278-1291.
15. Chassot AA, Gregoire EP, Lavery R, et al. RSPO1/beta-catenin signaling pathway regulates oogonia differentiation and entry into meiosis in the mouse fetal ovary. *PLoS One.* 2011;6(10):e25641.
16. Maatouk DM, DiNapoli L, Alvers A, Parker KL, Taketo MM, Capel B. Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum Mol Genet.* Oct 1 2008;17(19):2949-2955.
17. Liu CF, Bingham N, Parker K, Yao HH. Sex-specific roles of beta-catenin in mouse gonadal development. *Hum Mol Genet.* Feb 1 2009;18(3):405-417.
18. Parakh TN, Hernandez JA, Grammer JC, et al. Follicle-stimulating hormone/cAMP regulation of aromatase gene expression requires beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 15 2006;103(33):12435-12440.
19. Hernandez Gifford JA, Hunzicker-Dunn ME, Nilson JH. Conditional deletion of beta-catenin mediated by Amhr2cre in mice causes female infertility. *Biol Reprod.* Jun 2009;80(6):1282-1292.
20. Roy L, McDonald CA, Jiang C, et al. Convergence of 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A and glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin signaling in corpus luteum progesterone synthesis. *Endocrinology.* Nov 2009;150(11):5036-5045.
21. Fan HY, O'Connor A, Shitanaka M, Shimada M, Liu Z, Richards JS. Beta-catenin (CTNNB1) promotes preovulatory follicular development but represses LH-mediated ovulation and luteinization. *Mol Endocrinol.* Aug 2010;24(8):1529-1542.
22. Wang HX, Li TY, Kidder GM. WNT2 regulates DNA synthesis in mouse granulosa cells through beta-catenin. *Biol Reprod.* May 2010;82(5):865-875.
23. Boyer A, Lapointe E, Zheng X, et al. WNT4 is required for normal ovarian follicle development and female fertility. *FASEB J.* Aug 2010;24(8):3010-3025.

24. Lapointe E, Boerboom D. WNT signaling and the regulation of ovarian steroidogenesis. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2011;3:276-285.
25. Hsieh M, Boerboom D, Shimada M, et al. Mice null for Frizzled4 (Fzd4^{-/-}) are infertile and exhibit impaired corpora lutea formation and function. *Biol Reprod*. Dec 2005;73(6):1135-1146.
26. Hsieh M, Johnson MA, Greenberg NM, Richards JS. Regulated expression of Wnts and Frizzleds at specific stages of follicular development in the rodent ovary. *Endocrinology*. Mar 2002;143(3):898-908.
27. Bardeesy N, Sinha M, Hezel AF, et al. Loss of the Lkb1 tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation. *Nature*. Sep 12 2002;419(6903):162-167.
28. Sambrook J, Fritsch, E. F., and Maniatis, T., 2nd edition, ed *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
29. Zeleznik AJ, Midgley AR, Jr., Reichert LE, Jr. Granulosa cell maturation in the rat: increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone in vivo. *Endocrinology*. Sep 1974;95(3):818-825.
30. Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Shimada M, et al. Gene expression profiles of cumulus cell oocyte complexes during ovulation reveal cumulus cells express neuronal and immune-related genes: does this expand their role in the ovulation process? *Mol Endocrinol*. Jun 2006;20(6):1300-1321.
31. Yu H, Smallwood PM, Wang Y, Vidaltamayo R, Reed R, Nathans J. Frizzled 1 and frizzled 2 genes function in palate, ventricular septum and neural tube closure: general implications for tissue fusion processes. *Development*. Nov 2010;137(21):3707-3717.
32. Mohr U, ed International Classification of Rodent Tumors. The Mouse. Germany: Springer; 2001.
33. Franco HL, Dai D, Lee KY, et al. WNT4 is a key regulator of normal postnatal uterine development and progesterone signaling during embryo implantation and decidualization in the mouse. *FASEB J*. Apr 2011;25(4):1176-1187.
34. Kawasoe T, Furukawa Y, Daigo Y, et al. Isolation and characterization of a novel human gene, DRCTNNB1A, the expression of which is down-regulated by beta-catenin. *Cancer Res*. Jul 1 2000;60(13):3354-3358.

35. Assou S, Anahory T, Pantesco V, et al. The human cumulus--oocyte complex gene-expression profile. *Hum Reprod.* Jul 2006;21(7):1705-1719.
36. Wenzel PL, Leone G. Expression of Cre recombinase in early diploid trophoblast cells of the mouse placenta. *Genesis.* Mar 2007;45(3):129-134.
37. Flahaut M, Meier R, Coulon A, et al. The Wnt receptor FZD1 mediates chemoresistance in neuroblastoma through activation of the Wnt/beta-catenin pathway. *Oncogene.* Jun 11 2009;28(23):2245-2256.
38. Neumann J, Schaale K, Farhat K, et al. Frizzled1 is a marker of inflammatory macrophages, and its ligand Wnt3a is involved in reprogramming Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages. *FASEB J.* Nov 2010;24(11):4599-4612.
39. Roman-Roman S, Shi DL, Stiot V, et al. Murine Frizzled-1 behaves as an antagonist of the canonical Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem.* Feb 13 2004;279(7):5725-5733.
40. Yuzugullu H, Benhaj K, Ozturk N, et al. Canonical Wnt signaling is antagonized by noncanonical Wnt5a in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer.* 2009;8:90.
41. Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol.* Apr 2006;4(4):e115.
42. Deutscher E, Hung-Chang Yao H. Essential roles of mesenchyme-derived beta-catenin in mouse Mullerian duct morphogenesis. *Dev Biol.* Jul 15 2007;307(2):227-236.

2.8 FIGURES

FIG. 1

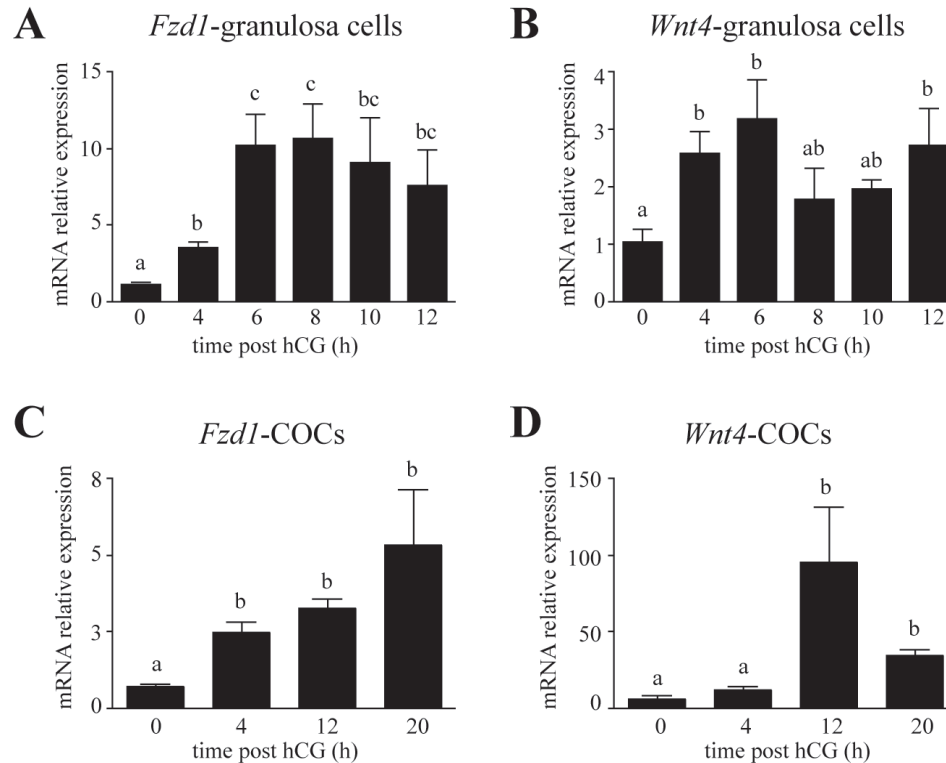


Figure 1. Similar patterns of *Fzd1* and *Wnt4* mRNA regulation by hCG in granulosa cells and COCs. Quantitative RT-PCR analysis of *Fzd1* (A) and *Wnt4* (B) mRNA levels in granulosa cells isolated from immature eCG-treated mice without or 4, 6, 8, 10 or 12h after the administration of an ovulatory dose of hCG. Analyses were also conducted on isolated COCs (C, D) obtained from immature eCG-treated mice at different times following hCG administration. COCs were collected either by follicle puncture (0 and 4h), by flushing the oviducts (20h) or by using both methods (12h). For all analyses, n=3-5 samples/time point, with each sample consisting of a pool of cells collected from 2-5 animals. All data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19* and are expressed as means \pm SEM (columns and error bars). Columns that are not labeled with common letters are significantly different ($P < 0.05$).

FIG. 2

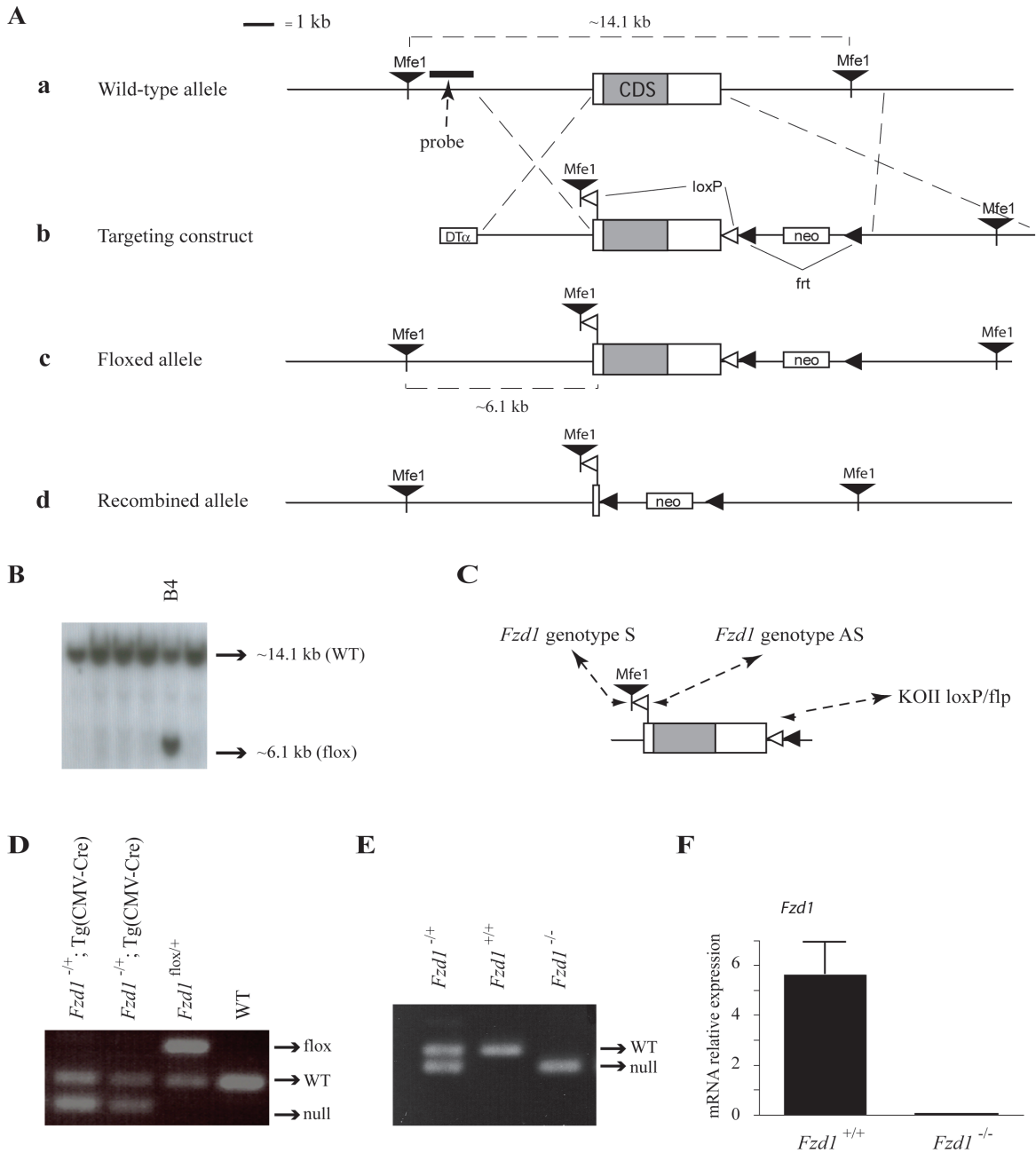


Figure 2 : Targeting of *Fzdl*. A) Illustration of the strategy used to generate *Fzdl*^{-/-} mice. a) Placement of the genomic DNA probe used for Southern blotting. b) In the targeting construct, LoxP sites were inserted upstream and downstream of the single *Fzdl* exon. c) *Fzdl*^{flox} allele. d) *Fzdl*⁻ (i.e., Cre-recombined) allele.

B) Generation of embryonic stem cell lines heterozygous for the targeted *Fzd1* allele. Presence of the targeted allele was detected as a 6.1 kb *Mfe1* restriction fragment by Southern blotting. One representative positive clone (B4) is shown alongside five negative clones. C) PCR genotyping analysis strategy. Oligonucleotides (small black arrowheads) were designed to generate PCR products of 175 bp for the *Fzd1*⁺ allele, 299 bp for the *Fzd1*^{fl^{ox}} allele and 136 bp for the *Fzd1*⁻ allele. D) PCR genotype analysis of pups generated by the mating of *Fzd1*^{fl^{ox}/+} with Tg(CMV-cre)1Cgn/J mice. E) PCR analysis of pups generated by backcross of *Fzd1*^{+/-} mice. F) Quantitative RT-PCR analysis of *Fzd1* expression in granulosa cells isolated from immature eCG-treated *Fzd1*^{+/+} and *Fzd1*^{-/-} mice 12h after the administration of an ovulatory dose of hCG, confirming the abolition of *Fzd1* expression in the *Fzd1*-null mice. n=4-5 animal/genotype. Data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19* and are expressed as means ± SEM (columns and error bars). DTα, diphtheria toxin α chain; neo, neomycin resistance cassette; WT, wild type.

FIG. 3

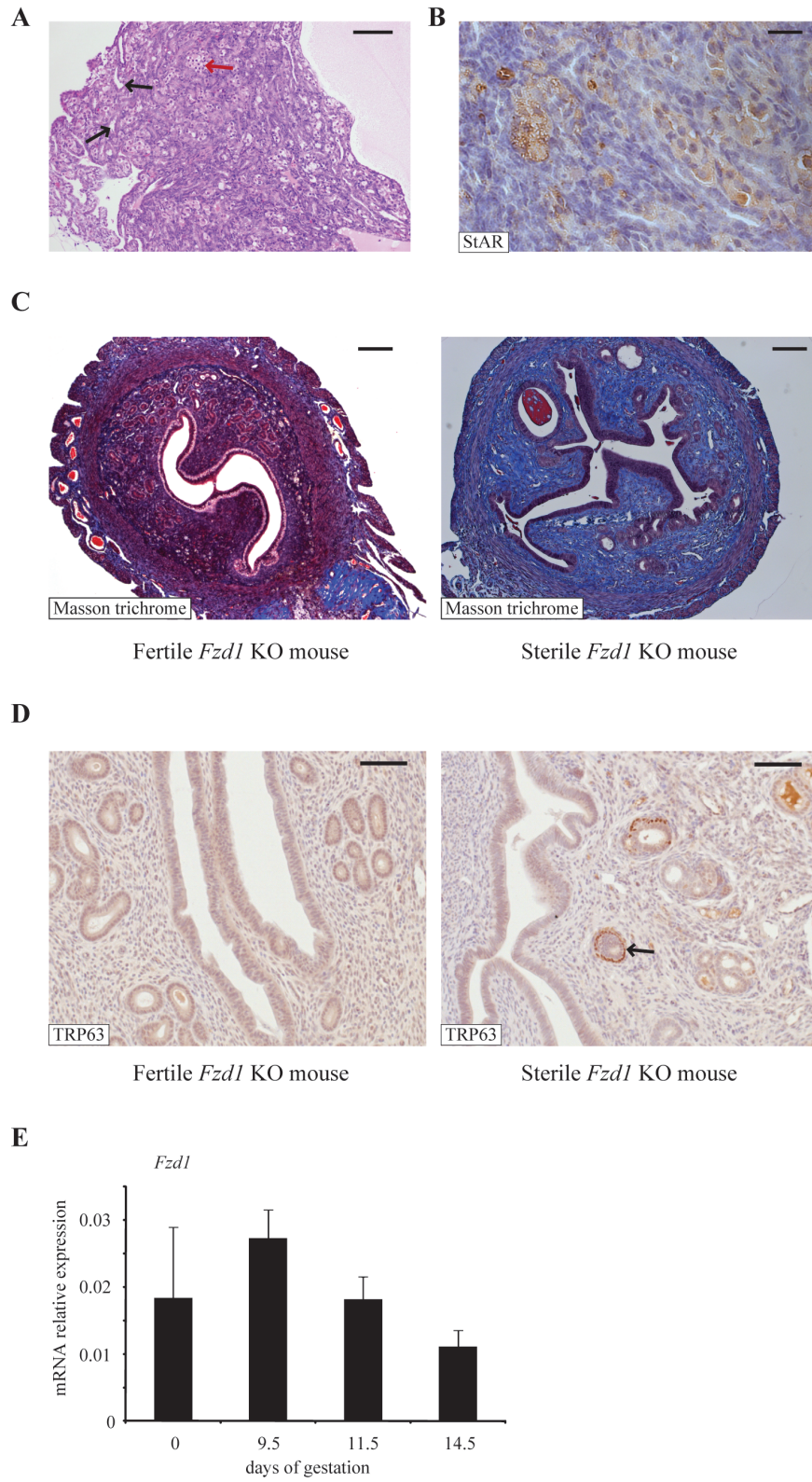


Figure 3 : A minority of *Fzd*^{-/-} female mice are sterile and possess abnormalities in their reproductive tissues. A) Photomicrograph of the ovary of a sterile *Fzd*^{-/-} mouse showing evidence of tubulostromal hyperplasia, characterized by the formation of tube-like structures in the stroma (black arrows) along with nests of lutein-like cells (red arrow), bar=100 μm. B) Immunohistochemical analysis revealed that the lutein-like cells express StAR, bar=25 μm. C) Masson trichrome staining revealed extensive stromal fibrosis (collagen fibers stain pale blue) and few glands in the uteri of sterile *Fzd*^{-/-} mice compared to the uteri of fertile *Fzd*^{-/-} mice, bar=200 μm. D) Many of the uterine glands in the sterile *Fzd*^{-/-} mice had an ectopic layer of cells that stained positive for TRP63 (arrow), unlike those of fertile *Fzd*^{-/-} females, bar=100 μm. E) Quantitative RT-PCR analysis of *Fzd1* expression in uterine tissues of non-pregnant and 9.5, 11.5 or 14.5d-pregnant mice (n=5/timepoint).

FIG.4

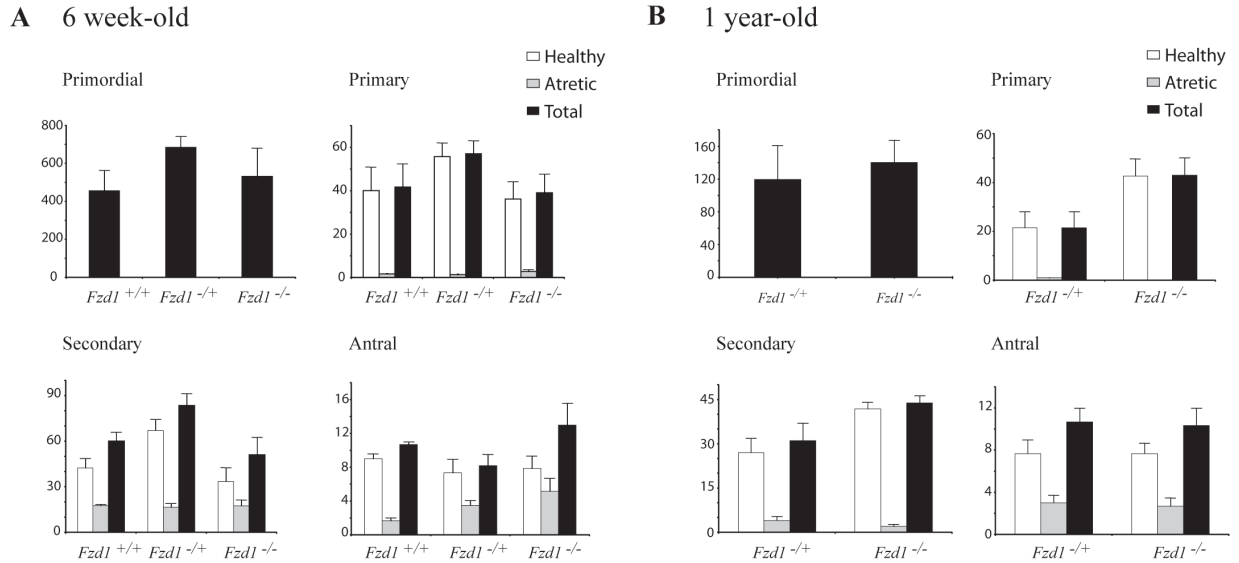


Figure 4: Quantitative analysis of ovarian follicles in peri-pubertal and one year-old mice. Ovaries from 6 week-old (A) and 1 year-old mice (B) of the indicated genotypes were serially sectioned, and all follicles from every fifth (1 year-old) or seventh (6 week-old) section were counted and categorized as primordial, primary, secondary or antral and scored as healthy or atretic. At each age, one ovary (left) from each *Fzd1*^{-/-} mouse was evaluated and compared to controls (*Fzd1*^{+/+} and *Fzd1*^{-/+} for 6 week-old; *Fzd1*^{-/+} for 1 year-old, n=5-6 ovaries per genotype). Data represent raw follicle count numbers and were not adjusted to estimate the total ovarian follicle population. All data are expressed as means \pm SEM (columns and error bars).

FIG. 5

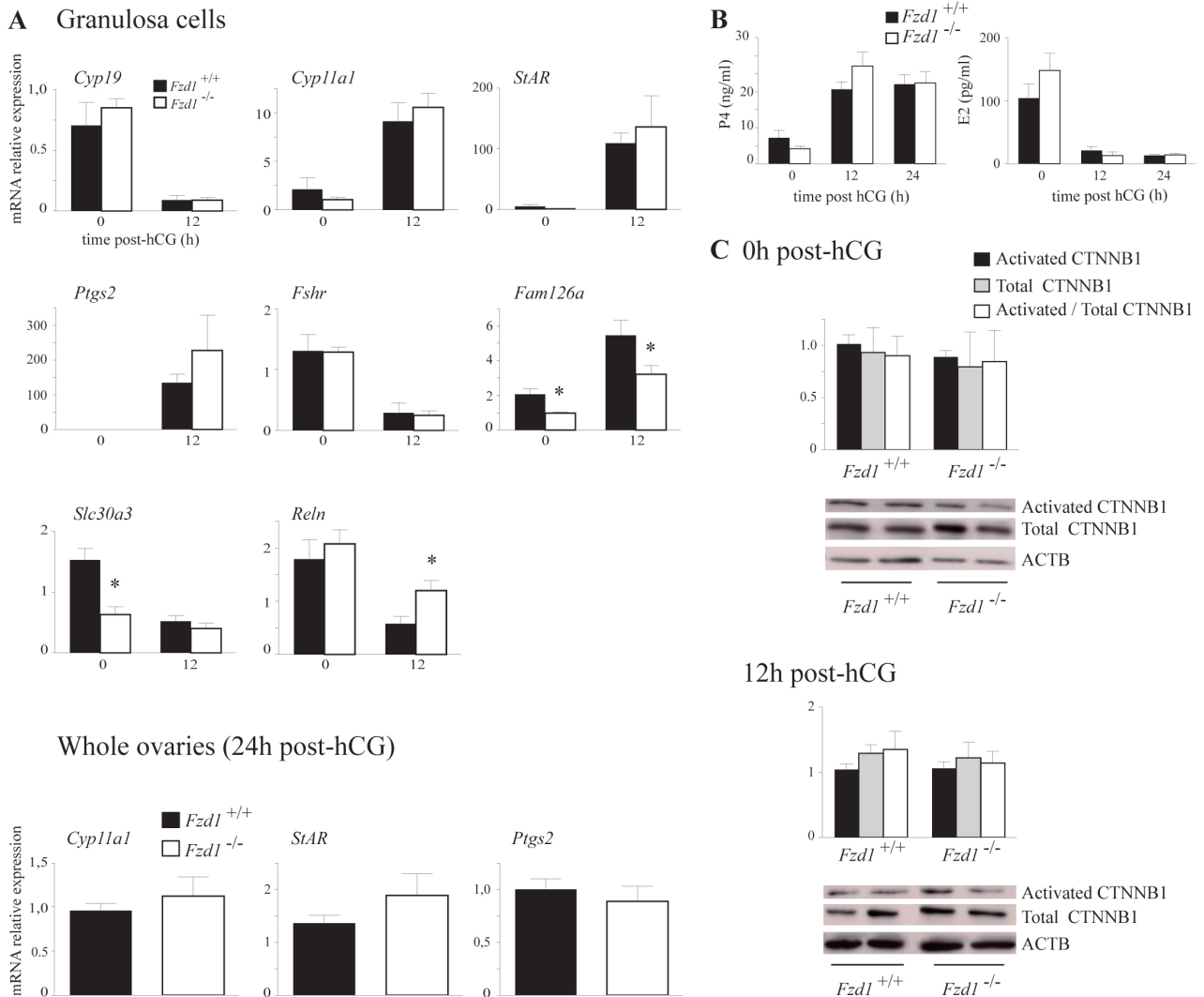
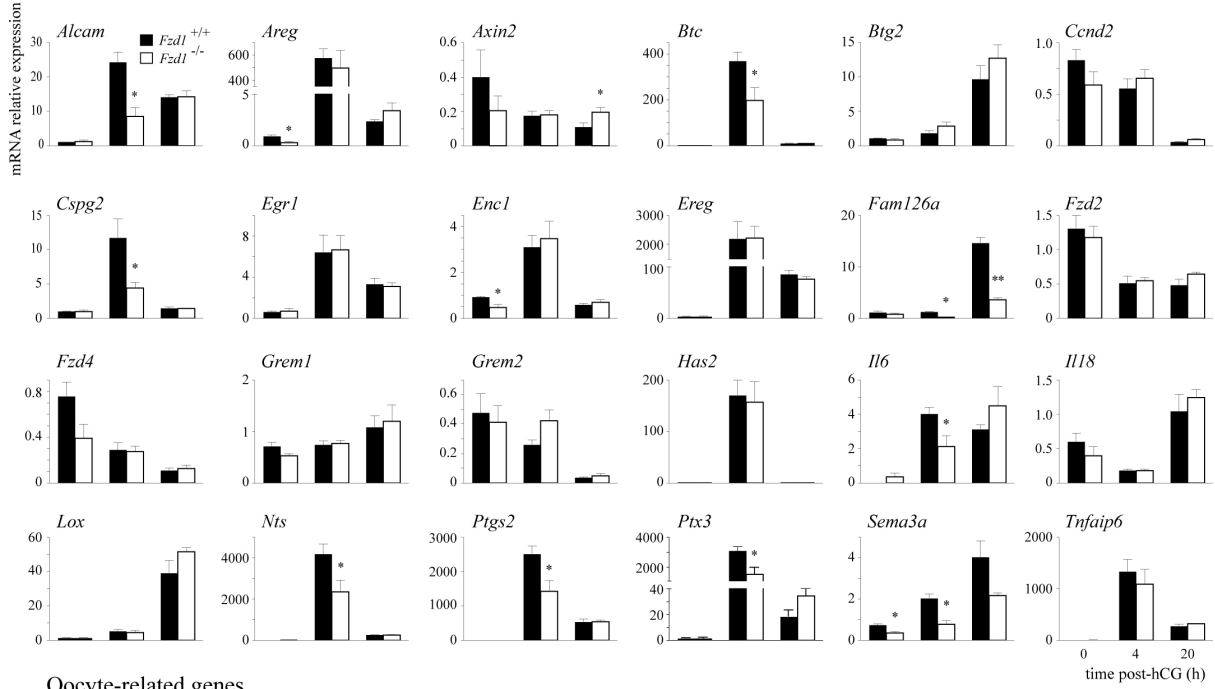


Figure 5 : *In vivo* analysis of ovarian gene expression in *Fzd1*^{-/-} mice. A) Quantitative RT-PCR analysis of known *Wnt4*-regulated genes and *Fzd1*-regulated genes identified by microarray analysis. Analyses were performed on RNA isolated from granulosa cells or whole ovaries from immature eCG-treated mice of the indicated genotypes, without or 12h (granulosa cells) or 24h (whole ovaries) after the administration of an ovulatory dose of hCG. For all analyses, n=5-6 animals/genotype/timepoint. B) Serum progesterone (P4) and estradiol (E2) levels in mice of the indicated genotypes. Samples were taken from immature, eCG-treated mice either without or 12 or 24h after the administration of an ovulatory dose of hCG. n=11-27 animals/genotype/timepoint.

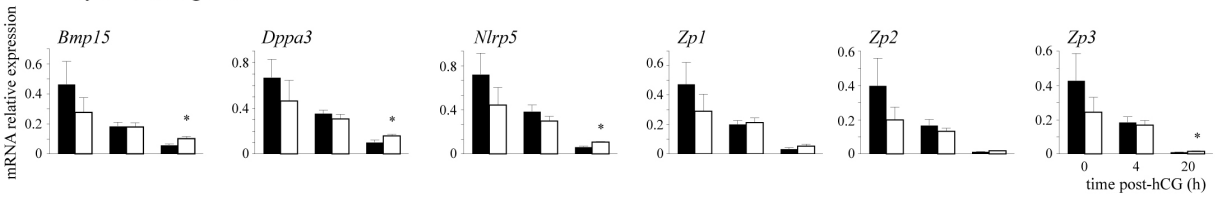
C) Western blot analysis of activated and total CTNNB1 in protein extracts from granulosa cells collected from immature eCG-treated mice of the indicated genotypes without or 12h after the administration of an ovulatory dose of hCG. ACTB (β -actin) was used as a loading control and quantification of protein expression was done by densitometric analysis. The ratios of protein expression levels to ACTB and the ratios of activated to total CTNNB1 are illustrated. n=3-5 animals/genotype/timepoint and the experiment was repeated three times with similar results. Representative blots (n=2 animals/genotype/timepoint) are shown below the graphs. All data are expressed as means \pm SEM (columns and error bars). * $=P<0.05$.

FIG. 6

A Cumulus-related genes



Oocyte-related genes



B

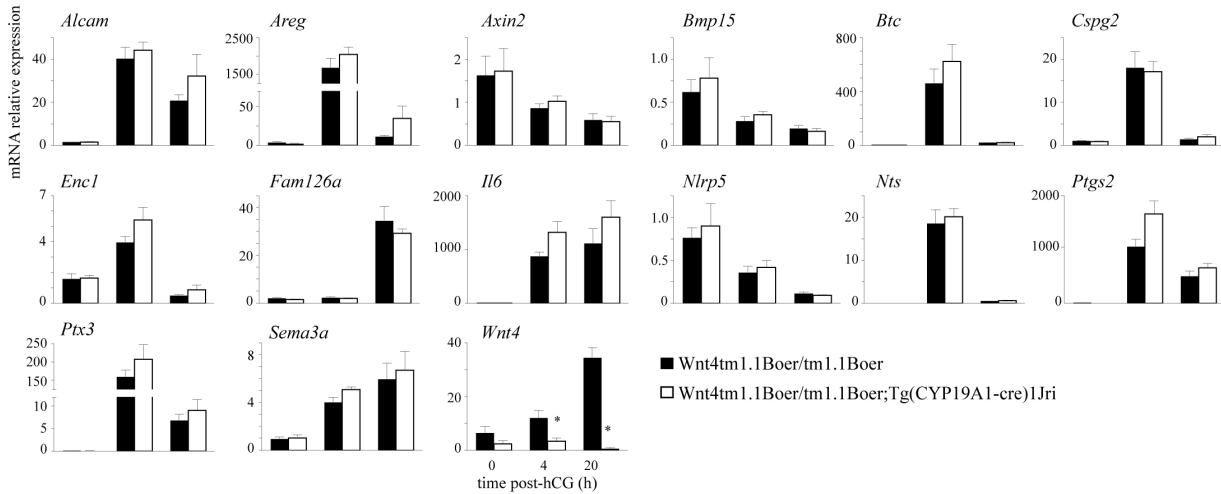


Figure 6 : Regulation of COC gene expression by FZD1 but not by WNT4. A) Quantitative RT-PCR analysis of genes expressed in cumulus cells or oocytes whose expression is known to be regulated during COC expansion, in COCs from *Fzd1*^{-/-} mice and controls. B) COC genes whose expression was altered in *Fzd1*^{-/-} mice were analyzed by quantitative RT-PCR in *Wnt4*^{tm1.1Boer/tm1.1Boer};Tg(*CYP19A1-cre*)1Jri and relevant control mice. For all RT-PCR analyses, n=5 samples/genotype/time point, and each sample represents a pool of cells collected from 2-5 animals. All data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19* and are expressed as means ± SEM (columns and error bars). *=P<0.05, **=P<0.01.

FIG. 7

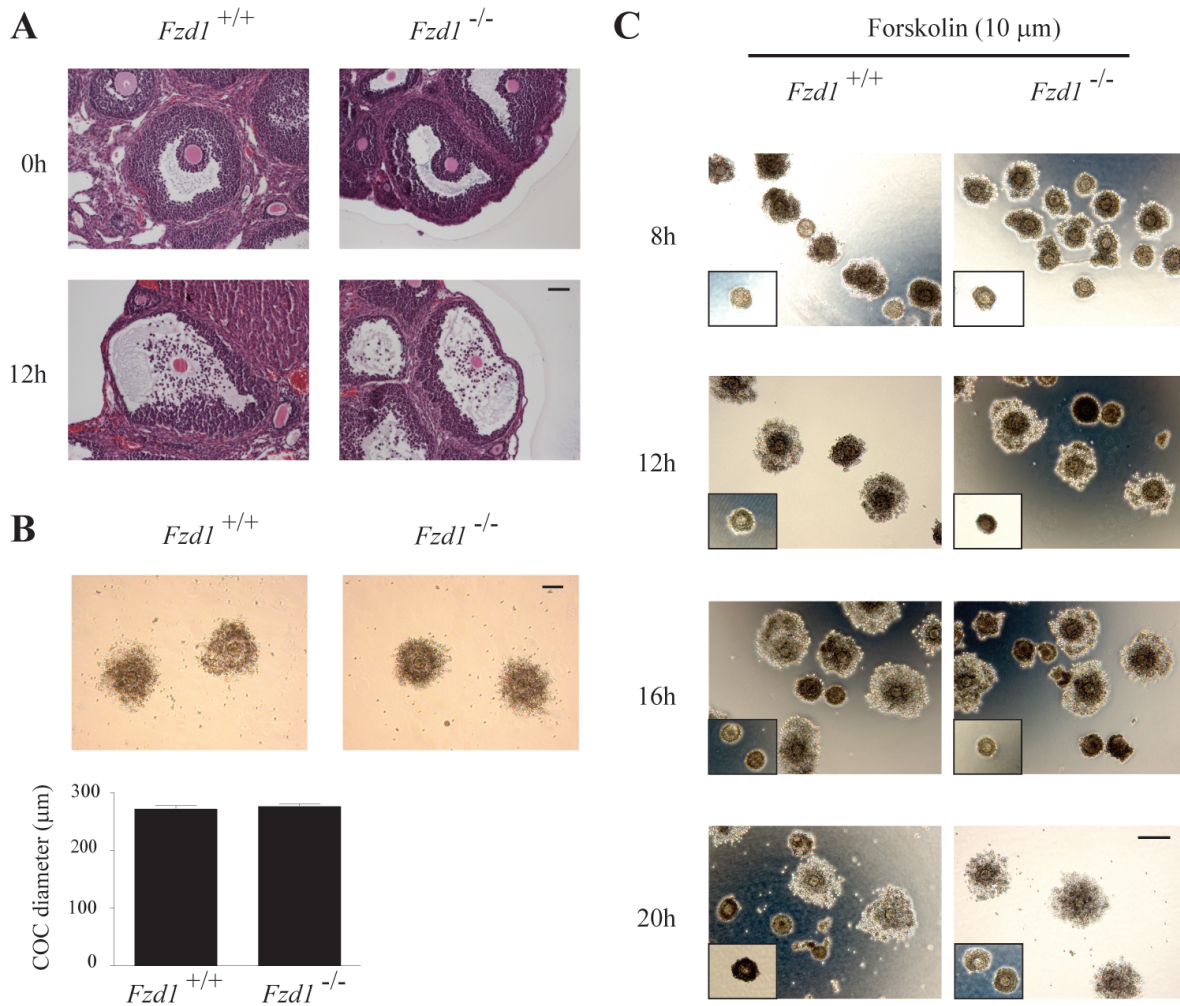


Figure 7 : Cumulus expansion is not altered in *Fzdl*^{-/-} mice. A) Histological analysis of *Fzdl*^{-/-} ovaries and controls collected from immature, eCG-treated mice either without or 12h after the administration of an ovulatory dose of hCG. COCs from both genotypes were similarly expanded at 12h post-hCG, bar=50 μm . B) Photomicrographs and diameter measurements of COCs collected by flushing the oviducts of immature eCG-treated mice of the indicated genotypes 20h after the administration of an ovulatory dose of hCG. n=15-19 COCs per genotype, bar=100 μm . Data are expressed as means \pm SEM (columns and error bars). C) An *in vitro* COC expansion assay did not reveal any differences in the rate or the extent of expansion between the two genotypes at 8, 12, 16 and 20h after the addition of forskolin. Insets are representative scaled pictures of unexpanded COCs in an untreated control group, bar=100 μm .

2.9 TABLES

TABLE 1: Oligonucleotides for RT-PCR analysis.

Primer name	Sequence (5' to 3')
<i>Alcam</i> -S	GGCGGCTTCAACGACCATCACA
<i>Alcam</i> -AS	TCCACACCACAGTCGCGTTCCT
<i>Areg</i> -S	CTCGCAGCTATTGGCATCGGCA
<i>Areg</i> -AS	TGGCATGCACAGTCCCGTTT
<i>Axin2</i> -S	CCACTTCAAGGAGCAGCTCAGCA
<i>Axin2</i> -AS	TACCCAGGCTCCTGGAGACTGA
<i>Bmp15</i> -S	GGTAAAGCCGTCGGCCAACACA
<i>Bmp15</i> -AS	ATGGCGGTAAACCACAGTGGCT
<i>Btc</i> -S	CTTGCCCTGGGTCTTGCAAT
<i>Btc</i> -AS	GAGGGAGTTTGCTCGTCCAC
<i>Btg2</i> -S	GCGTGAGCGAGCAGAGACTCAA
<i>Btg2</i> -AS	GCCACCTTGCTGATGATGGGGT
<i>Cnd2</i> -S	ACTTCAAGTTTGCCATGTACC
<i>Cnd2</i> -AS	CTGTTTCAGCAGCAGAGCTTCG
<i>Cspg2</i> -S	ACCAGACATGCTTCCCTCTCCCT
<i>Cspg2</i> -AS	TGGGTGATGAAGTTTCTGCGAGGA
<i>Cyp11a1</i> -S	GTGACCTTGCAGAGGTACACTGT
<i>Cyp11a1</i> -AS	GTGACTCCAGCCTTCAGTTCACA
<i>Cyp19</i> -S	CTGAACATCGGAAGAATGCACAG
<i>Cyp19</i> -AS	GAGTAGATAGGCCACACTTCTTC
<i>Dppa3</i> -S	GGGTCCGCACTTTGTTGTCCGT
<i>Dppa3</i> -AS	TCTGAATGGCTCACTGTCCCGT
<i>Egr1</i> -S	CCTTCAATCCTCAAGGGGAGCCGA
<i>Egr1</i> -AS	AGGTGATGGGAGGCAACCGAGT

<i>Enc1-S</i>	ACTGCATTCGTCAGCACCTGGA
<i>Enc1-AS</i>	TGACATCTCATCTCGCCGTGCA
<i>Ereg-S</i>	ACGTTGCGTTGACAGTGATTCTCAT
<i>Ereg-AS</i>	GGTCCCCTGAGGTCCTCTCTCAT
<i>Fam126a-S</i>	GCTTCACTCTGCAGTTCCTCCC
<i>Fam126a-AS</i>	ACTCTCCGTCAGCGCCATAG
<i>Fshr-S</i>	GTCATGCTCATTGAGGCCAGCCT
<i>Fshr-AS</i>	TTGGCTTGTGGTCAGGACCACCA
<i>Fzd1-S</i>	TTATGCCATCCCTTGCCCTCACC
<i>Fzd1-AS</i>	GGTAAGCCTCGTGTAGAACTTCC
<i>Fzd2-S</i>	AGTTCCACGGGGAGAAGGGCAT
<i>Fzd2-AS</i>	ATGTCCGTGCACAGCGGGAT
<i>Fzd4-S</i>	GCAGCTGACAACCTTTCACGCCG
<i>Fzd4-AS</i>	CTGAAAGGCACATGCCACCGCA
<i>Grem1-S</i>	GCCACTCGTCCACAGCGAAGAA
<i>Grem1-AS</i>	AGGCGGAATGGCTCCTTGGGAA
<i>Grem2-S</i>	AGGAGAGGGACAGGGAGACACACA
<i>Grem2-AS</i>	GCCGGTTCTTCCGTGTTTCAGCT
<i>Has2-S</i>	CTATGGTTGGAGGTGTTGGAGGA
<i>Has2-AS</i>	GACTTGATGAGACCCACTAGCTG
<i>Il6-S</i>	AGACAAAGCCAGAGTCCTTCAGAGA
<i>Il6-AS</i>	TAGCCACTCCTTCTGTGACTCCAGC
<i>Il18-S</i>	TCGTTGACAAAAGACAGCCTGTGT
<i>Il18-AS</i>	CCTTCACAGAGAGGGTCACAGCCA
<i>Lox-S</i>	TACAACCTGAGATGCGCTGCGG
<i>Lox-AS</i>	GGCGGCTTGGTAAGAAGTCCGAT
<i>Nlrp5-S</i>	TGCTCTGCGTTCCAATGCCCT
<i>Nlrp5-AS</i>	TCACCACGTGGGGCTTGACA
<i>Nts-S</i>	AGCAGGGCCTTTCAACACTGGG

<i>Nts</i> -AS	AACCCCTCTTGAGAATGTAGGGCCT
<i>Ptgs2</i> -S	TCCCCTTCCTGCGAAGTTTA
<i>Ptgs2</i> -AS	TAGAAGAACCTTTTCCAGCACTTC
<i>Ptx3</i> -S	TAGGCGCTGTGCTGGAGGAACT
<i>Ptx3</i> -AS	TGGTCTCACAGGATGCACGCTT
<i>Reln</i> -S	TGACCCGGGCTACTCTGGGC
<i>Reln</i> -AS	AGACGGCTTCCCACCGCTCA
<i>Rpl19</i> -S	CTGAAGGTCAAAGGGAATGTG
<i>Rpl19</i> -AS	GGACAGAGTCTTGATGATCTC
<i>Sema3a</i> -S	CCAGAGCAAACCTATGCAAACGGA
<i>Sema3a</i> -AS	TCCAGAAGGAAGGTGTGGTAAC
<i>Sfrp4</i> -S	CATCGAACAGTATGAAGAGCTAGT
<i>Sfrp4</i> -AS	AGGGCTCAGACGTTTACAGTCA
<i>Slc30a3</i> -S	CCCGCCTAGTGAGTGCCCGA
<i>Slc30a3</i> -AS	GAGGCACGGGGTCCTTGTGG
<i>StAR</i> -S	GATTAAGGCACCAAGCTGTGCTG
<i>StAR</i> -AS	CTGCTGGCTTTCCTTCTTCCAGC
<i>Tnfaip6</i> -S	TGAAGGTGGTCGTCTCGCAACC
<i>Tnfaip6</i> -AS	TCCACAGTTGGGCCAGGTTTCA
<i>Wnt4</i> -S	AGCTGTCATCGGTGGGCAGCAT
<i>Wnt4</i> -AS	ACTGTCCGGTCACAGCCACACT
<i>Zp1</i> -S	GCCCTGGGAATTGACTGAGCTGGA
<i>Zp1</i> -AS	ACTGTCATAGCAGCAGCCAGCCT
<i>Zp2</i> -S	GCCCTGCATCACTGAGGAGCAA
<i>Zp2</i> -AS	TCAGAGCTGCTGGGGTCAACAC
<i>Zp3</i> -S	AGTTTCTCGAAACCGCAGGCAC
<i>Zp3</i> -AS	AGCAGTCCAGCCTTCCACAGTCT

TABLE 2: Mating trial.

	Controls	<i>Fzd1</i> ^{-/-}
n	9	7
Total litters	10.11 ± 0.89	10.86 ± 0.99
Total pups	79.56 ± 7.64	74.71 ± 8.05
Litter sizes	7.87 ± 0.26	6.90 ± 0.30 *

Total litters, total pups and litter sizes are expressed as means ± SEM.

* = means are significantly different (P < 0.05).

TABLE 3: Ovary weights.

	Controls	<i>Fzd1</i> ^{-/-}
6 weeks		
n	5	10
weight (mg)	6.82 ± 0.44	6.3 ± 0.35
28 weeks		
n	4	8
weight (mg)	8.91 ± 0.46	8.13 ± 0.43

Weights are expressed as means ± SEM.

TABLE 4: Microarray analysis of gene expression in granulosa cells from *Fzd1*^{-/-} mice.

Gene	Fold change (KO/WT)	P-value
Up-regulated in <i>Fzd1</i>^{-/-} mice		
<i>Sc4mol</i>	1.94	2.7E-8
<i>Zfp330</i>	1.90	0.007
<i>Reln</i>	1.84	2.98E-6
<i>Ptx3</i>	1.73	0.003
<i>Fhl1</i>	1.63	0.014
<i>Ankrd11</i>	1.57	0.031
<i>Cyp19</i>	1.56	0.039
<i>Mgst1</i>	1.55	0.004
Down-regulated in <i>Fzd1</i>^{-/-} mice		
<i>Slc30a3</i>	0.66	0.004
<i>Eno2</i>	0.66	0.012
<i>Pik3c2g</i>	0.58	0.004
<i>Mela</i>	0.45	3.56E-07
<i>Fam126a</i>	0.30	6.22E-15

Chapitre 3

3. Article 2

SFRP4 limits the LH-mediated induction of cumulus expansion genes by antagonizing non-canonical WNT signaling¹

Evelyne Lapointe², Charlène Rico², Marilène Paquet³, Francesco J DeMayo⁴
and Derek Boerboom^{2,4}

² Centre de Recherche en Reproduction Animale, Université de Montréal, Saint- Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6

³ Comparative Medicine & Animal Resources Centre and Goodman Cancer Research Centre, McGill University, Montreal, Québec, Canada, H3G 1Y6

⁴ Department of Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, 77030

¹ Supported by an operating grant from the Canadian Institutes of Health Research and the Canada Research Chair in Ovarian Molecular Biology and Functional Genomics. The University of Virginia Center for Research in Reproduction Ligand Assay and Analysis Core is supported by the National Institutes of Health NICHD (SCCPRR) Grant U54-HD28934.

⁶ Correspondence and current address: Derek Boerboom, Centre de Recherche en Reproduction Animale, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6.

Manuscrit en phase finale de préparation, pour être soumis au journal *Molecular Endocrinology*.

Contribution des auteurs : Ma contribution globale concerne le design expérimental, la conception et préparation des protocoles, l'exécution des manipulations, l'interprétation des résultats, la préparation des figures et l'écriture de l'article. Dans l'ensemble, ma contribution relative est de 90%. CR, MP et FJD ont contribué à l'exécution des manipulations et à l'interprétation des résultats. DB a dirigé le projet et a aidé à l'écriture de l'article.

3.1 ABSTRACT

Secreted Frizzled Related Proteins (SFRPs) are antagonists of WNT signaling that act by directly binding WNTs and preventing their interaction with FZD receptors. Following the luteinizing hormone (LH) surge, SFRP4 is induced in granulosa cells and in the corpus luteum and may have a role in ovulation, steroidogenesis and apoptosis. To study the physiological roles of SFRP4 in the ovary, *Sfrp4*-null mice were created by gene targeting. *Sfrp4* KO mice were slightly hyperfertile, producing ≈ 1 more pup per litter on average relative to controls, and were devoid of corpus luteum defects. Microarray and RT-PCR analyses of granulosa cells revealed that the expression of genes associated with COC expansion, including *Areg*, *Ereg*, *Il18* and *Tnfrsf6*, was increased in granulosa cells from *Sfrp4* KO mice, before and around the time of ovulation. Surprisingly, very few of these genes were also upregulated in the cumulus-oocyte complexes (COCs) from *Sfrp4* KO mice, suggesting that SFRP4 may act preferentially in granulosa cells to limit the LH/hCG-mediated induction of genes related to cumulus expansion. We found increased levels of phosphorylated JNK in granulosa cells from *Sfrp4* KO mice, suggesting that SFRP4 could act by antagonizing non-canonical WNT signaling. In agreement with this, we found that the non-canonical pathway agonists WNT4 and WNT5a are expressed in the ovary and upregulate *in vitro* the expression of many of the genes that are suppressed by SFRP4. Together, our data suggest that SFRP4 antagonizes the induction of cumulus expansion genes by suppressing the activity of non-canonical WNTs.

3.2 INTRODUCTION

The ovarian cycle is under the control of the pituitary gonadotropins FSH and LH, as well as a variety of essential intraovarian factors including molecules from the TGF- β family, steroid hormones, prostaglandins and many more [1]. Signaling pathways involving WNT proteins are now also believed to have a major role in the proper regulation of ovarian function. WNTs are secreted glycoproteins that act in an autocrine or paracrine manner to control a variety of processes such as cell proliferation, differentiation, and tumorigenesis

[2,3]. WNT signaling is initiated by the binding of a WNT protein to a receptor complex consisting of a seven transmembrane-spanning cell surface receptor of the Frizzled (FZD) family, and the lipoprotein-related receptor proteins LRP5 or LRP6 that serve as co-receptors. Upon their binding, WNTs can activate three distinct intracellular pathways known as the canonical (WNT/CTNNB1), planar cell polarity (PCP) and WNT/Ca²⁺ pathways. The activation of the canonical pathway permits the dissociation of CTNNB1 from a multiprotein complex consisting of axin, glycogen synthase kinase (GSK)3-β and adenomatous polyposis coli (APC) that normally causes CTNNB1 to be phosphorylated and subsequently degraded by the proteasome. Hypophosphorylated (and hence stabilized) CTNNB1 translocates to the nucleus where it can interact with a variety of transcription factors such as TCF/LEF [4], FOXO1 [5] or nuclear receptors [6,7] to modulate the transcription of target genes. The activation of the two non-canonical pathways triggers distinct molecular events that result in the activation of many effectors including c-Jun N-Terminal kinase (JNK) in the PCP pathway and protein kinase C (PKC), calcineurin and calcium/calmodulin-dependant kinase II (CaMKII) in the WNT/Ca²⁺ pathway [8].

Several components of the WNT signaling pathways have been found to have critical roles in the embryonic development of the gonad. WNT4, RSPO1 and CTNNB1 are essential for female sex determination, and act by controlling female somatic cell differentiation, germ cell commitment to meiosis, gonadal cell migration and sorting, and sex-specific vasculogenesis [9-19]. In addition to its functions during embryogenesis, a growing body of evidence now indicates that WNT signaling plays multiple important roles in the adult ovary as well. For instance, *Wnt4* inactivation in granulosa cells in the *Wnt4*^{tm1.1Boer/-}; *Amhr2*^{tm3(cre)Bhr/+} model resulted in reduced fertility linked to inadequate antral follicle development [20]. Moreover, *in vivo* and *in vitro* experiments demonstrated that WNT4 regulates the expression of the steroidogenic enzymes *Star*, *Cyp19a1* and *Cyp11a1*, and *Wnt4*^{tm1.1Boer/-}; *Amhr2*^{tm3(cre)Bhr/+} mice consequently had reduced circulating progesterone levels. WNT2 has also been shown to positively regulate proliferation in cultured granulosa cells [21]. Whether or not these WNTs modulate their signal via the canonical pathway in granulosa cells has not yet been determined. Although WNT2 appears to enable the stabilization and subsequent translocation

of CTNNB1 to the nucleus, how it impacts gene transcription is still unclear, as no CTNNB1/TCF-dependent transcriptional activity was detected following the overexpression of WNT2 in a rat granulosa cell line [21,22]. However, many other studies support the idea that CTNNB1 plays important roles in the ovary, including the regulation of *Cyp19* and *Star* expression, FSH-induced estrogen synthesis, LH-stimulated progesterone secretion and preovulatory follicular development [23-26]. Little is known about the receptors necessary for the transduction of WNT signal in the ovary. To date, FZD4 and FZD1 have been shown to have roles in the adult ovary, and are required for the formation and function of the corpus luteum and the regulation of genes associated with cumulus expansion in the cumulus-oocyte complex (COC) [27,28].

The expression of an antagonist of WNT signaling, Secreted Frizzled Related Protein 4 (SFRP4), has been shown to be induced in granulosa cells and COCs at the time of ovulation, with sustained expression in the corpus luteum [29,30]. A study also suggested an association between SFRP4 and apoptosis in the rat corpus luteum [31]. SFRP4, with its Cystein Rich Domain (CRD) homologous to the putative ligand-binding domain of the FZD receptors, can bind to WNT proteins and consequently inhibit their capacity to signal through their FZD receptors [32]. Considering its regulated expression alongside WNT2 and WNT4 in granulosa cells [21,33], we hypothesized that SFRP4 has an important ovarian role and may serve to antagonize or modulate WNT signaling in the ovary. To test this hypothesis, we generated *Sfrp4* knockout mice and assessed their fertility, cumulus expansion, ovarian gene expression, apoptosis and downstream activation of CTNNB1.

3.3 MATERIALS AND METHODS

Gene targeting

A floxed *Sfrp4* allele (Fig. 2Ac) was created using a standard gene targeting approach. Briefly, a targeting construct was built using the pKOII vector [34] into which was inserted a modified genomic fragment containing the first exon of *Sfrp4* flanked by two loxP sites. An *EcoRI*

restriction site was also included for Southern blot screening of embryonic stem (ES) cell clones (Fig. 2Ab). All genomic sequences were cloned from R1 ES cell genomic DNA by PCR using the Expand Long Template PCR system (Roche Molecular Biochemicals, Laval, QC, Canada); LoxP and restriction sites were included in the primers used to amplify the genomic fragments. The targeting vector was linearized prior to electroporation into R1 ES cells. Clonal selection was achieved by growing the cells in a medium containing 400 µg/ml Geneticin (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) for 8-9 days. Selected colonies were cultured in triplicate, and duplicate sets were analyzed by Southern blotting to screen for proper homologous recombinants as previously described [35]. Two of 768 colonies screened showed a second band consistent with the expected size for the targeted allele (Fig. 2B). Both targeted cell lines were subsequently microinjected into blastocysts and transferred to pseudopregnant recipients according to standard protocols. Chimeric males derived from all cell lines sired pups heterozygous for the targeted allele.

Animal model

To generate a null *Sfrp4* allele (Fig. 2Ad), *Sfrp4*^{fllox/+} mice were mated to the Tg(CMV-cre)1Cgn/J “cre deleter” strain (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), which expresses Cre in all tissues including the germline. After PCR verification of the *Sfrp4* allele (Fig. 2D), the Cre transgene was eliminated from *Sfrp4*^{+/-}; Tg(CMV-cre)1Cgn/J mice in the following generation by mating to C57BL/6J wild-type mice (The Jackson Laboratory). *Sfrp4*-null mice were then obtained by backcrossing *Sfrp4*^{+/-} mice (Fig. 2E). Genotyping analyses were performed by PCR on DNA obtained from tail biopsies, using the oligonucleotide primers 5'-AACAAATGAGCTCTACCCCTCTGT -3' (*Sfrp4* genotype S), 5'-CTCCCCGCACCACACACTGA-3' (*Sfrp4* genotype AS) and 5'-TAGGAACTTCAATTCCCCGCAAGA-3'(KOII loxP/flip) using the following PCR conditions; 1 min at 95°C for 1 cycle, 45 sec at 95°C, 45 sec at 63°C and 1 min at 72°C for 35 cycles, and 7 min at 72°C for 1 cycle (Fig. 2C). Primers were designed to generate PCR products of ~249 bp for the wild-type *Sfrp4* allele, ~289 bp for the floxed allele, and ~143 bp for the knockout (i.e., Cre-recombined) allele (Fig. 2C-E). All animal procedures were

approved by the institutional animal care and use committee and conformed to the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as promulgated by the Society for the Study of Reproduction.

Mating trial

The mating trial was conducted using 8 week-old *Sfrp4*^{-/-} (n=6) and control littermate *Sfrp4*^{+/-} or *Sfrp4*^{+/+} (n=8) female mice. Adult C57BL/6J males were placed in the cages for 12 months and the experiment terminated 22 days after their removal to allow for the final litter. Males were changed after 6 months to avoid a possible decline in fertility.

Tissue collection

Ovaries, granulosa cells and COCs were obtained from 23 to 26 day-old mice 48h following treatment with eCG (5 IU i.p., Folligon; Intervet, Whitby, ON, Canada), and with or without the subsequent administration of an ovulatory dose of hCG (5 IU i.p., Chorulon; Intervet). Intact ovaries were frozen at -80°C until the time of RNA extraction. Ovaries from pregnant mice were collected from females that were sacrificed 14 days after mating. Ovaries from mice obtained 0, 2, 4, 6, 8, or 10h post-hCG were placed in HBSS and punctured to release granulosa cells and COCs as previously described [36]. COCs were then isolated from granulosa cells by pipette, pooled, centrifuged at 1000g and frozen at -80°C until RNA extraction. For *in vivo* gene expression analysis of COCs at 20h post hCG, oviducts were dissected, placed in HBSS and flushed to release their contents. COCs were collected by pipette, pooled, and frozen at -80°C until RNA extraction. COCs isolated at 12h post-hCG were collected by both methods (ovary puncture + oviduct flushing) as not all follicles had ovulated at that time. COC diameters were calculated as the means of 4 separate measurements/COC.

Real-time RT-PCR and microarray analyses

RNA from whole ovaries, granulosa cells and COCs was purified using the RNeasy mini kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). RT-PCR analyses were done using the SuperScript® Vilo™ cDNA synthesis kit (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) and Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Streetsville, Ontario, Canada) with the primers listed in Supplemental Table 1. These analyses were conducted on an ABI Prism 7300 instrument, and gene expression was normalized to the reporter gene *Rpl19*. RT-PCR data obtained with this method were presented as fold increases in gene expression relative to a reference sample for each gene analyzed.

Microarray analyses were done using triplicate RNA samples from granulosa cells collected from *Sfrp4*^{-/-} and *Sfrp4*^{+/+} mice treated with eCG for 48h and with hCG for 12h, as described above. GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) were used, and all steps of RNA quality control, probe synthesis, hybridization, washing and array scanning were done by the McGill University Génome Québec Innovation Center (Montréal, Qc, Canada). Microarray data were analyzed using FlexArray 1.6.1 software (Génome Québec). Data from both genotypes were processed using Affymetrix Power Tool (APT) followed by a *t*-test. A P-value threshold of 0.05 and 1.5-fold change cut-off value were used for identification of differentially expressed genes.

TUNEL

Ovaries from eCG primed mice were collected 24h, 48h, 5d and 7d following hCG treatment. Samples were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin and serial sections were prepared at a thickness of 7 µm. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) assays was performed using the In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche) as directed by the manufacturer. Slides were mounted using VectaShield with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Labs, Burlingame, CA).

Immunoblotting

Frozen granulosa cells, collected as described above, were lysed in SDS loading buffer (50mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 1% β -Mercaptoethanol, 12.5 mM EDTA and 0.02% bromophenol blue). Samples (one sample corresponding to half of the granulosa cells recovered from an ovary) were resolved on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and transferred to Hybond-P PVDF membranes (GE Amersham, Piscataway, NJ). The membranes were then probed with antibodies against active CTNNB1, total CTNNB1 (Cell Signaling, Danvers, MA) and ACTB (Santa Cruz, Santa Cruz, CA) diluted in 5% BSA. Following incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary anti-rabbit antibody (GE Amersham), the protein bands were visualized by chemiluminescence using the ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Amersham). Bands were then quantified using a Vilber Lourmat Fusion Fx chemiluminescence detection system (Montreal Biotech Inc., Kirkland, Canada).

Steroid hormone measurement

Estradiol (E2) and progesterone (P4) levels were determined by Calbiotech ELISA and radioimmunoassay, respectively. All assays were performed by the ligand assay and analysis core laboratory of the University of Virginia (Charlottesville, Virginia, USA).

Granulosa cell culture

Ovaries from immature mice treated for 48 hours with eCG were placed and punctured in a dish containing defined granulosa cell culture media (MEM, 25 mM HEPES, 0.25 mM sodium pyruvate, 3 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (Invitrogen)). The punctured ovaries were discarded and the remaining granulosa cells were pooled and centrifuged for 5 minutes at 1000g. Granulosa cells were then plated in separate wells of a 24-well plate (each well received the granulosa cells recovered from \sim 0.7 ovary) in 200 μ l of defined granulosa cell medium with or without 60ng/ml of WNT4, 0.5 μ g/ml of WNT5a or 1.5 μ g/ml of WNT11 (R and D Systems, Minneapolis, MN, USA) for 1 hour. Medium was

carefully removed, 350 µl of lysis buffer from the RNeasy mini kit was added to each well and RNA extraction was done following the manufacturer's instructions.

Statistical analyses

Effects of genotype on total pups, total litters, litter sizes, ovary weights, and mRNA, protein and steroid hormone levels were analyzed by unpaired *t*-tests. Effects of hCG on *Sfrp4*, *Wnt4*, *Wnt5a* and *Wnt11* expression in both granulosa cells and COCs were analyzed by one-way ANOVA. Log transformation of data was performed before statistical analysis when unequal variances were detected using Bartlett's test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Analyses were done using Prism 4.0a (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) software.

3.4 RESULTS

Sfrp4 and Wnt expression is regulated by hCG in granulosa cells and COCs

Our previous work identified the requirement for WNT4 for normal follicular development, ovarian steroidogenesis and female fertility in mice [20] and the role of FZD1 in the regulation of genes associated with cumulus expansion in the COC [28]. To identify additional ovarian WNT signaling effectors, we first searched available databases and literature describing the ovarian expression of WNT pathway components. SFRP4, an antagonist of WNT signaling, has been shown to be strongly expressed in granulosa cells, in COCs and in the corpus luteum following hCG stimulation [29,30]. Moreover, it has been suggested that SFRP4 could mediate apoptosis in follicle cells, as it has been shown in other cell types [31,37,38]. Our studies of *Sfrp4* expression in immature mouse ovarian granulosa cells demonstrated a significant induction of *Sfrp4* expression 2h post-hCG, with maximal levels attained at the time of ovulation (12h) (Fig. 1A).

Our previous study showed that the abrogation of *Fzd1* expression did not alter levels of hypophosphorylated (i.e., activated) CTNNB1 in granulosa cells from peri-ovulatory

follicles, suggesting that FZD1 may serve as the receptor for an unidentified non-canonical WNT ligand(s) [28]. We therefore analyzed the expression of two WNTs identified as being non-canonical pathway agonists, WNT5a and WNT11, in immature mouse ovarian granulosa cells following hCG treatment (Fig. 1A). *Wnt11* expression was highly induced 2h post-hCG followed by a decrease to basal levels at 6h post-hCG. *Wnt5a* expression was found to be expressed at high but unvarying levels in granulosa cells of hCG-treated mice. We also analyzed *Wnt4* expression, as it has been shown to signal via non-canonical pathways in certain contexts [39,40]. Its expression closely mimicked that of *Sfrp4*, except with a short delay in its induction, starting at 4h instead of 2h post-hCG. These data suggest that SFRP4 could serve to antagonize WNT4, WNT5a and/or WNT11 activity in preovulatory granulosa cells.

Since *Sfrp4* was previously shown to be induced by hCG in COCs [30], we next analyzed its expression during *in vivo* cumulus expansion and compared it to that of *Wnt4*, *Wnt5a* and *Wnt11* (Fig. 1B). The time points chosen for the analysis reflects different stages of COC: unexpanded (0h), the beginning of expansion (4h), ovulation (12h) and the released COC once it is in the oviduct (20h). We found that *Sfrp4* expression is significantly induced by hCG and that it reaches maximal levels at 4h and 20h post-hCG. Contrary to its expression in granulosa cells, *Wnt5* is significantly induced by hCG in COCs at 20h post-hCG. *Wnt4* induction started at 12h post-hCG and its expression was highest at 20h, whereas *Wnt11* expression was induced at 4h and 12h but returned to basal levels in the ovulated COC. Therefore, as for granulosa cells, these data suggest that SFRP4 could functionally be related to WNT4, WNT11 and possibly WNT5a in COCs.

SFRP4 suppresses the expression of genes involved in cumulus expansion in granulosa cells

To study the physiological functions of *Sfrp4*, we performed conditional gene targeting using a standard approach (Fig. 2). *Sfrp4*-null mice were found to be viable, healthy, and otherwise indistinguishable from their wild-type littermates, and male mice were fertile (data

not shown), confirming the results of a recent study [41]. To assess the fertility of female *Sfrp4*-null mice, 8 week-old females were individually housed with fertile wild-type males for a period of 12 months, and litter frequency and size were recorded. Whereas *Sfrp4*^{-/-} females produced a normal number of litters, their average litter size was ≈1 pup bigger (P < 0.05) than that of controls (Table 1), indicating that *Sfrp4* serves as a negative regulator of female fertility.

WNT4 was previously shown to regulate the expression of various granulosa cell genes, including *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp19*, *Ptgs2*, and *Fshr* [20]. To verify if the expression of these or other genes was altered in *Sfrp4*^{-/-} ovaries, granulosa cells were isolated from immature *Sfrp4*^{-/-} and control mice 12h post-hCG, and mRNA from these cells was used for microarray analyses. These analyses identified differentially expressed genes, with 112 being at least 1.5-fold up- or down-regulated in cells from *Sfrp4*^{-/-} mice (Supplemental Table 2). Real-time RT-PCR studies conducted using granulosa cell mRNA samples collected on a post-hCG timecourse were done to validate the microarray data, as well as to determine when changes in gene expression occurred following hCG stimulation. These analyses confirmed the differential expression of several genes identified by microarray (Fig. 3A and not shown), including *Areg*, *Btg2*, *Egr1*, *Ereg*, *Grem2*, *Il18*, *Nts*, *Tgfb1* and *Tnfaip6*, many of which have been associated with the process of cumulus expansion [42-44]. The expression of these genes was up-regulated in granulosa cells from *Sfrp4*^{-/-} mice at various times following hCG treatment, but mainly at 12h post-hCG.

The microarray analysis did not identify any of the aforementioned WNT4-induced ovarian genes. We therefore performed real-time RT-PCR studies specifically on these genes to detect subtle differential expression between *Sfrp4* WT and KO granulosa cells that could have been missed during the genome-wide analysis. We found that *Ptgs2* was up-regulated in granulosa cells of *Sfrp4* KO mice, whereas the expression of the other known WNT4-induced ovarian genes, namely *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp19* and *Fshr*, was not significantly altered (Fig. 3A and not shown). These results suggest that SFRP4, unlike WNT4, is unlikely to regulate steroidogenesis, but rather is necessary to suppress genes associated with cumulus expansion near the time of ovulation.

We next sought to identify the mechanism whereby SFRP4 regulates the expression of genes associated with COC expansion. We therefore determined if either the canonical (CTNNB1) or the non-canonical PCP pathways were abnormally activated in the granulosa cells of *Sfrp4*-null mice. We chose to analyze granulosa cells 12h after hCG treatment, since the majority of altered gene expression was found at that time point (Fig. 3A). Results showed comparable levels of total and activated CTNNB1 proteins in *Sfrp4*-null and wild-type mice (Fig. 3B), suggesting that WNT/CTNNB1 pathway signaling activity in granulosa cells was not altered by the loss of *Sfrp4*, at least not at the level (or upstream) of CTNNB1. Unexpectedly, results showed a significant increase in the levels of both phosphorylated and total SAPK/JNK proteins in granulosa cells of *Sfrp4* KO mice (Fig. 3C). It is unclear if this was indicative of increased PCP pathway activity, as this would normally result in the enhancement of the phosphorylation of SAPK/JNK causing an increase of the phosphorylated to total SAPK/JNK ratio, which was not altered in *Sfrp4*-depleted granulosa cells.

The expression of genes related to cumulus expansion is not greatly altered in COCs of Sfrp4-null mice

As genes that were up-regulated in granulosa cells of *Sfrp4* null mice are involved in cumulus expansion, we decided to compare gene expression in COCs from *Sfrp4* null and WT mice at different times following hCG treatment. Surprisingly, of all the genes that were up-regulated in *Sfrp4*^{-/-} granulosa cells, only *Grem1*, *Grem2*, *Il18* and *Nts* were significantly up-regulated in *Sfrp4*^{-/-} COCs (Fig. 4A and not shown). To study the functional consequences of the slight alteration of COC gene expression *in vivo*, histological analyses of *Sfrp4*^{-/-} COCs from immature mice were done throughout hCG-induced ovulation. Cumulus expansion occurred in *Sfrp4*^{-/-} follicles to the same extent as in controls, without any obvious morphological differences (Fig. 4B and not shown). Interestingly, in COCs as well as in granulosa cells, inactivation of *Sfrp4* resulted in the over expression of *Sfrp2* (Figs 3A, 4A), suggesting that a compensatory mechanism occurs that could mitigate the effects of *Sfrp4* loss. Taken together, these results suggest that SFRP4 may act preferentially in granulosa cells to limit the LH/hCG-mediated induction of genes related to cumulus expansion.

Misregulation of ovarian genes in Sfrp4 KO mice does not result in altered steroidogenesis or apoptosis

Previous studies suggested that *Sfrp4* is expressed during luteinization and thus could serve to regulate steroidogenesis and/or apoptosis in the CL [29-31]. We therefore studied *Sfrp4* expression from whole ovaries from immature, eCG-primed mice treated or not with hCG for 12h, 24h and 48h, as well as d14.5 pregnant mice. Our analysis confirmed that *Sfrp4* expression is induced following hCG treatment, that it is maintained in the functional CL at 48h post-hCG and that it attains its maximal level during gestation (Fig. 5A).

To determine if SFRP4 has an important function in the CL, we first performed histological analyses on ovaries of *Sfrp4* KO mice and controls at 48h post hCG and found no morphological defects in the absence of SFRP4 (Figure 5B). We then studied the expression of specific genes that are essential for CL formation and function in whole ovaries from *Sfrp4* KO and control mice, at different times following hCG treatment (Fig. 5C). While the expression of *Cdkn1b*, an important player in CL formation [45], was unaltered in *Sfrp4* KO mice, we found that many genes involved in steroidogenesis were upregulated in ovaries from *Sfrp4*-null mice. Indeed, *Star* expression was higher in *Sfrp4* null mice that were not stimulated with hCG, and *Cyp11a1* and *Wnt4* expression were higher in null mice following hCG stimulation. *Klf4*, which codes for a protein that could negatively regulate *Star* expression [46], was also found to be under expressed in ovaries of *Sfrp4* null mice 24h post-hCG. These data suggested that ovarian steroidogenesis could be increased in *Sfrp4* KO mice, either before or after hCG stimulation. We thus evaluated serum progesterone and estradiol levels and found no differences between *Sfrp4* KO and control mice, in non-stimulated and hCG stimulated mice (Fig. 5D), indicating that increased *Star* and *Cyp11a1* expression was not sufficient to result in altered serum steroid levels.

Since *Sfrp4* expression is high in the ovaries of pregnant mice, we next speculated that SFRP4 could serve to regulate steroidogenesis in the CL of pregnant mice, which is essential for the maintenance of gestation. However, we found that, except for *Wnt4*, there were no differences in the expression of steroidogenesis-related genes and accordingly no abnormalities in circulating progesterone and estradiol levels (Fig. 5D-E).

Previous studies suggested that SFRP4 could be implicated in apoptosis during ovulation or luteinization [29,31]. To verify this possibility, we examined the ovaries of *Sfrp4* WT and KO immature mice 24h, 48h, 5 day and 7 day following hCG injection. Histological observations revealed no obvious differences between genotypes at any of the studied time, suggesting that formation, maintenance and involution of the CL was normal in *Sfrp4* KO mice (data not shown). We next did a TUNEL assay to verify if apoptosis was altered when SFRP4 was absent. Results showed that the apoptosis in CL of *Sfrp4* KO mice occurred to a similar extent as in controls, i.e. at a low level in the functional CL (48h post-hCG) and at a high level in the regressing corpus luteum (day 5 post-hCG) (Figure 5F). These results suggest that SFRP4 is dispensable for proper involution of the CL and apoptosis of luteinized cells.

WNT4 and WNT5a regulate the expression of genes related to cumulus expansion in granulosa cells in vitro

As the hCG-regulated expression of *Wnt4* and *Wnt11* follows a similar pattern to that of *Sfrp4*, and because *Wnt5a* is expressed at high levels in periovulatory granulosa cells, we decided to conduct an *in vitro* experiment to verify if these WNTs could regulate the expression of genes related to cumulus expansion. After only one hour of treatment, results showed that the expression of many genes up-regulated *in vivo* in granulosa cells from *Sfrp4* KO mice were also induced by WNT5a; *Areg*, *Nts*, *Ptgs2* and *Tnfaip6* [Fig. 6]. WNT4 induced *Il18*, which was also up-regulated *in vivo* in granulosa cells from *Sfrp4* null mice. Other genes which were not found to be significantly differentially expressed in *Sfrp4* KO mice *in vivo* were also induced by WNT4 or WNT5a; *Btc*, *Il6*, *Lox*, *Ptx3*. WNT11 did not regulate any of the examined genes in our assay, suggesting that it does not have a role in the regulation of genes related to cumulus expansion. Our results indicate that WNT4 and WNT5a could be the WNT proteins responsible for the regulation of genes associated with cumulus expansion in granulosa cells whose activities are antagonized by SFRP4.

3.5 DISCUSSION

Whereas the physiological roles of WNTs in ovarian function are gradually being defined, little remains known of the mechanisms whereby their signals are regulated. Previous studies by our team demonstrated that WNT4 acts to regulate steroidogenesis and antral follicle development, and that *Fzd1* regulates genes associated with cumulus expansion in COCs [20,28]. In the latter study, the altered gene expression in the COCs of *Fzd1*-null mice occurred without any changes in the levels of activated CTNNB1, suggesting that yet unidentified WNT protein(s) may signal in the COC through a non-canonical pathway. In this report, we show that SFRP4 could serve to suppress the LH-regulated expression of genes related to cumulus expansion in granulosa cells. Although a recent study found *Sfrp4*-null mice to be fertile, albeit with a slightly but non-significantly reduced number of pups per litter, we rather found that *Sfrp4*-null mice had a significantly larger number of pups per litter [41]. The reason for this discrepancy, and indeed the precise explanation for our observed hyperfertility, are yet to be elucidated.

Interestingly, we found that the expression of genes regulating COC expansion was increased in granulosa cells from *Sfrp4* KO mice, before and around the time of ovulation. Moreover, the expression of these same genes seem to be less altered in COCs from *Sfrp4*-null mice throughout COC expansion. This suggests that SFRP4 could have a role in antagonizing genes expression of cumulus expansion related genes, preferentially in mural granulosa cells. Although the purpose of this regulatory activity is unclear, we speculate that SFRP4 may help to restrict the expression of cumulus expansion genes to the COC by blunting their LH/hCG-mediated induction in granulosa cells.

Since *Sfrp4* is expressed in the CL, we hypothesized that its loss could result in an altered expression of genes involved in postovulatory steroidogenesis. Our analyses showed that the expression of two main steroidogenic enzymes of the CL, namely *Cyp11a1* and *StAR*, were increased in the ovaries of *Sfrp4* KO mice. However, this did not result in any differences in serum progesterone and estradiol levels. One possible reason for this is that steroidogenesis could not be increased further because the activity of other enzymes

implicated in progesterone and estradiol biosynthesis, such as *Cyp19a1* or *Hsd3b2*, were not upregulated in the ovaries of *Sfrp4* KO mice, thereby limiting steroid synthesis. Also, even if *Sfrp4* is highly expressed in total ovaries of 14.5 day pregnant mice, we found no significant differences in the expression of genes related to steroidogenesis, aside from *Wnt4*, and no differences in circulating steroid levels. The lack of a CL phenotype in SFRP4-null mice is surprising, given its high expression. It is possible that another SFRP protein (most notably SFRP2, the expression of which is induced in the *Sfrp4*^{-/-} ovary) could compensate for SFRP4 loss, and therefore conceal the physiological role of SFRP4 in our knockout model. Further experiments using *Sfrp2*^{-/-};*Sfrp4*^{-/-} mice will be needed to demonstrate that such functional redundancy exists, and to understand the exact importance of *Sfrp4* in the regulation of steroidogenesis or other ovarian processes. One of the few published studies about SFRP4 in the ovary suggested that it may be implicated in apoptotic processes in the CL. Our observations showed that CL formation and involution are normal in *Sfrp4* KO mice. Moreover, TUNEL assays showed no differences in the extent or rate of apoptosis in the ovaries of *Sfrp4* KO mice compared to controls. Our study thus clearly demonstrates that *Sfrp4* is dispensable for CL formation and function.

One of the objectives of this study was to provide insight into the mechanism of action of SFRP4. The data presented herein shows that the loss of SFRP4 results in an up-regulation of genes associated with cumulus expansion in granulosa cells, suggesting a loss of inhibition of one more WNT proteins that are able to regulate these genes. We therefore sought to identify WNT protein(s) able to regulate the same genes that are up-regulated by the loss of SFRP4 *in vivo*. We chose to study the effects of WNT4, WNT5a and WNT11, since all three proteins were expressed in the ovary, with WNT4 and WNT11 being regulated by hCG in a manner similar to SFRP4. Our experiments showed that WNT5a, and to a lesser extent WNT4, could be candidates since their addition to cultured granulosa cells activated the transcription of many genes associated with cumulus expansion. Surprisingly, WNT11, which was shown to be markedly induced *in vivo* following hCG treatment, was not able to induce the transcription of any of the genes that we studied. Whether the *in vitro* assay conditions used were not optimal or whether WNT11 regulates another set of genes remains unknown.

Interestingly, WNT5a was able to induce cumulus-related genes in granulosa cells although its expression was not regulated by hCG in granulosa cells *in vivo*. This suggests that WNT5a activity could be controlled mainly by antagonists like SFRP4 and SFRP2 (or the availability of receptors like FZD1), rather than by the regulation of its expression.

Finally, we attempted to identify the signaling cascade(s) involved in SFRP4-mediated regulation of gene expression. We found that *in vivo* levels of activated CTNNB1 were not modulated in granulosa cells from *Sfrp4* KO mice while levels of both phosphorylated and total SAPK/JNK were increased, although the final ratio of phosphorylated to total SAPK/JNK was not changed. It is therefore possible that the absence of SFRP4 allows for the binding of a non-canonical WNT, such as WNT5a, to its receptor which in turn activates the PCP pathway resulting in the phosphorylation of SAPK/JNK and the subsequent transcription of target genes. JNK expression may then increase as a direct or indirect consequence of PCP activity. If true, this would represent the first evidence of non-canonical WNT signaling in the ovary.

In summary, we have determined that SFRP4 antagonizes the expression of genes related to cumulus expansion in granulosa cells. We also provide evidence that the non-canonical WNT5a could be one of the WNTs antagonized by SFRP4 in granulosa cells. Additional studies will be required to confirm the identity WNT(s) and signaling pathways regulated by SFRP4, and the possible redundant roles of SFRP2 and SFRP4 in the mammalian ovary.

3.6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Ms Meggie Girard for assistance with mouse colony management. The R1 embryonic stem cell line was provided by Dr Andras Nagy, Reka Nagy, Dr Janet Rossant and Dr Wanda Abramow-Newerly (University of Toronto).

3.7 REFERENCES

1. Binelli M, Murphy BD. Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22:1-12.
2. Nusse R, Fuerer C, Ching W, Harnish K, Logan C, Zeng A, ten Berge D, Kalani Y. Wnt signaling and stem cell control. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2008; 73:59-66.
3. Lustig B, Behrens J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129:199-221.
4. Boyer A, Goff AK, Boerboom D. WNT signaling in ovarian follicle biology and tumorigenesis. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21:25-32.
5. Essers MA, de Vries-Smits LM, Barker N, Polderman PE, Burgering BM, Korswagen HC. Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science* 2005; 308:1181-1184.
6. Salisbury TB, Binder AK, Nilson JH. Welcoming beta-catenin to the gonadotropin-releasing hormone transcriptional network in gonadotropes. *Mol Endocrinol* 2008; 22:1295-1303.
7. Mulholland DJ, Dedhar S, Coetzee GA, Nelson CC. Interaction of nuclear receptors with the Wnt/beta-catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know? *Endocr Rev* 2005; 26:898-915.
8. Sonderegger S, Pollheimer J, Knofler M. Wnt signalling in implantation, decidualisation and placental differentiation--review. *Placenta* 2010; 31:839-847.
9. Jaaskelainen M, Prunskaitė-Hyyryläinen R, Naillat F, Parviainen H, Anttonen M, Heikinheimo M, Liakka A, Ola R, Vainio S, Vaskivuo TE, Tapanainen JS. WNT4 is expressed in human fetal and adult ovaries and its signaling contributes to ovarian cell survival. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 317:106-111.
10. Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 1999; 397:405-409.
11. Jeays-Ward K, Hoyle C, Brennan J, Dandonneau M, Alldus G, Capel B, Swain A. Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad. *Development* 2003; 130:3663-3670.

12. Heikkila M, Peltoketo H, Leppaluoto J, Ilves M, Vuolteenaho O, Vainio S. Wnt-4 deficiency alters mouse adrenal cortex function, reducing aldosterone production. *Endocrinology* 2002; 143:4358-4365.
13. Yao HH, Matzuk MM, Jorgez CJ, Menke DB, Page DC, Swain A, Capel B. Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Dev Dyn* 2004; 230:210-215.
14. Liu CF, Parker K, Yao HH. WNT4/beta-catenin pathway maintains female germ cell survival by inhibiting activin betaB in the mouse fetal ovary. *PLoS One* 2010; 5:e10382.
15. Chassot AA, Ranc F, Gregoire EP, Roepers-Gajadien HL, Taketo MM, Camerino G, de Rooij DG, Schedl A, Chaboissier MC. Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum Mol Genet* 2008; 17:1264-1277.
16. Tomizuka K, Horikoshi K, Kitada R, Sugawara Y, Iba Y, Kojima A, Yoshitome A, Yamawaki K, Amagai M, Inoue A, Oshima T, Kakitani M. R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Hum Mol Genet* 2008; 17:1278-1291.
17. Chassot AA, Gregoire EP, Lavery R, Taketo MM, de Rooij DG, Adams IR, Chaboissier MC. RSPO1/beta-catenin signaling pathway regulates oogonia differentiation and entry into meiosis in the mouse fetal ovary. *PLoS One* 2011; 6:e25641.
18. Maatouk DM, DiNapoli L, Alvers A, Parker KL, Taketo MM, Capel B. Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum Mol Genet* 2008; 17:2949-2955.
19. Liu CF, Bingham N, Parker K, Yao HH. Sex-specific roles of beta-catenin in mouse gonadal development. *Hum Mol Genet* 2009; 18:405-417.
20. Boyer A, Lapointe E, Zheng X, Cowan RG, Li H, Quirk SM, DeMayo FJ, Richards JS, Boerboom D. WNT4 is required for normal ovarian follicle development and female fertility. *FASEB J* 2010; 24:3010-3025.
21. Wang HX, Li TY, Kidder GM. WNT2 regulates DNA synthesis in mouse granulosa cells through beta-catenin. *Biol Reprod* 2010; 82:865-875.

22. Finnson KW, Kontogianna M, Li X, Farookhi R. Characterization of Wnt2 Overexpression in a Rat Granulosa Cell Line (DC3): Effects on CTNNB1 Activation. *Biol Reprod* 2012;
23. Parakh TN, Hernandez JA, Grammer JC, Weck J, Hunzicker-Dunn M, Zeleznik AJ, Nilson JH. Follicle-stimulating hormone/cAMP regulation of aromatase gene expression requires beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:12435-12440.
24. Hernandez Gifford JA, Hunzicker-Dunn ME, Nilson JH. Conditional deletion of beta-catenin mediated by Amhr2cre in mice causes female infertility. *Biol Reprod* 2009; 80:1282-1292.
25. Roy L, McDonald CA, Jiang C, Maroni D, Zeleznik AJ, Wyatt TA, Hou X, Davis JS. Convergence of 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A and glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin signaling in corpus luteum progesterone synthesis. *Endocrinology* 2009; 150:5036-5045.
26. Fan HY, O'Connor A, Shitanaka M, Shimada M, Liu Z, Richards JS. Beta-catenin (CTNNB1) promotes preovulatory follicular development but represses LH-mediated ovulation and luteinization. *Mol Endocrinol* 2010; 24:1529-1542.
27. Hsieh M, Boerboom D, Shimada M, Lo Y, Parlow AF, Luhmann UF, Berger W, Richards JS. Mice null for Frizzled4 (Fzd4^{-/-}) are infertile and exhibit impaired corpora lutea formation and function. *Biol Reprod* 2005; 73:1135-1146.
28. Lapointe E, Boyer A, Rico C, Paquet M, Franco HL, Gossen J, Demayo FJ, Richards JS, Boerboom D. FZD1 Regulates Cumulus Expansion Genes and Is Required for Normal Female Fertility in Mice. *Biol Reprod* 2012;
29. Hsieh M, Mulders SM, Friis RR, Dharmarajan A, Richards JS. Expression and localization of secreted frizzled-related protein-4 in the rodent ovary: evidence for selective up-regulation in luteinized granulosa cells. *Endocrinology* 2003; 144:4597-4606.
30. Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Shimada M, Wayne CM, Ochsner SA, White L, Richards JS. Gene expression profiles of cumulus cell oocyte complexes during ovulation reveal cumulus cells express neuronal and immune-related genes: does this expand their role in the ovulation process? *Mol Endocrinol* 2006; 20:1300-1321.

31. Drake JM, Friis RR, Dharmarajan AM. The role of sFRP4, a secreted frizzled-related protein, in ovulation. *Apoptosis* 2003; 8:389-397.
32. Finch PW, He X, Kelley MJ, Uren A, Schaudies RP, Popescu NC, Rudikoff S, Aaronson SA, Varmus HE, Rubin JS. Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:6770-6775.
33. Hsieh M, Johnson MA, Greenberg NM, Richards JS. Regulated expression of Wnts and Frizzleds at specific stages of follicular development in the rodent ovary. *Endocrinology* 2002; 143:898-908.
34. Bardeesy N, Sinha M, Hezel AF, Signoretti S, Hathaway NA, Sharpless NE, Loda M, Carrasco DR, DePinho RA. Loss of the Lkb1 tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation. *Nature* 2002; 419:162-167.
35. Sambrook J, Fritsch, E. F., and Maniatis, T., 2nd edition, ed *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
36. Zeleznik AJ, Midgley AR, Jr., Reichert LE, Jr. Granulosa cell maturation in the rat: increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 1974; 95:818-825.
37. Lacher MD, Siegenthaler A, Jager R, Yan X, Hett S, Xuan L, Saurer S, Lareu RR, Dharmarajan AM, Friis R. Role of DDC-4/sFRP-4, a secreted frizzled-related protein, at the onset of apoptosis in mammary involution. *Cell Death Differ* 2003; 10:528-538.
38. Wolf V, Ke G, Dharmarajan AM, Bielke W, Artuso L, Saurer S, Friis R. DDC-4, an apoptosis-associated gene, is a secreted frizzled relative. *FEBS Lett* 1997; 417:385-389.
39. Heinonen KM, Vanegas JR, Lew D, Krosil J, Perreault C. Wnt4 enhances murine hematopoietic progenitor cell expansion through a planar cell polarity-like pathway. *PLoS One* 2011; 6:e19279.
40. Tanigawa S, Wang H, Yang Y, Sharma N, Tarasova N, Ajima R, Yamaguchi TP, Rodriguez LG, Perantoni AO. Wnt4 induces nephronic tubules in metanephric mesenchyme by a non-canonical mechanism. *Dev Biol* 2011; 352:58-69.
41. Christov M, Koren S, Yuan Q, Baron R, Lanske B. Genetic ablation of sfrp4 in mice does not affect serum phosphate homeostasis. *Endocrinology* 2011; 152:2031-2036.

42. Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest* 2010; 120:963-972.
43. Liu Z, de Matos DG, Fan HY, Shimada M, Palmer S, Richards JS. Interleukin-6: an autocrine regulator of the mouse cumulus cell-oocyte complex expansion process. *Endocrinology* 2009; 150:3360-3368.
44. Richards JS. Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 234:75-79.
45. Stocco C, Telleria C, Gibori G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev* 2007; 28:117-149.
46. Natesampillai S, Kerkvliet J, Leung PC, Veldhuis JD. Regulation of Kruppel-like factor 4, 9, and 13 genes and the steroidogenic genes LDLR, StAR, and CYP11A in ovarian granulosa cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294:E385-391.

3.8 FIGURES

FIG. 1

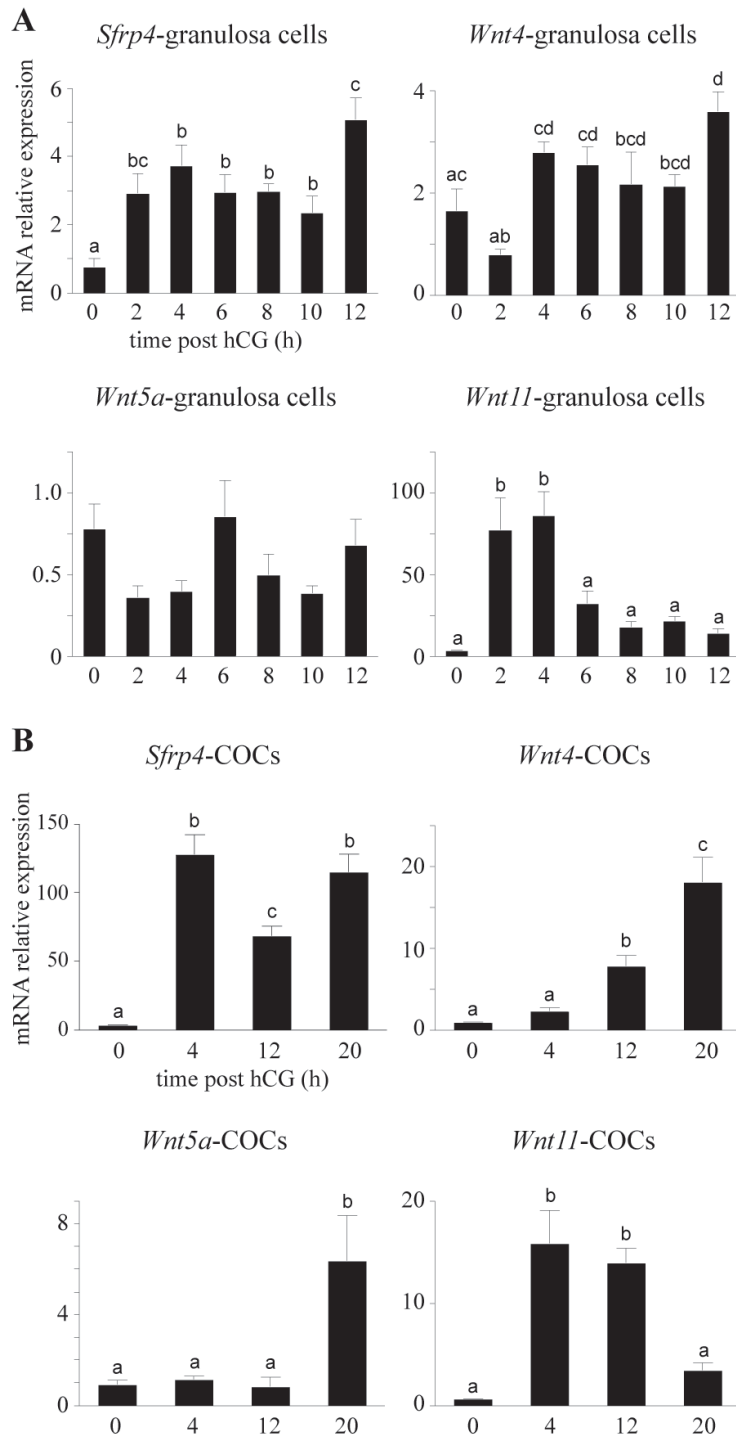


Figure 1 : Patterns of *Sfrp4* and *Wnt* mRNA regulation by hCG in granulosa cells and COCs. Quantitative RT-PCR analysis of *Sfrp4*, *Wnt4*, *Wnt5a* and *Wnt11* mRNA levels in granulosa cells (A) isolated from immature eCG-treated mice without or 2,4, 6, 8, 10 or 12h after the administration of an ovulatory dose of hCG. Analyses were also conducted on isolated COCs (B) obtained from immature eCG-treated mice at different times following hCG administration. COCs were collected either by follicle puncture (0 and 4h), by flushing the oviducts (20h) or by using both methods (12h). For all analyses, n=6 samples/time point, with each sample consisting of a pool of cells collected from 2-5 animals. All data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19* and are expressed as means \pm SEM (columns and error bars). Columns that are not labeled with common letters are significantly different ($P < 0.05$).

FIG. 2

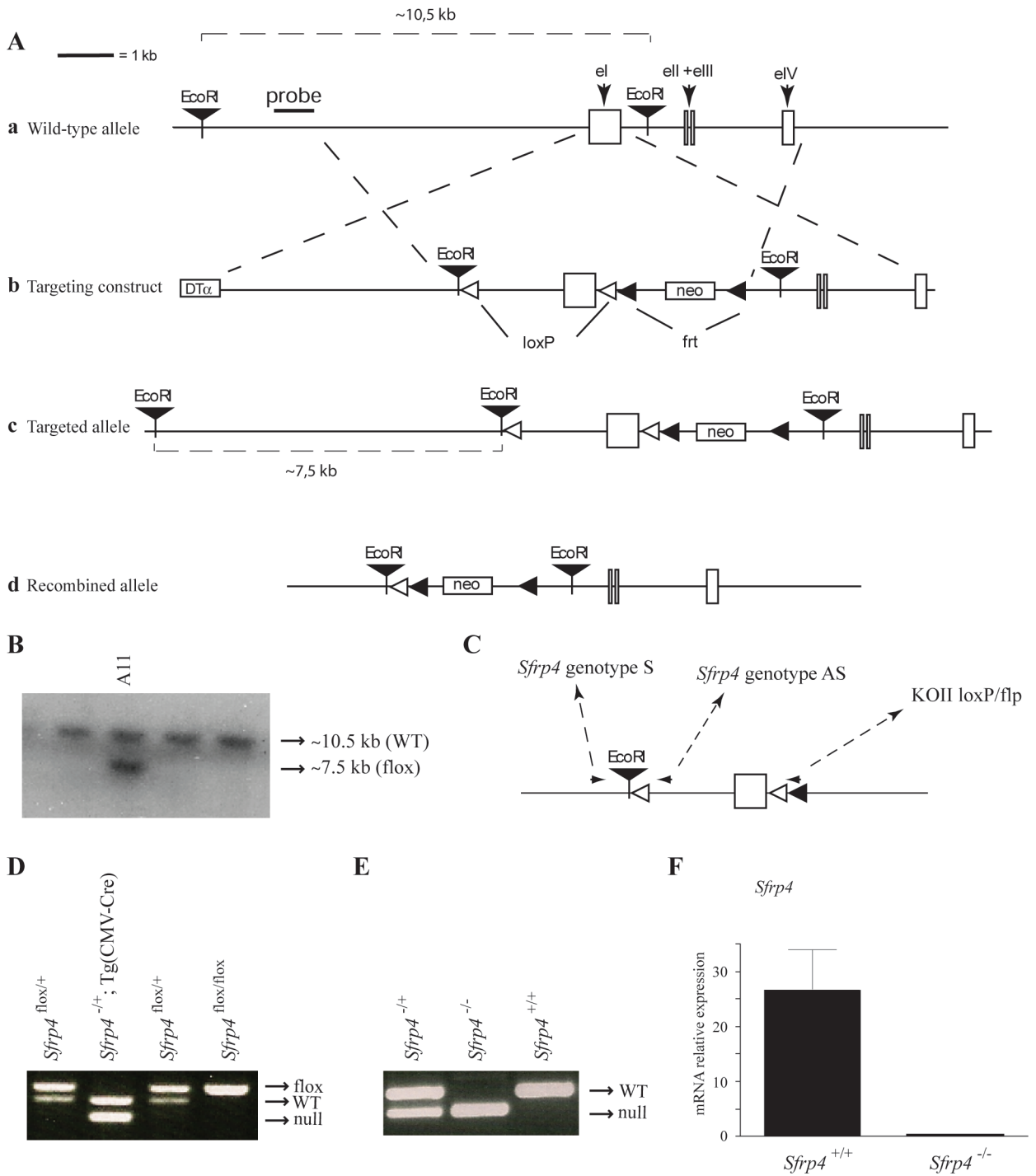


Figure 2 : Targeting of *Sfrp4*. A) Illustration of the strategy used to generate *Sfrp4*^{-/-} mice. a) Placement of the genomic DNA probe used for Southern blotting. b) In the targeting construct, LoxP sites were inserted upstream and downstream of the first exon of *Sfrp4*. c) *Sfrp4*^{fllox} allele. d) *Sfrp4*⁻ (i.e., Cre-recombined) allele. B) Generation of embryonic stem cell lines heterozygous for the targeted *Sfrp4* allele. Presence of the targeted allele was detected as a 7.5 kb *EcoR1* restriction fragment by Southern blotting. One representative positive clone (A11) is shown alongside four negative clones. C) PCR genotyping analysis strategy. Oligonucleotides (small black arrowheads) were designed to generate PCR products of 249 bp for the *Sfrp4*⁺ allele, 143 bp for the *Sfrp4*^{fllox} allele and 136 bp for the *Sfrp4*⁻ allele. D) PCR genotype analysis of pups generated by the mating of *Sfrp4*^{fllox/+} with Tg(CMV-cre)1Cgn/J mice. E) PCR genotype analysis of pups generated by backcross of *Sfrp4*^{+/-} mice. F) Quantitative RT-PCR analysis of *Sfrp4* expression in granulosa cells isolated from immature eCG-treated *Sfrp4*^{+/+} and *Sfrp4*^{-/-} mice 12h after the administration of an ovulatory dose of hCG, confirming the abrogation of *Sfrp4* expression in the *Sfrp4*-null mice. n=6 animal/genotype. Data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19* and are expressed as means ± SEM (columns and error bars). DTα, diphtheria toxin α chain; neo, neomycin resistance cassette; WT, wild type.

FIG. 3

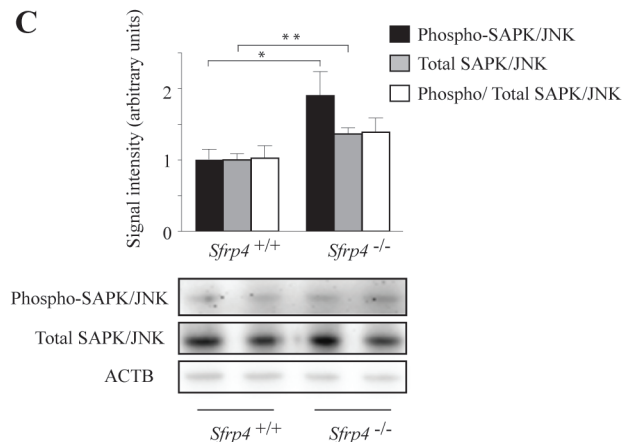
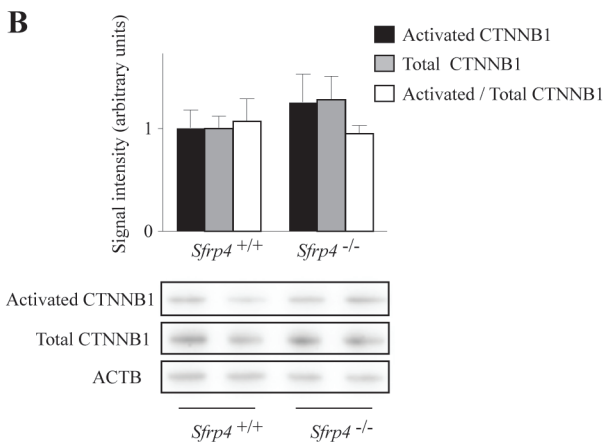
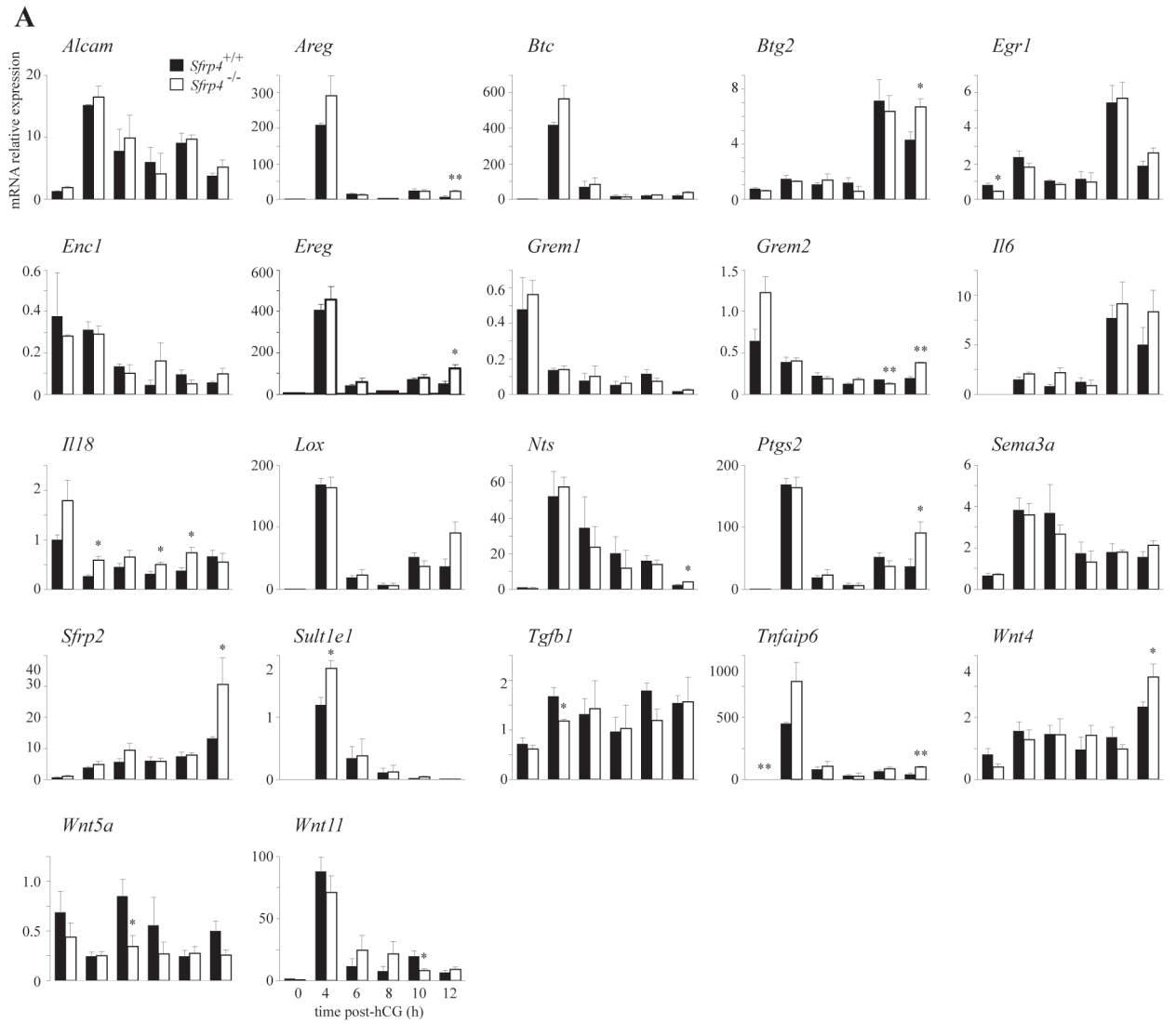


Figure 3 : *In vivo* analysis of ovarian gene expression in granulosa cells from *Sfrp4*^{-/-} mice. A) Quantitative RT-PCR analysis of known *Wnt4*-regulated genes and *Sfrp4*-regulated genes identified by microarray analysis. Analyses were performed on RNA isolated from granulosa cells from immature eCG-treated mice of the indicated genotypes, without or 4, 6, 8, 10, or 12h after the administration of an ovulatory dose of hCG. For all analyses, n=5-6 animals/genotype/timepoint. Western blot analysis of activated and total CTNNB1 (B) or phosphorylated and total SAPK/JNK (C) in protein extracts from granulosa cells collected from immature eCG-treated mice of the indicated genotypes 12h after the administration of an ovulatory dose of hCG. ACTB (β -actin) was used as a loading control and quantification of protein expression was done by densitometric analysis. The ratios of protein expression levels to ACTB and the ratios of activated to total CTNNB1 or p-SAPK/JNK to total SAPK/JNK are illustrated. n=6 animals/genotype. Representative blots (n=2 animals/genotype) are shown below the graphs. All data are expressed as means \pm SEM (columns and error bars). *=P<0.05, **=P<0.01.

FIG. 4

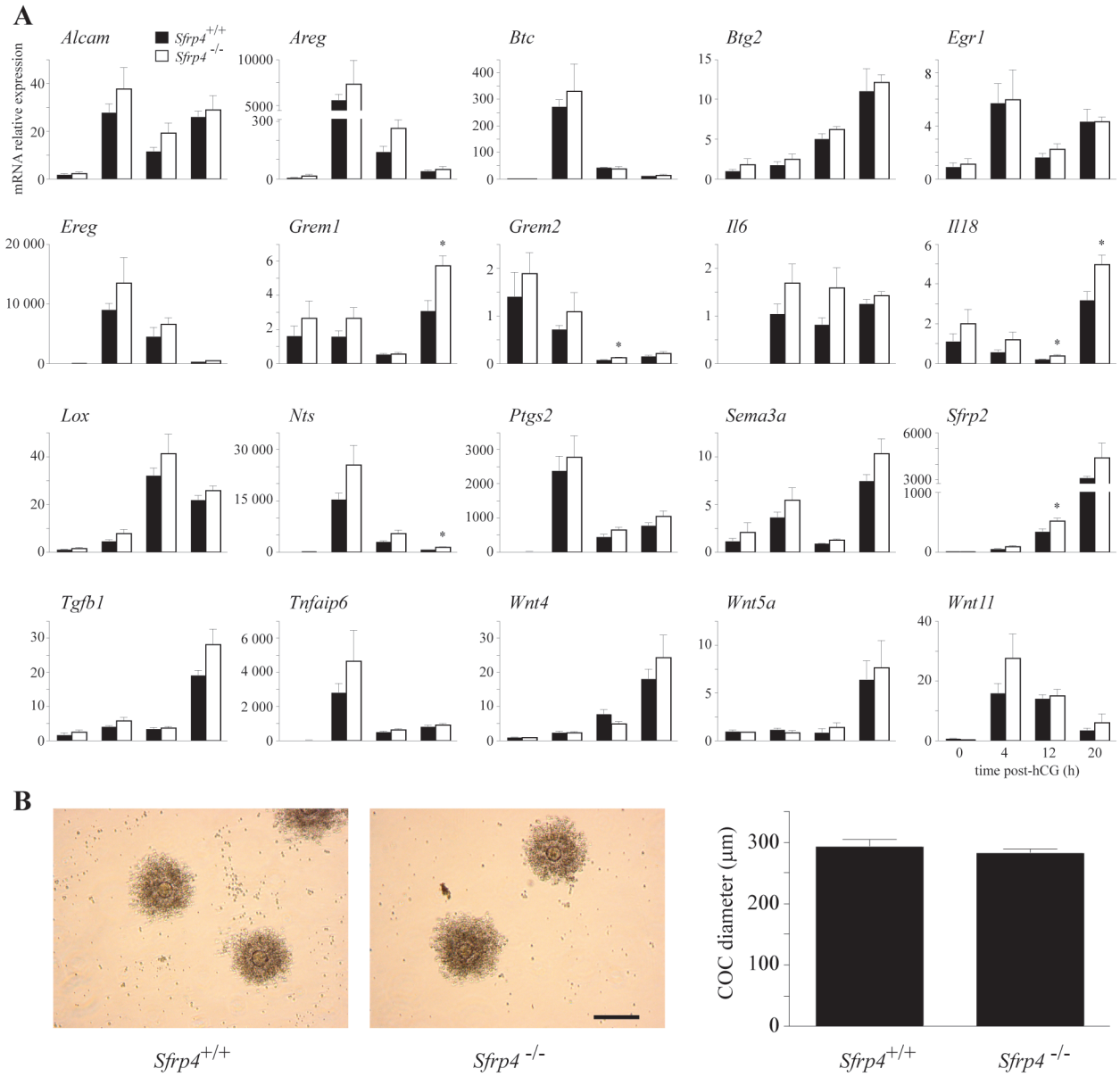


Figure 4 : Cumulus expansion is not altered in *Sfrp4*^{-/-} mice. A) Genes whose expression was modulated in granulosa cells of *Sfrp4*^{-/-} mice were analyzed by quantitative RT-PCR in COCs of *Sfrp4*^{-/-} and control mice. For all RT-PCR analyses, n=5 samples/genotype/time point, and each sample represents a pool of cells collected from 2-5 animals. All data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19* and are expressed as means ± SEM (columns and error bars). *= $P < 0.05$. B) Photomicrographs and diameter measurements of COCs collected by flushing the oviducts of immature eCG-treated mice of the indicated genotypes 20h after the administration of an ovulatory dose of hCG. n=10-11 COCs per genotype, bar=100 μm. Data are expressed as means ± SEM (columns and error bars).

FIG. 5

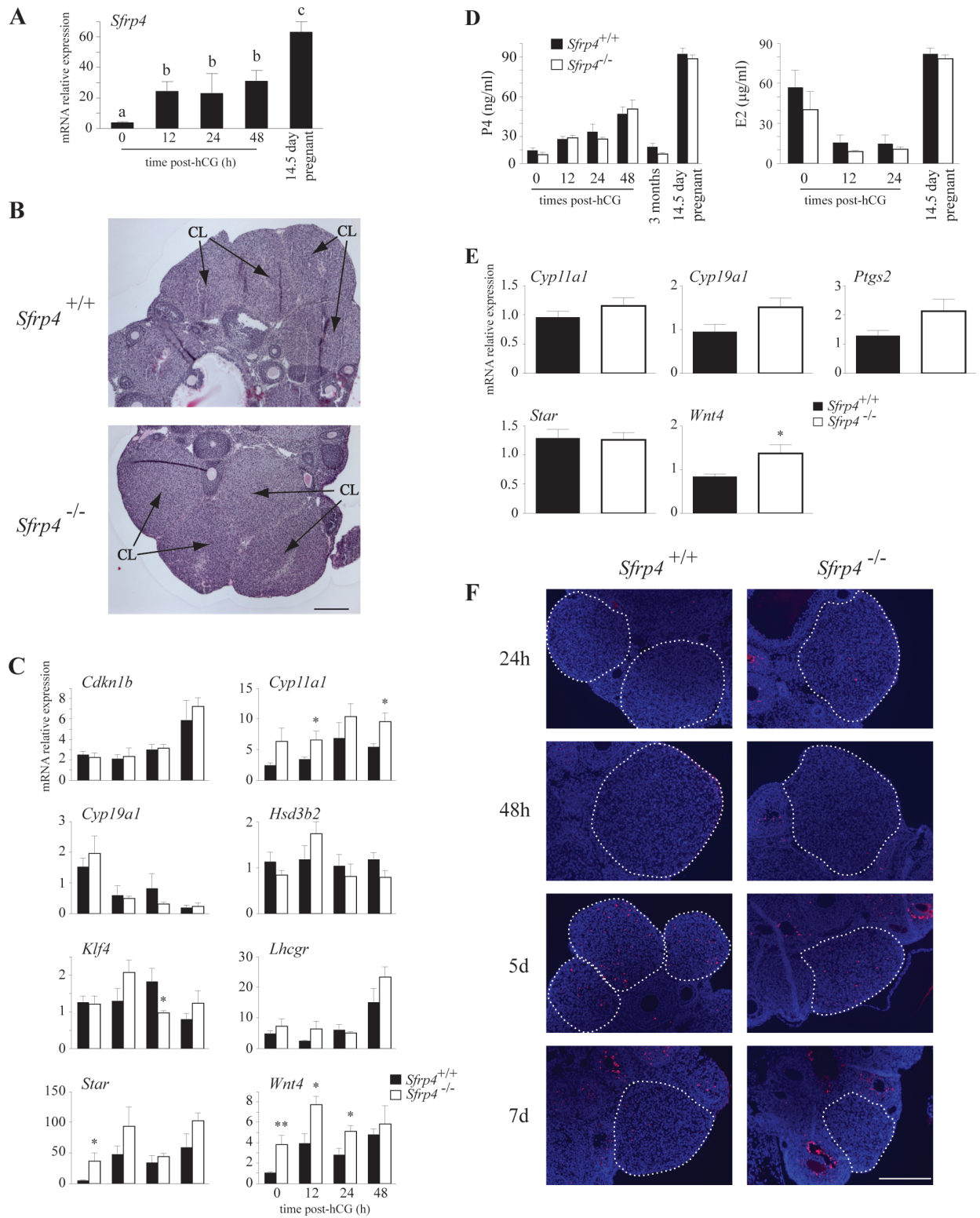


Figure 5 : The corpus luteum function is not impaired in *Sfrp4*^{-/-} mice. A) Quantitative RT-PCR analysis of *Sfrp4* from whole ovaries isolated from immature eCG-treated mice without or 12, 24 or 48h after the administration of an ovulatory dose of hCG, or from 14.5d-pregnant mice. Columns that are not labeled with common letters are significantly different ($P < 0.05$). B) Photomicrographs of ovaries from *Sfrp4* KO and control immature eCG-treated mice 48h post-hCG, bar=200 μ m C) Quantitative RT-PCR analysis of genes involved in the formation (*Cdkn1b* and *Lhcgr*) or the function (*Cyp11a1*, *Hsd3b2*, *Star*) of the CL. Genes that are associated with WNT signaling (*Cyp19a1*, *Klf4* and *Wnt4*) were also analyzed. D) Serum progesterone (P4) and estradiol (E2) levels in mice of the indicated genotypes. Samples were taken from immature, eCG-treated mice either without or 12, 24 or 48h after the administration of an ovulatory dose of hCG, and from 3 month old and 14.5d-pregnant mice. n=8-24 animals/genotype/timepoint or condition. E) Quantitative RT-PCR analysis of genes involved in steroidogenesis in whole ovaries from 14.5d-pregnant mice. F) TUNEL staining (red) in ovaries isolated from immature eCG-treated mice without or 12, 48h, 5 and 7 days after the administration of an ovulatory dose of hCG. Counterstain = DAPI (blue), bar=200 μ m. For clarity, corpora lutea are circumscribed with a dotted white line. For all RT-PCR analyses, n=5-6/time point/genotype (if applicable), with each sample consisting of 1 or two ovaries. All data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19* and are expressed as means \pm SEM (columns and error bars). *= $P < 0.05$, **= $P < 0.01$.

FIG. 6

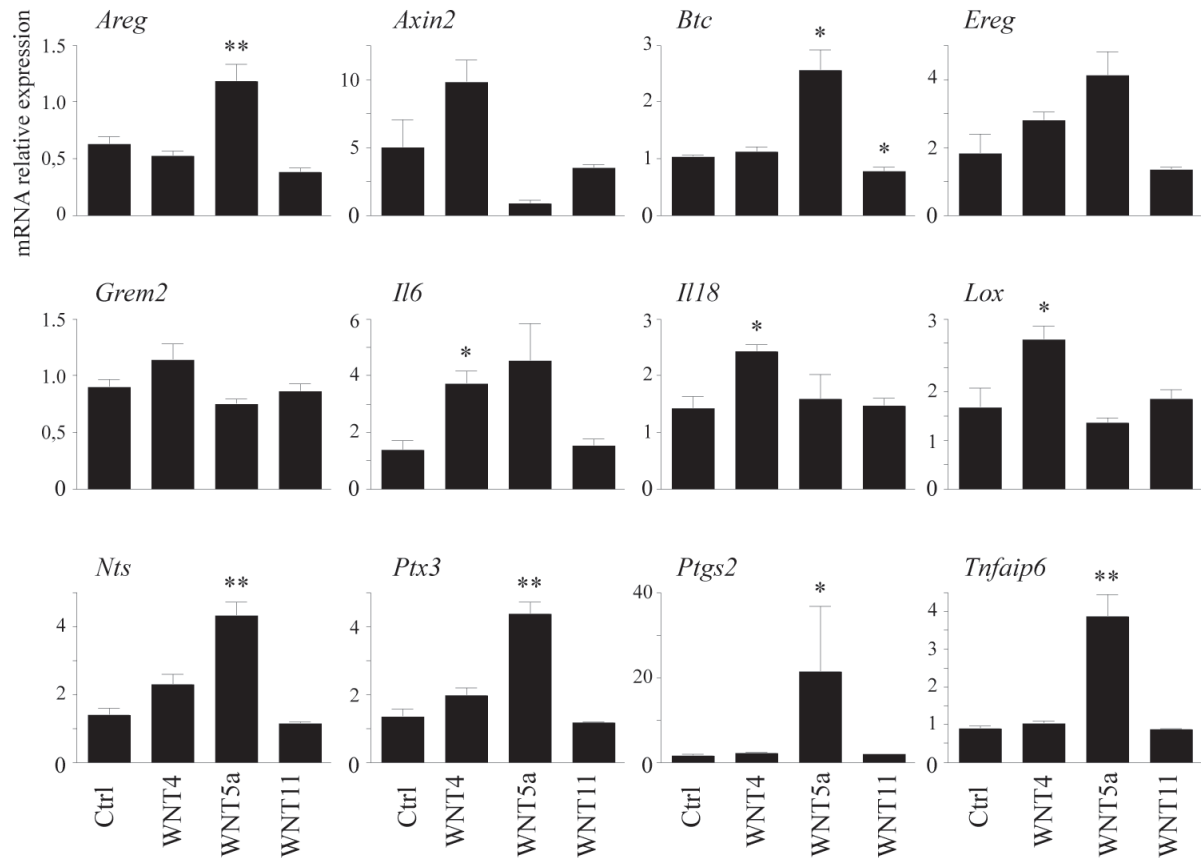


Figure 6 : Quantitative RT-PCR analysis of the expression of the indicated genes in cultured granulosa cells treated or not with WNT4, WNT5a or WNT11 for 1 hour. n=5 wells/condition and the experiment was repeated three times. All data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19* and are expressed as means \pm SEM (columns and error bars). *= $P < 0.05$, **= $P < 0.01$.

3.9 TABLE

TABLE 1: Mating trial

	Controls	<i>Sfrp4</i> ^{-/-}
n	8	6
Total litters	9.38 ± 0.46	8.33 ± 1.15
Total pups	56.75 ± 3.23	59.50 ± 9.12
Litter size	6.05 ± 0.32	7.14 ± 0.44 *

Total litters, total pups and litter sizes are expressed as means ± SEM.

* = means are significantly different (P < 0.05).

3.10 SUPPLEMENTAL TABLES

SUPPLEMENTAL TABLE 1 : Oligonucleotides for RT-PCR analysis.

Primer name	Sequence (5' to 3')
<i>Agt-S</i>	TGAGGACAAGCTGCCACCCTTT
<i>Agt-AS</i>	TCCTCTCCTGCTTTGAGTTCGAGG
<i>Alcam-S</i>	GGCGGCTTCAACGACCATCACA
<i>Alcam-AS</i>	TCCACACCACAGTCGCGTTCCT
<i>Areg-S</i>	CTCGCAGCTATTGGCATCGGCA
<i>Areg-AS</i>	TGGCATGCACAGTCCCGTTT
<i>Axin2-S</i>	CCACTTCAAGGAGCAGCTCAGCA
<i>Axin2-AS</i>	TACCCAGGCTCCTGGAGACTGA
<i>Btc-S</i>	CTTGCCCTGGGTCTTGCAAT
<i>Btc-AS</i>	GAGGGAGTTTGCTCGTCCAC
<i>Btg2-S</i>	GCGTGAGCGAGCAGAGACTCAA
<i>Btg2-AS</i>	GCCACCTTGCTGATGATGGGGT
<i>Cdkn1b-S</i>	TGGGTTAGCGGAGCAGTGTCCA
<i>Cdkn1b-AS</i>	TGCTCCACAGTGCCAGCGTT
<i>Cyp11a1-S</i>	GTGACCTTGCAGAGGTACACTGT
<i>Cyp11a1-AS</i>	GTGACTCCAGCCTTCAGTTCACA
<i>Cyp19-S</i>	CTGAACATCGGAAGAATGCACAG
<i>Cyp19-AS</i>	GAGTAGATAGGCCACACTTCTTC
<i>Dppa3-S</i>	GGGTCCGCACTTTGTTGTCGGT
<i>Dppa3-AS</i>	TCTGAATGGCTCACTGTCCCGT
<i>Egr1-S</i>	CCTTCAATCCTCAAGGGGAGCCGA
<i>Egr1-AS</i>	AGGTGATGGGAGGCAACCGAGT
<i>Enc1-S</i>	ACTGCATTCGTCAGCACCTGGA
<i>Enc1-AS</i>	TGACATCTCATCTCGCCGTGCA
<i>Ereg-S</i>	ACGTTGCGTTGACAGTGATTCTCAT
<i>Ereg-AS</i>	GGTCCCCTGAGGTCACTCTCTCAT
<i>Grem1-S</i>	GCCACTCGTCCACAGCGAAGAA
<i>Grem1-AS</i>	AGGCGGAATGGCTCCTTGGGAA
<i>Grem2-S</i>	AGGAGAGGGACAGGGAGACACACA
<i>Grem2-AS</i>	GCCGGTTCTTCCGTGTTTCAGCT
<i>Hsd3b2-S</i>	TGGTGCAAGAGGAAGATCTGGAGG
<i>Hsd3b2-AS</i>	AGCTCTCCTCAGGTAAGTGGGTGT
<i>Il6-S</i>	AGACAAAGCCAGAGTCCTTCAGAGA
<i>Il6-AS</i>	TAGCCACTCCTTCTGTGACTCCAGC

<i>Il18-S</i>	TCGTTGACAAAAGACAGCCTGTGT
<i>Il18-AS</i>	CCTTCACAGAGAGGGTCACAGCCA
<i>Lhcgr-S</i>	AGATGCACAGTGGCACCTTCCAG
<i>Lhcgr-AS</i>	ATGACGTGGCGATGAGCGTCT
<i>Lox-S</i>	TACAACCTGAGATGCGCTGCGG
<i>Lox-AS</i>	GGCGGCTTGGTAAGAAGTCCGAT
<i>Nlrp5-S</i>	TGCTCTGCGTTCCAATGCCCT
<i>Nlrp5-AS</i>	TCACCACGTGGGGCTTGACA
<i>Nts-S</i>	AGCAGGGCCTTTCAACACTGGG
<i>Nts-AS</i>	AACCCCTCTTGAGAATGTAGGGCCT
<i>Ptgs2-S</i>	TCCCCTTCCTGCGAAGTTTA
<i>Ptgs2-AS</i>	TAGAAGAACCTTTTCCAGCACTTC
<i>Rpl19-S</i>	CTGAAGGTCAAAGGGAATGTG
<i>Rpl19-AS</i>	GGACAGAGTCTTGATGATCTC
<i>Sema3a-S</i>	CCAGAGCAAACCTATGCAAACGGA
<i>Sema3a-AS</i>	TCCAGAAGGAAGGTGTGGTAAC
<i>Sfrp2-S</i>	CGACAACGACATCATGGAAACCCT
<i>Sfrp2-AS</i>	TTCGGACACGCCGTTTACAGCTT
<i>Sfrp4-S</i>	CATCGAACAGTATGAAGAGCTAGT
<i>Sfrp4-AS</i>	AGGGCTCAGACGTTTACAGTCA
<i>Sult1e1-S</i>	CGTTCAACACACTTCCTTCCAGGAG
<i>Sult1e1-AS</i>	GGGCTTCTGGGAAGTGGTTCTTCC
<i>StAR-S</i>	GATTAAGGCACCAAGCTGTGCTG
<i>StAR-AS</i>	CTGCTGGCTTTCCTTCTTCCAGC
<i>Tgfb1-S</i>	GCAGAGCTGCGCTTGCAGAGAT
<i>Tgfb1-AS</i>	TCAGGCGTATCAGTGGGGGTCA
<i>Tnfaip6-S</i>	TGAAGGTGGTTCGTCTCGCAACC
<i>Tnfaip6-AS</i>	TCCACAGTTGGGCCAGGTTTCA
<i>Wnt4-S</i>	AGCTGTCATCGGTGGGCAGCAT
<i>Wnt4-AS</i>	ACTGTCCGGTCACAGCCACACT
<i>Wnt5a-S</i>	TGAGAGCGCACGCATCCTCAT
<i>Wnt5a-AS</i>	AGCTGCAGCCAGCACGTCTT
<i>Wnt11-S</i>	GAGGCTCTGCTCTTTGCCT
<i>Wnt11-AS</i>	CTGCCGGAGTCTTGGACAGT
<i>Zp1-S</i>	GCCCTGGGAATTGACTGAGCTGGA
<i>Zp1-AS</i>	ACTGTCATAGCAGCAGCCAGCCT
<i>Zp3-S</i>	AGTTTCTCGAAACCGCAGGCAC
<i>Zp3-AS</i>	AGCAGTCCAGCCTTCCACAGTCT

SUPPLEMENTAL TABLE 2 : Microarray analysis of gene expression in granulosa cells from *Sfrp4*^{-/-} mice.

Gene	Fold change (KO/WT)	P-value
Up-regulated in <i>Sfrp4</i>^{-/-} mice		
<i>Nts</i>	3,84	0,004
<i>Ankrd1</i>	3,26	0,002
<i>Olr1</i>	2,66	0,032
<i>Ifi202b</i>	2,63	0,001
<i>Akr1c18</i>	2,63	0,016
<i>Ereg</i>	2,59	0,012
<i>Nxf3</i>	2,47	0,007
<i>Egr2</i>	2,31	0,040
<i>Fosb</i>	2,23	0,035
<i>Cyp17a1</i>	2,22	0,020
<i>Areg</i>	2,20	0,020
<i>Enpp3</i>	2,18	0,013
<i>Il6</i>	2,04	0,043
<i>Egr3</i>	2,00	0,018
<i>Btg2</i>	1,96	0,013
<i>Egr1</i>	1,94	0,014
<i>Tnfaip6</i>	1,93	0,040
<i>Fam110c</i>	1,92	0,045
<i>Trib1</i>	1,89	0,027
<i>Il18</i>	1,88	0,010
<i>Zfp786</i>	1,87	0,049
<i>Krr1</i>	1,85	0,002
<i>Olfcr872</i>	1,81	0,009
<i>Zfp36</i>	1,79	0,026
<i>Enc1</i>	1,75	0,049
<i>F2rl2</i>	1,74	0,015
<i>Il33</i>	1,73	0,022
<i>Fhl3</i>	1,73	0,003
<i>Trpc5</i>	1,72	0,033
<i>Klrb1f</i>	1,69	0,046
<i>Sema3a</i>	1,69	0,046
<i>Epgn</i>	1,67	0,033
<i>Fetub</i>	1,64	0,045

<i>Aldh1a3</i>	1,63	0,034
<i>Zcchc16</i>	1,61	0,045
<i>Grem2</i>	1,61	0,046
<i>Steap1</i>	1,60	0,020
<i>Prkg2</i>	1,60	0,032
<i>Dapp1</i>	1,59	0,008
<i>Cyr61</i>	1,58	0,018
<i>Akr1b8</i>	1,58	0,040
<i>Btc</i>	1,58	0,029
<i>Tgfb1</i>	1,57	0,049
<i>Gm5105</i>	1,57	0,003
<i>Sik1</i>	1,57	0,049
<i>Alcam</i>	1,56	0,039
<i>Ptprn</i>	1,55	0,020
<i>Lgals8</i>	1,55	0,000
<i>Akap2</i>	1,53	0,013
<i>Lbh</i>	1,52	0,044
<i>Gnas</i>	1,52	0,044

Down-regulated in *Sfrp4*^{-/-} mice

<i>Bmp15</i>	0,66	0,035
<i>Olfml2b</i>	0,66	0,027
<i>Ccno</i>	0,66	0,006
<i>Cpa1</i>	0,66	0,007
<i>Zfp708</i>	0,66	0,007
<i>Hlfoo</i>	0,65	0,018
<i>Tdrd5</i>	0,65	0,022
<i>Gm13103</i>	0,65	0,027
<i>Bnc1</i>	0,65	0,005
<i>Fbxw16</i>	0,65	0,010
<i>Gm813</i>	0,65	0,040
<i>Esrp1</i>	0,65	0,003
<i>Nlrp9b</i>	0,65	0,038
<i>Nlrp9c</i>	0,64	0,006
<i>Oog4</i>	0,64	0,011
<i>Sp110</i>	0,64	0,007
<i>Abca9</i>	0,64	0,015
<i>Dppa3</i>	0,64	0,005
<i>Gpx3</i>	0,64	0,015
<i>Rfpl4</i>	0,64	0,003
<i>Sp110</i>	0,64	0,011

<i>Tle6</i>	0,63	0,008
<i>Serpina3n</i>	0,63	0,042
<i>Nlrp2</i>	0,63	0,002
<i>Akr1e1</i>	0,63	0,013
<i>Cpeb1</i>	0,63	0,004
<i>Fbxw15</i>	0,63	0,017
<i>Dpysl4</i>	0,63	0,002
<i>Zar1</i>	0,62	0,012
<i>Cd7</i>	0,62	0,003
<i>Oas1e</i>	0,62	0,024
<i>Fbxw21</i>	0,62	0,008
<i>Nlrp14</i>	0,62	0,012
<i>Olfir767</i>	0,61	0,002
<i>Sfrp4</i>	0,61	0,015
<i>Ccl21b</i>	0,61	0,020
<i>Zp2</i>	0,61	0,011
<i>Smoc1</i>	0,61	0,025
<i>Itga6</i>	0,61	0,026
<i>Agt</i>	0,60	0,037
<i>Kpna7</i>	0,60	0,001
<i>Padi6</i>	0,59	0,006
<i>Gatm</i>	0,59	0,007
<i>Ooep</i>	0,59	0,003
<i>Igfbp5</i>	0,59	0,001
<i>Zp1</i>	0,59	0,006
<i>Aspn</i>	0,58	0,030
<i>Ccdc80</i>	0,58	0,048
<i>Serpinfl</i>	0,58	0,001
<i>Osr2</i>	0,57	0,022
<i>Mlf1</i>	0,57	0,012
<i>Zp3</i>	0,57	0,012
<i>Lrrc61</i>	0,55	0,008
<i>Fbxw18</i>	0,54	0,002
<i>Nlrp5</i>	0,50	0,005
<i>Mmp2</i>	0,50	0,005
<i>Tmem184a</i>	0,50	0,024
<i>Gpx6</i>	0,48	0,001
<i>Dppa5a</i>	0,48	0,020

Chapitre 4

4. Discussion

La mission de notre équipe de recherche, comme des milliers d'autres équipes à travers le monde, est de réaliser une recherche fondamentale de qualité visant à établir les bases nécessaires à la compréhension d'un système physiologique. La constante découverte de molécules, suivie de la caractérisation de leurs fonctions, mène ensuite à l'élaboration de modèles moléculaires essentiels qui permettent d'identifier la cause exacte de certaines pathologies. Par exemple, la recherche fondamentale a permis l'identification des mutations géniques causant la fibrose kystique, l'hémophilie, la dystrophie musculaire de Duchenne et plusieurs autres maladies génétiques qui sont héréditaires ou non. Les données issues d'un projet de recherche moléculaire, tel que celui décrit dans cette thèse, peuvent ainsi paraître peu utiles, mais forment au contraire les bases nécessaires à la création de futurs traitements qui guériront un jour plusieurs maladies.

Notre équipe de recherche s'intéresse particulièrement aux mécanismes responsables de la régulation de l'ovaire adulte. Cet organe est évidemment essentiel à la reproduction et les dérèglements de celui-ci mènent à des conséquences de diverses natures. Parmi les pathologies les plus fréquentes, il y a d'abord le cancer ovarien, qui touche environ 1,4% des femmes et qui est causé par la néoplasie des cellules soit épithéliales, soit de la granulosa ou soit d'autres types cellulaires composant l'ovaire [114]. Il y a aussi le syndrome des ovaires polykystiques (PCOS), qui est causé par un dérèglement de l'axe HPG (section 1.2.1.1) et qui touche environ de 3 à 10% des femmes [115]. Le PCOS, en plus de causer l'infertilité des femmes atteintes, cause plusieurs symptômes désagréables tels que l'hirsutisme (pilosité d'apparence masculine), l'obésité, l'acné et plusieurs autres [116]. Ces deux maladies, en plus de plusieurs autres problèmes ovariens moins fréquents et moins caractérisés, affectent ainsi un grand nombre de femmes à travers le monde. Il est donc essentiel de mieux connaître les mécanismes de régulation de l'ovaire adulte pour comprendre davantage les pathologies ovariennes et trouver un traitement à celles-ci.

La recherche sur les mécanismes régulant l'ovaire s'effectue depuis très longtemps. Il est désormais bien établi que la régulation ovarienne est sous le contrôle principal des deux

gonadotrophines FSH et LH, qui ont été découvertes il y a plus de 80 ans [117]. Grâce au travail acharné des scientifiques, de multiples molécules ayant une importance majeure au niveau de la fonction ovarienne ont aussi été identifiées et caractérisées. Ce réseau de signalisation est cependant très complexe et probablement encore largement incomplet. Les recherches effectuées dans notre laboratoire visent ainsi à participer activement, tout comme plusieurs autres équipes de recherche, à l'élucidation de cette signalisation ovarienne.

La voie de signalisation des WNTs, qui est le sujet principal de cette thèse, est reconnue pour avoir un rôle fondamental au niveau de l'ovaire, particulièrement durant la période embryonnaire. Comme il a été mentionné à la section 1.3.2.1, l'absence de certains membres de cette voie de signalisation mène à la réversion sexuelle partielle femelle-mâle, tant chez la souris que chez l'humain [1,2,85]. L'importance de cette voie de signalisation au niveau de l'ovaire adulte n'est cependant pas aussi bien établie, possiblement à cause de la faible quantité d'études fonctionnelles publiées à ce sujet. Malgré tout, ces quelques publications ont permis d'attribuer des rôles importants pour des protéines telles que FZD4, β -caténine, WNT2 et WNT4, qui ont servi de base pour l'élaboration de cette thèse (voir section 1.3.2.2). Les fonctions présumées de chacune de ces molécules soulevaient cependant plusieurs questions concernant l'identité des récepteurs et des ligands impliqués. Afin de répondre à plusieurs de ces questions, nous avons élaboré l'objectif global de ce projet de recherche qui était d'élucider le rôle de la voie des WNTs au niveau de la fonction ovarienne, chez la souris. Pour ce faire, nous avons décidé d'étudier le rôle de deux composants de la voie des WNTs, soit FZD1 et SFRP4, dont l'expression avait été localisée au niveau de l'ovaire et à des moments-clés tels que l'ovulation ou la lutéinisation. L'élucidation du rôle de ces deux protéines, intégrée aux données publiées dans la littérature, nous donnait ainsi la possibilité de créer un modèle de signalisation qui résume le rôle des WNTs au niveau de l'ovaire.

La méthode pour parvenir à accomplir notre objectif global était la création des lignées de souris *Fzd1* KO et *Sfrp4* KO. Cette façon de procéder permet de bien situer le rôle d'un gène particulier dans son environnement physiologique. En effet, l'ovaire est un organe qui possède plusieurs particularités qui rendent son étude assez laborieuse. D'abord, l'activité

ovarienne est stimulée par des gonadotrophines qui induisent des processus cycliques précis. Cette stimulation hormonale ne peut cependant pas être intégralement reproduite *in vitro*, ce qui altère les résultats issus de telles expériences. Les données obtenues dans la littérature sur le rôle des différentes molécules régulatrices de la fonction ovarienne ont d'ailleurs majoritairement été obtenues à partir de modèles murins qui expriment constitutivement ou qui n'expriment pas certaines protéines. Une autre raison d'utiliser les modèles de souris génétiquement modifiées est qu'ils permettent de vérifier si la fonction primordiale des ovaires, c'est-à-dire la procréation, est affectée lors de l'abolition des gènes étudiés.

4.1 Étude de FZD1

Nous avons créé la première lignée de souris *Fzd1* KO en croyant que le récepteur FZD1 était responsable de la transduction du signal par WNT4 au niveau de l'ovaire. Ce récepteur était en effet, selon la littérature, exprimé en parallèle avec l'expression de WNT4 dans les follicules péri-ovulatoires [100]. Notre hypothèse initiale était d'ailleurs que l'abolition de FZD1 mènerait à une sévère infertilité due à un défaut de croissance folliculaire et d'ovulation. Nous avons donc été étonnés de constater que la majorité des souris *Fzd1* KO n'étaient que légèrement infertiles, que leur développement folliculaire n'était aucunement affecté et qu'elles n'avaient pas de défauts au niveau de la stéroïdogénèse. Ces résultats nous ont donc démontré que FZD1 n'était pas nécessaire à la transduction du signal par WNT4, puisque son absence chez les souris *Fzd1* KO ne provoque pas un phénotype similaire à celui des souris n'exprimant pas WNT4 au niveau de l'ovaire [108]. Il est cependant possible que FZD1, en contexte physiologique, serve à lier un tout autre WNT non-identifié à ce jour. Une autre éventualité serait que l'absence de FZD1 chez nos souris soit compensée par la présence d'un autre récepteur FZD qui viendrait accomplir les fonctions normalement effectuées par FZD1. La faible spécificité WNT-FZD suggère en effet qu'une protéine WNT peut lier plusieurs récepteurs FZD, et vice-versa, ce qui favorise évidemment les mécanismes de redondance au niveau cellulaire [118].

Aussi, l'exceptionnellement faible quantité de gènes modulés chez les cellules de la granulosa provenant de souris *Fzd1* KO a démontré que FZD1 ne semble pas avoir de rôle dans ces cellules. Il se pourrait cependant, encore une fois, qu'un processus de redondance impliquant un autre récepteur FZD soit à l'origine de ce résultat. Finalement, nous avons découvert que le récepteur FZD1 est nécessaire à l'induction de gènes reliés à l'expansion du cumulus au niveau du COC. Nous avons aussi déterminé que WNT4 n'était pas responsable de cet effet, mais nous n'avons pas pu identifier le ou les WNTs qui pourraient effectuer cette fonction. Ce résultat est très intéressant puisqu'il n'avait jamais été démontré, de façon fonctionnelle, que la voie des WNTs jouait un rôle au niveau du COC.

La principale insatisfaction concernant l'étude sur le récepteur FZD1 a été notre incapacité à expliquer la légère infertilité des souris *Fzd1* KO. Nous avons fait une quantité substantielle d'expériences nous démontrant la normalité de plusieurs processus : développement folliculaire, stéroïdogénèse, expression de gènes dans les cellules de la granulosa et expansion du cumulus. Ainsi, outre l'expression aberrante de gènes au niveau du COC, tout semblait normal chez la souris *Fzd1* KO qui est pourtant infertile. Ceci pourrait donc premièrement s'expliquer par le fait que l'infertilité est si légère qu'elle ne peut être détectée par les méthodes qu'on a utilisées. Il serait aussi possible qu'un autre processus que nous n'avons pas étudié soit à l'origine de ce problème de fertilité. Par exemple, l'altération de l'expression génique au niveau du COC en l'absence de FZD1 pourrait résulter en une expansion morphologiquement normale, mais fonctionnellement défectueuse. La composition du COC pourrait en effet être affectée et faire en sorte que l'ovocyte soit plus difficilement fécondable. Les utérus des souris *Fzd1* KO pourraient aussi être légèrement affectés nuisant ainsi à l'implantation de l'embryon. Trouver une cause à un si léger défaut de fertilité est cependant une tâche très fastidieuse et peut-être même impossible. Pour cette raison, nous avons décidé de ne pas investir davantage de ressources à la découverte de cette énigme, qui sera peut-être résolue dans une étude ultérieure.

Finalement, les raisons pour lesquelles une faible proportion des souris *Fzd1* KO étaient stériles et avaient des défauts utérins et ovariens restent toujours mystérieuses. Ce phénotype sévère, régulièrement présent au début de la création de la lignée de souris *Fzd1*

KO, s'est graduellement estompé jusqu'à devenir complètement absent vers la fin de l'étude. Peut-être qu'une mutation génétique quelconque, sans rapport avec le gène *Fzd1*, s'était initialement glissée dans notre lignée causant ainsi le phénotype décrit dans le Chapitre 2. Cette mutation aurait par la suite été graduellement diluée lors des croisements subséquents avec des souris WT durant le maintien de la colonie. Une autre explication pour ce phénotype sévère serait que la variation du « background » génétique mixte de ces souris aurait permis à certaines souris de compenser la perte de FZD1 par un autre récepteur, alors que d'autres en auraient été incapables. Dans un tel cas, les données issues de cet article impliqueraient que FZD1, au niveau embryonnaire, pourrait agir de récepteur pour la protéine WNT4. D'autres études seront cependant assurément nécessaires pour prouver cette hypothèse qui est bâtie sur des données plutôt incertaines.

4.2 Étude de SFRP4

La deuxième lignée de souris que nous avons créée, *Sfrp4* KO, visait à étudier le rôle plus global de la signalisation des WNTs au niveau de l'ovaire. La spécificité de liaison des SFRPs aux protéines WNTs est faible et les études à ce jour suggèrent qu'une protéine SFRP peut lier et inhiber plusieurs WNTs différents [119]. Nous avons choisi d'étudier cet antagoniste puisque des études descriptives ont montré que SFRP4 était exprimé dans les cellules de la granulosa lors de l'ovulation et dans les cellules lutéales du corps jaune. De plus, des études circonstanciées ont même proposé que SFRP4 soit associé à des processus apoptotiques lors de l'ovulation ou lors de l'involution du corps jaune [104,105]. L'abolition de SFRP4 dans notre modèle murin permettait donc théoriquement d'augmenter l'activité de plusieurs WNTs et ainsi observer quels processus seraient conséquemment induits ou affectés dans l'ovaire.

Tout d'abord, pour des raisons obscures, les souris *Sfrp4* KO avaient une fertilité légèrement supérieure aux souris WT. Les données de l'étude n'ont pas réussi, pour le moment, à expliquer comment un tel phénomène pouvait se produire. Par la suite, nos expériences ont démontré que SFRP4 était nécessaire à la modulation de l'expression de

plusieurs gènes associés à l'expansion du cumulus, tels qu'*Areg*, *Btg2*, *Egr1*, *Ereg*, *Grem2*, *Il18*, *Nts*, *Tgfb1* et *Tnfaip6*, au niveau des cellules de la granulosa. Étonnamment, SFRP4 modérait de façon moins importante l'expression de ces gènes au niveau du COC. Ces données suggèrent donc que SFRP4 réprimerait les gènes associés à l'expansion du cumulus spécifiquement au niveau des cellules de la granulosa. La fonction exacte de cette régulation négative localisée n'a pas été élucidée pour le moment. On pourrait cependant supposer qu'une modération des gènes reliés à l'expansion du cumulus, accomplie par SFRP4, serait nécessaire pour délimiter le processus d'expansion au COC seulement.

L'étude des souris *Sfrp4* KO a aussi permis l'avancement de notre compréhension concernant la mécanistique de la voie de signalisation des WNTs au niveau de la fonction ovarienne. Les données que nous avons récoltées ont en effet indiqué que l'abolition de SFRP4 mène possiblement à une augmentation de l'activité de la voie non-canonique PCP. Cette information est particulièrement intéressante puisqu'il s'agit de la première fois qu'une voie non-canonique est définie au niveau de l'ovaire. Les résultats obtenus grâce à cette souris suggéraient donc qu'une (ou des) protéine WNT, dont l'activité est normalement modérée par SFRP4, signalerait via la voie non-canonique pour induire l'expression de gènes associés à l'expansion du cumulus, au niveau des cellules de la granulosa. Nos données *in vitro* nous ont par la suite permis d'identifier deux candidats potentiels, WNT4 et WNT5a, qui pourraient être responsables de cette signalisation puisqu'ils ont réussi à induire l'expression de gènes associés au cumulus chez des cellules de la granulosa. D'une façon intéressante, ces deux protéines n'induisaient pas les mêmes groupes de gènes : *Il6*, *Il18* et *Lox* étaient induits par WNT4 alors qu'*Areg*, *Btc*, *Nts*, *Ptx3*, *Ptgs2* et *Tnfaip6* étaient induits par WNT5a. Cette spécificité d'induction transcriptionnelle pourrait être expliquée par la liaison des WNTs à deux récepteurs FZDs distincts qui n'agiraient pas via les mêmes voies de signalisation.

4.3 Modélisation de la voie des WNTs au niveau de la fonction ovarienne

Les informations tirées des études décrites précédemment, lorsqu'intégrées aux données publiées dans la littérature, nous permettent désormais de pouvoir élaborer un modèle sur la voie de signalisation des WNTs au niveau des cellules de la granulosa, avant (Figure 4.1 à gauche) et après (Figure 4.1, à droite) la stimulation par la LH. Ce schéma permet d'ailleurs de mettre en perspective la majorité des connaissances actuelles pour mieux comprendre les interactions possibles entre les molécules. Il est à noter qu'aucun modèle n'a été fait concernant la voie des WNTs au niveau du COC, vu la quantité insuffisante d'informations à ce jour.

Voici donc la description du modèle schématisé à la Figure 4.1 : Tout d'abord, une étude a démontré que la β -caténine favorisait l'expression de gènes reliés au développement folliculaire et induits par la FSH, tels que *Cyp19* et *Fshr* [40]. Cette même étude montrait aussi que l'activation trop prononcée de la β -caténine empêchait l'expression appropriée de gènes induits par la LH, tels qu'*Areg* et *Ereg* [40]. Des résultats publiés par notre laboratoire ont ensuite démontré que WNT4 était nécessaire lors du développement folliculaire et requis pour l'expression normale de *Cyp19*, *Star* et *Cyp11a1* [108]. De plus, nos données suggéraient, sans toutefois prouver, que WNT4 agissait via la β -caténine pour induire les gènes nommés précédemment. Dans le modèle proposé ci-dessous, il est par conséquent possible de situer WNT4 en amont de la β -caténine, lors de l'activation des gènes nécessaires au développement folliculaire (avant le pic de LH). Par contre, une étude fonctionnelle devra obligatoirement être effectuée pour s'assurer que le signal induit *in vivo* par WNT4 passe bien par une activation de la β -caténine dans ce contexte. Cette vérification pourra être faite en mesurant les niveaux de β -caténine activée dans les cellules de la granulosa provenant de souris *Wnt4*^{tm1.1Boer/tm1.1Boer};Tg(*CYP19A1-cre*)1Jr1. Si notre modèle de signalisation est valide, ces souris, qui n'expriment pas *Wnt4* au niveau des cellules de la granulosa, devraient avoir des niveaux inférieurs de β -caténine activée, résultant en une altération de l'expression de gènes tels que *Cyp19* et *Fshr*.

Nos données obtenues avec les souris *Sfrp4* KO ont par la suite suggéré que WNT4 et WNT5a, en activant une voie de signalisation non-canonique, induiraient l'expression de gènes associés à l'expansion du cumulus. L'activité de ces WNTs serait régulée négativement par SFRP4, possiblement pour éviter une transcription inappropriée et exagérée de ces gènes dans les cellules de la granulosa. Ces WNTs pourraient cependant lier des récepteurs FZDs différents, vu le patron d'expression génique distinct qu'ils induisent. L'identité de ces récepteurs, tant avant qu'après le pic de LH, n'a cependant pas été définie. Les données recueillies dans cette thèse suggèrent par contre qu'il ne s'agirait pas de FZD1, même si celui-ci est abondamment exprimé dans ces contextes. Cependant, puisque FZD4 a été identifié comme un récepteur essentiel aux processus menant à la formation du corps jaune [107], il se pourrait qu'il soit tout aussi nécessaire pour transmettre le signal non-canonique menant à l'induction de gènes reliés à l'expansion du cumulus.

Finalement, ce modèle de signalisation permet de faire un lien intéressant entre deux voies de signalisation régulant l'expression génique suite au pic de LH. En effet, il a été montré que l'activité de la β -caténine (voie canonique) devait être modérée pour permettre l'induction correcte de gènes régulés par la LH [40]. Comme plusieurs études l'ont montré, une telle régulation négative de la voie canonique pourrait être possible grâce à l'activation de voies non-canoniques induite possiblement par WNT4 et WNT5a. En effet, il a été démontré que WNT5a induit l'expression d'une ubiquitine ligase qui favorise conséquemment la dégradation de la β -caténine [120]. Un autre exemple est qu'un des effecteurs de la voie WNT/ Ca^{2+} , « Nemo-like kinase » (NLK), possède la capacité d'inhiber les facteurs de transcription de la famille TCF, qui sont les principaux co-effecteurs transcriptionnels de la β -caténine [77]. L'activation des voies non-canoniques, suite au pic de LH, aurait donc comme fonction d'induire l'expression de gènes associés à l'expansion du cumulus de façon directe et/ou indirecte en modérant l'activité de la voie canonique. Si le modèle présenté s'avère véridique, l'inhibition de la voie canonique suivant le signal par la LH pourrait aussi servir à faire cesser l'expression de gènes associés au développement folliculaire, qui ne sont désormais plus requis dans ce contexte.

Les liens tissés et décrits dans le dernier paragraphe ont pu être faits grâce aux données récoltées à partir de plusieurs études qui ont été effectuées dans des contextes très variés. La prochaine étape concernant la poursuite du projet de recherche sera de vérifier solidement les liens hypothétiques proposés afin de s'assurer de la validité du modèle présenté ci-dessous. Tout d'abord, grâce à la lignée de souris *Sfrp4* KO, il faudra s'assurer d'une manière plus robuste que l'absence de SFRP4 mène bien à l'activation des voies de signalisation non-canoniques plutôt que canonique. En effet, nos données suggérant une activation de la voie non-canonique en l'absence de SFRP4 sont intéressantes, mais restent ambiguës. Comme il a été mentionné dans la publication #2 (Chapitre 3), bien que la quantité de SAPK/JNK phosphorylé fût plus élevée en l'absence de SFRP4, le ratio final représentant la quantité de SAPK/JNK phosphorylé sur la quantité de SAPK/JNK total n'en fût pas modifié. Même si cela peut s'expliquer par un mécanisme de rétroaction positive par la voie non-canonique menant une augmentation de la transcription de SAPK/JNK, d'autres expériences devront être faites pour confirmer clairement cette théorie. De plus, nos expériences ne nous ont pas permis de déterminer si la voie WNT/Ca²⁺ était ou non affectée en l'absence de SFRP4. L'obtention de cette information sera cruciale à la poursuite du projet puisqu'il se pourrait que, dans ce contexte, la voie WNT/Ca²⁺ soit la voie d'activation nécessaire à la possible inhibition de la voie canonique proposée précédemment. Pour parvenir à vérifier rigoureusement l'état d'activation des voies en l'absence de l'antagoniste SFRP4, il sera possible d'utiliser des troupes commerciales pouvant mesurer les niveaux de Ca²⁺ intracellulaire (voie WNT/Ca²⁺) et les niveaux d'activation de différents effecteurs (voies WNT/Ca²⁺ et PCP) dans les cellules de la granulosa de souris *Sfrp4* KO et WT. Les mécanismes de signalisation pourront également être vérifiés grâce à l'utilisation de plasmides rapporteurs qui mesurent le niveau d'activité transcriptionnelle d'effecteurs spécifiques à chacune des voies, tels que NF-AT (voie WNT/Ca²⁺) ou c-Jun (voie PCP) (Figure 1.11).

Par la suite, si les données confirment bien que l'une ou l'autre des voies non-canoniques est activée en l'absence de SFRP4, il faudra alors vérifier si l'activité de la voie canonique WNT/ β -caténine s'en trouve diminuée. Les données exposées dans l'article 2 (Chapitre 3) ont démontré qu'il n'y avait pas de modulation des niveaux de β -caténine activée

en l'absence de SFRP4. Cependant, si notre hypothèse est juste, il se pourrait que l'inhibition de l'activité de la voie canonique par la voie non-canonique se fasse en aval de la β -caténine, ce qui n'aurait alors pas été détecté dans les expériences que nous avons effectuées. L'activité transcriptionnelle de la voie WNT/ β -caténine chez les cellules de la granulosa venant de souris *Sfrp4* KO devra donc être vérifiée, grâce à l'utilisation d'un plasmide rapporteur exprimant l'enzyme luciférase sous le contrôle d'une série de sites de liaison au facteur TCF/LEF.

Aussi, notre modèle suggère que les protéines WNT4 et WNT5a seraient responsables de l'induction des gènes associés à l'expansion du cumulus suite au pic de LH. Pour confirmer cette hypothèse, nous allons continuer les expériences *in vitro* dans le but de caractériser les voies de signalisation induites par ces protéines. Puisque la découverte du rôle de WNT4 et WNT5a est très récente, nous n'avons pas eu l'opportunité d'optimiser la technique *in vitro* afin de caractériser davantage les voies de signalisation impliquées. En effet, la culture des cellules de la granulosa est assez difficile due à la fragilité des cellules et à la faible quantité de matériel disponible. Cette méthode *in vitro*, bien que très utile pour découvrir la mécanistique de la signalisation impliquée, est donc une technique assez laborieuse qui demande beaucoup de mises au point dès l'ajout de nouvelles conditions ou manipulations. Ultérieurement, la vérification des niveaux d'activation des voies canonique et non-canoniques, en présence ou non de protéines recombinantes WNTs, pourra être effectuée grâce aux méthodes commerciales décrites précédemment. De plus, grâce à la protéine recombinante SFRP4, il sera possible de vérifier *in vitro* si celle-ci a réellement la capacité d'inhiber l'activité de WNT4 et WNT5a, ce qui appuiera davantage la validité du modèle proposé. Finalement, la création (en cours) et l'analyse phénotypique d'une souris n'exprimant pas *Wnt5a* au niveau des ovaires nous permettront de vérifier si l'absence de WNT5a mène 1) à une baisse de l'activité des voies non-canoniques, 2) à une augmentation de l'activité transcriptionnelle WNT/ β -caténine et 3) à la baisse de l'expression des gènes associés à l'expansion du cumulus.

Le modèle ci-dessous est donc sans aucun doute complexe et très hypothétique. Les expériences proposées pour valider ce modèle vont certainement venir confirmer, améliorer et même modifier plusieurs aspects de celui-ci. Le début de la caractérisation d'une telle voie de

signalisation dans un système physiologique précis ne peut cependant se faire que par l'élaboration et la modification constantes de modèles comme celui proposé dans cette thèse.

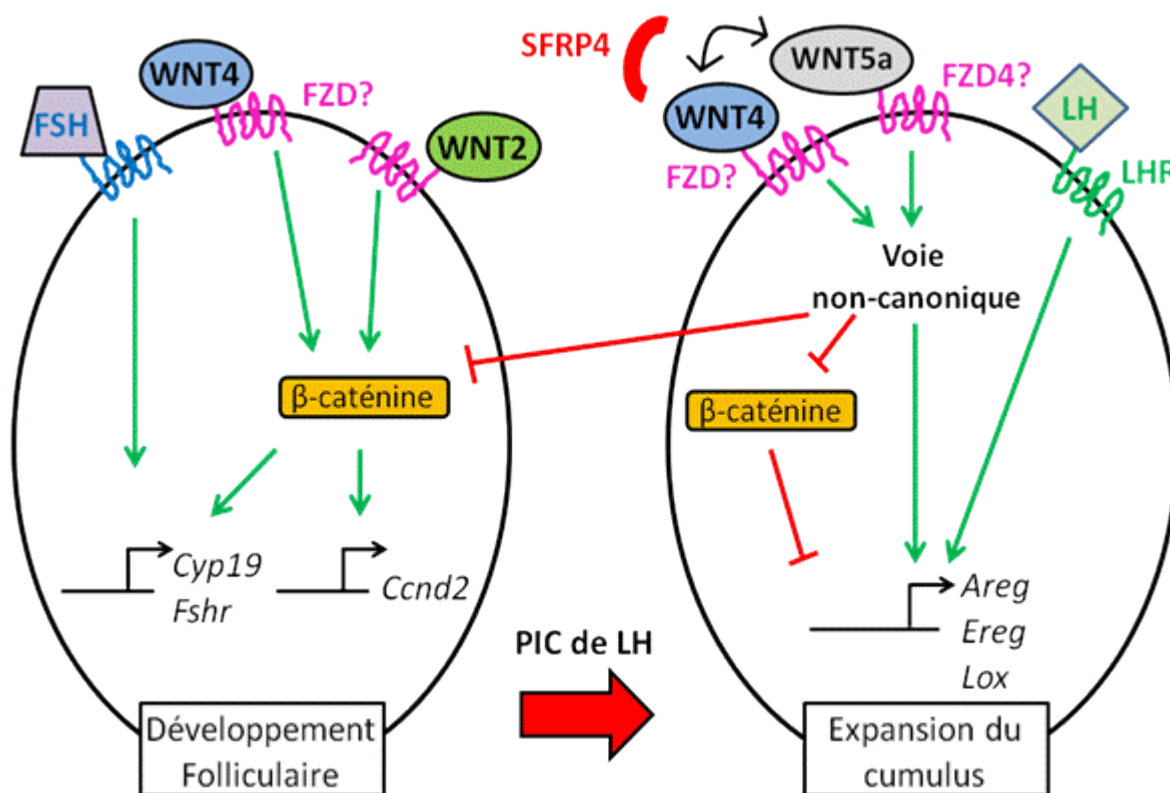


Figure 4.1 : Schématisation de la signalisation des WNTs dans les cellules de la granulosa avant (à gauche) ou après (à droite) le pic de LH.

4.4 La voie des WNTs dans l'ovaire humain

La majorité des données présentées dans cette thèse, qui ont servi à l'élaboration du modèle hypothétique de signalisation, ont été obtenues grâce à des modèles murins. Cependant, il est bien évident que la modélisation ainsi construite n'est que temporaire et

qu'elle devra nécessairement être confirmée au niveau de l'ovaire humain ou au niveau d'une espèce animale dont la régulation ovarienne est d'intérêt commercial (le bovin par exemple).

Les informations qui concernent la voie des WNTs dans l'ovaire humain sont nombreuses, mais davantage de nature descriptive que fonctionnelle. Les résultats issus de plusieurs études montrent cependant un rôle majeur de la voie des WNTs lors de processus pathologiques tels que le cancer ou le PCOS [121,122]. Par exemple, il a été démontré que des cellules issues de cancers ovariens ont des niveaux d'expression de *Wnt5a* moins élevés que dans les tissus normaux. De plus, l'avancement du cancer (le stade) et la gravité du pronostic sont inversement corrélés au niveau d'expression de *Wnt5a* dans la tumeur [123]. Cette étude démontre même que, dans ce contexte, *Wnt5a* est nécessaire à la modération de l'activité de la voie canonique, comme nous l'avons proposé à la Figure 4.1. Aussi, un nombre impressionnant d'études descriptives suggèrent que le cancer de l'ovaire serait associé à l'activation inappropriée de la β -caténine, à des mutations dans les gènes codant pour l'axine et l'APC (impliqués dans l'inhibition de la voie canonique) et à une expression diminuée de SFRPs [124,125].

Tous les défauts de signalisation de la voie des WNTs précédemment décrits n'ont cependant été observés que dans des cas de cancer ovariens d'origine épithéliale seulement. Le cancer des cellules de la granulosa chez l'humain, du moins chez l'adulte, semble quant à lui peu relié à la voie de signalisation des WNTs [126]. Pour l'instant, ces données cliniques sont malheureusement difficilement associables aux données recueillies grâce aux modèles murins créés au cours des dernières années. Par exemple, les souris *Sfrp4* KO n'ont pas développé de pathologies associées à la couche épithéliale de l'ovaire. De plus, les lignées de souris qui développent un cancer des cellules de la granulosa suite à une altération de la voie des WNTs ne modélisent pas de façon très fidèle le cancer des cellules de la granulosa humain [127]. Finalement, le PCOS n'est pas assez caractérisé au niveau moléculaire pour permettre de l'associer formellement à une lignée de souris dont la voie des WNTs a été modifiée génétiquement. À ce jour, nos modèles murins ne sont donc pas encore idéaux pour permettre la compréhension exacte de maladies ovariennes humaines.

Finalement, les données cliniques présentées ci-dessus suggèrent qu'une des possibles stratégies pour traiter certaines des maladies ovariennes humaines serait le rétablissement de la voie de signalisation des WNTs. Par exemple, des études *in vitro* démontrent la possibilité d'induire l'apoptose chez une lignée de cellules ovariennes cancéreuses grâce à l'inhibition de la GSK3 β (voir Figure 1.10) [128]. Néanmoins, les recherches portant sur la mise au point de tels traitements sont à leurs tous débuts et nécessiteront encore plusieurs années avant de parvenir à un aboutissement [124]. Les modèles murins énumérés tout au long de cette thèse, même s'ils ne peuvent être associés directement aux processus pathologiques humains, seront cependant peut-être très utiles pour la découverte de divers procédés visant à restituer la normalité de la signalisation ovarienne *in vivo*. Ces méthodes pourront par la suite peut-être servir au traitement du cancer ovarien d'origine épithéliale, du PCOS ou au traitement d'autres cancers non-ovariens associés à une activité WNT/ β -caténine aberrante [61].

4.5 Conclusion générale

En conclusion, cette thèse a permis de faire avancer la compréhension de la voie de signalisation des WNTs au niveau de la régulation ovarienne. Nous avons d'abord réussi à élucider, en grande partie, le rôle des protéines FZD1 et SFRP4 dans l'ovaire. Nous avons ainsi déterminé que FZD1 est nécessaire à la régulation des gènes reliés au processus d'expansion du cumulus au niveau du COC. Nous avons aussi constaté que ce récepteur n'est pas essentiel à la transduction du signal par WNT4, comme il avait préalablement été présumé. Nos expériences ont aussi permis de démontrer que l'antagoniste SFRP4 modère les gènes reliés à l'expansion du cumulus, principalement dans les cellules de la granulosa. De plus, les résultats suggèrent que les protéines WNT4 et WNT5a pourraient réguler positivement la transcription des gènes associés à l'expansion du cumulus, possiblement en activant une voie de signalisation non-canonique. Ces protéines pourraient d'ailleurs être les candidates qui doivent être régulées négativement par SFRP4 en contexte physiologique au moment de l'ovulation. Tous ces résultats que nous avons récoltés, lorsqu'intégrés à la littérature

existante, ont par la suite permis la création d'un modèle de signalisation hypothétique qui devra être confirmé par de nombreuses analyses.

Bien que nos expériences n'aient été faites qu'avec un modèle murin, nous sommes confiants qu'elles auront un jour un impact significatif sur la santé humaine. Dans plusieurs années, ces données feront probablement partie intégrante d'un énorme modèle de signalisation impliquant plusieurs autres molécules encore inconnues à ce jour. Il sera à ce moment possible de mieux comprendre les maladies ovariennes humaines, ce qui permettra conséquemment l'élaboration de traitements précis et efficaces. Cette thèse aura donc assurément contribué à faire avancer la science d'un pas de plus.

Références

1. Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, Valentini S, Guerra L, Schedl A, Camerino G. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 2006; 38:1304-1309.
2. Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 1999; 397:405-409.
3. Ottolenghi C, Omari S, Garcia-Ortiz JE, Uda M, Crisponi L, Forabosco A, Pilia G, Schlessinger D. Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation. *Hum Mol Genet* 2005; 14:2053-2062.
4. Motta PM, Nottola SA, Makabe S. Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997; 75:5-10.
5. Pepling ME, de Cuevas M, Spradling AC. Germline cysts: a conserved phase of germ cell development? *Trends Cell Biol* 1999; 9:257-262.
6. Tingen C, Kim A, Woodruff TK. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Mol Hum Reprod* 2009; 15:795-803.
7. Gore AC. Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 2008; 29:358-374.
8. Ojeda SR, Lomniczi A, Loche A, Matagne V, Kaidar G, Sandau US, Dissen GA. The transcriptional control of female puberty. *Brain Res* 2010; 1364:164-174.
9. Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev* 2009; 30:713-743.
10. Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, Serin A, Mungan NO, Cook JR, Ozbek MN, Imamoglu S, Akalin NS, et al. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 2009; 41:354-358.
11. Binelli M, Murphy BD. Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22:1-12.
12. Choi Y, Rajkovic A. Genetics of early mammalian folliculogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63:579-590.
13. Drummond AE. TGFbeta signalling in the development of ovarian function. *Cell Tissue Res* 2005; 322:107-115.
14. Young JM, McNeilly AS. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction* 2010; 140:489-504.
15. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996; 383:531-535.
16. Kaipia A, Hsueh AJ. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol* 1997; 59:349-363.

17. Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev* 2009; 30:624-712.
18. Simpson ER, Misso M, Hewitt KN, Hill RA, Boon WC, Jones ME, Kovacic A, Zhou J, Clyne CD. Estrogen--the good, the bad, and the unexpected. *Endocr Rev* 2005; 26:322-330.
19. Wickenheisser JK, Nelson-DeGrave VL, McAllister JM. Human ovarian theca cells in culture. *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17:65-71.
20. Lapointe E, Boerboom D. WNT signaling and the regulation of ovarian steroidogenesis. *Front Biosci (Schol Ed)* 2011; 3:276-285.
21. Huang HJ, Sebastian J, Strahl BD, Wu JC, Miller WL. Transcriptional regulation of the ovine follicle-stimulating hormone-beta gene by activin and gonadotropin-releasing hormone (GnRH): involvement of two proximal activator protein-1 sites for GnRH stimulation. *Endocrinology* 2001; 142:2267-2274.
22. Lebrun JJ, Vale WW. Activin and inhibin have antagonistic effects on ligand-dependent heteromerization of the type I and type II activin receptors and human erythroid differentiation. *Mol Cell Biol* 1997; 17:1682-1691.
23. Aerts JM, Bols PE. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. *Reprod Domest Anim* 2010; 45:180-187.
24. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21:200-214.
25. Messinis IE, Messini CI, Dafopoulos K. The role of gonadotropins in the follicular phase. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1205:5-11.
26. Salustri A, Camaioni A, Di Giacomo M, Fulop C, Hascall VC. Hyaluronan and proteoglycans in ovarian follicles. *Hum Reprod Update* 1999; 5:293-301.
27. Zhuo L, Kimata K. Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation. *Cell Struct Funct* 2001; 26:189-196.
28. Conneely OM. Progesterone receptors and ovulation. *Handb Exp Pharmacol* 2010; 37-44.
29. Conti M, Hsieh M, Zamah AM, Oh JS. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 356:65-73.
30. Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest* 2010; 120:963-972.
31. Duggavathi R, Volle DH, Matakis C, Antal MC, Messaddeq N, Auwerx J, Murphy BD, Schoonjans K. Liver receptor homolog 1 is essential for ovulation. *Genes Dev* 2008; 22:1871-1876.
32. Sterneck E, Tessarollo L, Johnson PF. An essential role for C/EBPbeta in female reproduction. *Genes Dev* 1997; 11:2153-2162.
33. Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Jr., Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 1995; 9:2266-2278.
34. Son WY, Das M, Shalom-Paz E, Holzer H. Mechanisms of follicle selection and development. *Minerva Ginecol* 2011; 63:89-102.

35. Fayad T, Lefebvre R, Nimpf J, Silversides DW, Lussier JG. Low-density lipoprotein receptor-related protein 8 (LRP8) is upregulated in granulosa cells of bovine dominant follicle: molecular characterization and spatio-temporal expression studies. *Biol Reprod* 2007; 76:466-475.
36. Liu Z, de Matos DG, Fan HY, Shimada M, Palmer S, Richards JS. Interleukin-6: an autocrine regulator of the mouse cumulus cell-oocyte complex expansion process. *Endocrinology* 2009; 150:3360-3368.
37. Gershon E, Hourvitz A, Reikhav S, Maman E, Dekel N. Low expression of COX-2, reduced cumulus expansion, and impaired ovulation in SULT1E1-deficient mice. *FASEB J* 2007; 21:1893-1901.
38. Richards JS. Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 234:75-79.
39. Papachroni KK, Piperi C, Levidou G, Korkolopoulou P, Pawelczyk L, Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG. Lysyl oxidase interacts with AGE signalling to modulate collagen synthesis in polycystic ovarian tissue. *J Cell Mol Med* 2010; 14:2460-2469.
40. Fan HY, O'Connor A, Shitanaka M, Shimada M, Liu Z, Richards JS. Beta-catenin (CTNNB1) promotes preovulatory follicular development but represses LH-mediated ovulation and luteinization. *Mol Endocrinol* 2010; 24:1529-1542.
41. Hampl A, Pachernik J, Dvorak P. Levels and interactions of p27, cyclin D3, and CDK4 during the formation and maintenance of the corpus luteum in mice. *Biol Reprod* 2000; 62:1393-1401.
42. Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Shimada M, Wayne CM, Ochsner SA, White L, Richards JS. Gene expression profiles of cumulus cell oocyte complexes during ovulation reveal cumulus cells express neuronal and immune-related genes: does this expand their role in the ovulation process? *Mol Endocrinol* 2006; 20:1300-1321.
43. Li F, Liu J, Park ES, Jo M, Curry TE, Jr. The B cell translocation gene (BTG) family in the rat ovary: hormonal induction, regulation, and impact on cell cycle kinetics. *Endocrinology* 2009; 150:3894-3902.
44. Hou X, Arvisais EW, Jiang C, Chen DB, Roy SK, Pate JL, Hansen TR, Rueda BR, Davis JS. Prostaglandin F2alpha stimulates the expression and secretion of transforming growth factor B1 via induction of the early growth response 1 gene (EGR1) in the bovine corpus luteum. *Mol Endocrinol* 2008; 22:403-414.
45. Kim SG, Jang SJ, Soh J, Lee K, Park JK, Chang WK, Park EW, Chun SY. Expression of ectodermal neural cortex 1 and its association with actin during the ovulatory process in the rat. *Endocrinology* 2009; 150:3800-3806.
46. Myers M, Tripurani SK, Middlebrook B, Economides AN, Canalis E, Pangas SA. Loss of gremlin delays primordial follicle assembly but does not affect female fertility in mice. *Biol Reprod* 2011; 85:1175-1182.
47. Salazar G, Falcon-Perez JM, Harrison R, Faundez V. SLC30A3 (ZnT3) oligomerization by dityrosine bonds regulates its subcellular localization and metal transport capacity. *PLoS One* 2009; 4:e5896.

48. Kuo SW, Ke FC, Chang GD, Lee MT, Hwang JJ. Potential role of follicle-stimulating hormone (FSH) and transforming growth factor (TGFbeta1) in the regulation of ovarian angiogenesis. *J Cell Physiol* 2011; 226:1608-1619.
49. Otsuka F, McTavish KJ, Shimasaki S. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Mol Reprod Dev* 2011; 78:9-21.
50. Liu YJ, Nakamura T, Nakano T. Essential role of DPPA3 for chromatin condensation in mouse oocytogenesis. *Biol Reprod* 2012; 86:40.
51. Fernandes R, Tsuda C, Perumalsamy AL, Naranian T, Chong J, Acton BM, Tong ZB, Nelson LM, Jurisicova A. NLRP5 mediates mitochondrial function in mouse oocytes and embryos. *Biol Reprod* 2012; 86:138, 131-110.
52. Kawasoe T, Furukawa Y, Daigo Y, Nishiwaki T, Ishiguro H, Fujita M, Satoh S, Miwa N, Nagasawa Y, Miyoshi Y, Ogawa M, Nakamura Y. Isolation and characterization of a novel human gene, DRCTNNB1A, the expression of which is down-regulated by beta-catenin. *Cancer Res* 2000; 60:3354-3358.
53. Stocco C, Telleria C, Gibori G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev* 2007; 28:117-149.
54. Camp TA, Rahal JO, Mayo KE. Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Mol Endocrinol* 1991; 5:1405-1417.
55. Seedorf U, Ellinghaus P, Roch Nofer J. Sterol carrier protein-2. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1486:45-54.
56. Nusse R, van Ooyen A, Cox D, Fung YK, Varmus H. Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (int-1) on mouse chromosome 15. *Nature* 1984; 307:131-136.
57. Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 1982; 31:99-109.
58. Hoppler S, Kavanagh CL. Wnt signalling: variety at the core. *J Cell Sci* 2007; 120:385-393.
59. Wang HX, Tekpetey FR, Kidder GM. Identification of WNT/beta-CATENIN signaling pathway components in human cumulus cells. *Mol Hum Reprod* 2009; 15:11-17.
60. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 1997; 11:3286-3305.
61. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006; 127:469-480.
62. Huang H, He X. Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20:119-125.
63. Sonderegger S, Pollheimer J, Knofler M. Wnt signalling in implantation, decidualisation and placental differentiation--review. *Placenta* 2010; 31:839-847.
64. Essers MA, de Vries-Smits LM, Barker N, Polderman PE, Burgering BM, Korswagen HC. Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science* 2005; 308:1181-1184.

65. Salisbury TB, Binder AK, Nilson JH. Welcoming beta-catenin to the gonadotropin-releasing hormone transcriptional network in gonadotropes. *Mol Endocrinol* 2008; 22:1295-1303.
66. Mulholland DJ, Dedhar S, Coetzee GA, Nelson CC. Interaction of nuclear receptors with the Wnt/beta-catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know? *Endocr Rev* 2005; 26:898-915.
67. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 2004; 303:1483-1487.
68. Xu Q, Wang Y, Dabdoub A, Smallwood PM, Williams J, Woods C, Kelley MW, Jiang L, Tasman W, Zhang K, Nathans J. Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* 2004; 116:883-895.
69. Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stannek P, Walter C, Glinka A, Niehrs C. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 2002; 417:664-667.
70. Itasaki N, Jones CM, Mercurio S, Rowe A, Domingos PM, Smith JC, Krumlauf R. Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling. *Development* 2003; 130:4295-4305.
71. Semenov M, Tamai K, He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem* 2005; 280:26770-26775.
72. Takemaru K, Yamaguchi S, Lee YS, Zhang Y, Carthew RW, Moon RT. Chibby, a nuclear beta-catenin-associated antagonist of the Wnt/Wingless pathway. *Nature* 2003; 422:905-909.
73. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000; 14:1837-1851.
74. Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* 2006; 4:e115.
75. Wansleben C, Meijlink F. The planar cell polarity pathway in vertebrate development. *Dev Dyn* 2011; 240:616-626.
76. Staal FJ, Luis TC, Tiemessen MM. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:581-593.
77. Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S, Nishita M, Meneghini M, Barker N, Waterman M, Bowerman B, Clevers H, Shibuya H, Matsumoto K. The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature* 1999; 399:798-802.
78. Jeays-Ward K, Hoyle C, Brennan J, Dandonneau M, Alldus G, Capel B, Swain A. Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad. *Development* 2003; 130:3663-3670.
79. Heikkila M, Peltoketo H, Leppaluoto J, Ilves M, Vuolteenaho O, Vainio S. Wnt-4 deficiency alters mouse adrenal cortex function, reducing aldosterone production. *Endocrinology* 2002; 143:4358-4365.
80. Yao HH, Matzuk MM, Jorgez CJ, Menke DB, Page DC, Swain A, Capel B. Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Dev Dyn* 2004; 230:210-215.

81. Jaaskelainen M, Prunskaitė-Hyyryläinen R, Naillat F, Parviainen H, Anttonen M, Heikinheimo M, Liakka A, Ola R, Vainio S, Vaskivuo TE, Tapanainen JS. WNT4 is expressed in human fetal and adult ovaries and its signaling contributes to ovarian cell survival. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 317:106-111.
82. Heikkilä M, Prunskaitė R, Naillat F, Itaranta P, Vuoristo J, Leppaluoto J, Peltoketo H, Vainio S. The partial female to male sex reversal in Wnt-4-deficient females involves induced expression of testosterone biosynthetic genes and testosterone production, and depends on androgen action. *Endocrinology* 2005; 146:4016-4023.
83. Jordan BK, Shen JH, Olaso R, Ingraham HA, Vilain E. Wnt4 overexpression disrupts normal testicular vasculature and inhibits testosterone synthesis by repressing steroidogenic factor 1/beta-catenin synergy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:10866-10871.
84. Liu CF, Parker K, Yao HH. WNT4/beta-catenin pathway maintains female germ cell survival by inhibiting activin betaB in the mouse fetal ovary. *PLoS One* 2010; 5:e10382.
85. Biason-Lauber A, Konrad D, Navratil F, Schoenle EJ. A WNT4 mutation associated with Mullerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *N Engl J Med* 2004; 351:792-798.
86. Biason-Lauber A, De Filippo G, Konrad D, Scarano G, Nazzaro A, Schoenle EJ. WNT4 deficiency--a clinical phenotype distinct from the classic Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: a case report. *Hum Reprod* 2007; 22:224-229.
87. Philibert P, Biason-Lauber A, Rouzier R, Pienkowski C, Paris F, Konrad D, Schoenle E, Sultan C. Identification and functional analysis of a new WNT4 gene mutation among 28 adolescent girls with primary amenorrhea and mullerian duct abnormalities: a French collaborative study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:895-900.
88. Philibert P, Biason-Lauber A, Gueorguieva I, Stuckens C, Pienkowski C, Lebon-Labich B, Paris F, Sultan C. Molecular analysis of WNT4 gene in four adolescent girls with mullerian duct abnormality and hyperandrogenism (atypical Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome). *Fertil Steril* 2011; 95:2683-2686.
89. Cederroth CR, Pitetti JL, Papaioannou MD, Nef S. Genetic programs that regulate testicular and ovarian development. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 265-266:3-9.
90. Bouma GJ, Hart GT, Washburn LL, Recknagel AK, Eicher EM. Using real time RT-PCR analysis to determine multiple gene expression patterns during XX and XY mouse fetal gonad development. *Gene Expr Patterns* 2004; 5:141-149.
91. Chassot AA, Ranc F, Gregoire EP, Roepers-Gajadien HL, Taketo MM, Camerino G, de Rooij DG, Schedl A, Chaboissier MC. Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum Mol Genet* 2008; 17:1264-1277.
92. Tomizuka K, Horikoshi K, Kitada R, Sugawara Y, Iba Y, Kojima A, Yoshitome A, Yamawaki K, Amagai M, Inoue A, Oshima T, Kakitani M. R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Hum Mol Genet* 2008; 17:1278-1291.

93. Tomaselli S, Megiorni F, Lin L, Mazzilli MC, Gerrelli D, Majore S, Grammatico P, Achermann JC. Human RSPO1/R-spondin1 is expressed during early ovary development and augments beta-catenin signaling. *PLoS One* 2011; 6:e16366.
94. Chassot AA, Gregoire EP, Lavery R, Taketo MM, de Rooij DG, Adams IR, Chaboissier MC. RSPO1/beta-catenin signaling pathway regulates oogonia differentiation and entry into meiosis in the mouse fetal ovary. *PLoS One* 2011; 6:e25641.
95. Maatouk DM, DiNapoli L, Alvers A, Parker KL, Taketo MM, Capel B. Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum Mol Genet* 2008; 17:2949-2955.
96. Liu CF, Bingham N, Parker K, Yao HH. Sex-specific roles of beta-catenin in mouse gonadal development. *Hum Mol Genet* 2009; 18:405-417.
97. Baltus AE, Menke DB, Hu YC, Goodheart ML, Carpenter AE, de Rooij DG, Page DC. In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat Genet* 2006; 38:1430-1434.
98. Kumar S, Chatzi C, Brade T, Cunningham TJ, Zhao X, Duester G. Sex-specific timing of meiotic initiation is regulated by Cyp26b1 independent of retinoic acid signalling. *Nat Commun* 2011; 2:151.
99. Naillat F, Prunskaitė-Hyyryläinen R, Pietilä I, Sormunen R, Jokela T, Shan J, Vainio SJ. Wnt4/5a signalling coordinates cell adhesion and entry into meiosis during presumptive ovarian follicle development. *Hum Mol Genet* 2010; 19:1539-1550.
100. Hsieh M, Johnson MA, Greenberg NM, Richards JS. Regulated expression of Wnts and Frizzleds at specific stages of follicular development in the rodent ovary. *Endocrinology* 2002; 143:898-908.
101. Ricken A, Lochhead P, Kontogianna M, Farookhi R. Wnt signaling in the ovary: identification and compartmentalized expression of wnt-2, wnt-2b, and frizzled-4 mRNAs. *Endocrinology* 2002; 143:2741-2749.
102. Wolf V, Ke G, Dharmarajan AM, Bielke W, Artuso L, Saurer S, Friis R. DDC-4, an apoptosis-associated gene, is a secreted frizzled relative. *FEBS Lett* 1997; 417:385-389.
103. Hsieh M, Mulders SM, Friis RR, Dharmarajan A, Richards JS. Expression and localization of secreted frizzled-related protein-4 in the rodent ovary: evidence for selective up-regulation in luteinized granulosa cells. *Endocrinology* 2003; 144:4597-4606.
104. Guo K, Wolf V, Dharmarajan AM, Feng Z, Bielke W, Saurer S, Friis R. Apoptosis-associated gene expression in the corpus luteum of the rat. *Biol Reprod* 1998; 58:739-746.
105. Drake JM, Friis RR, Dharmarajan AM. The role of sFRP4, a secreted frizzled-related protein, in ovulation. *Apoptosis* 2003; 8:389-397.
106. Maman E, Yung Y, Cohen B, Konopnicki S, Dal Canto M, Fadini R, Kanety H, Kedem A, Dor J, Hourvitz A. Expression and regulation of sFRP family members in human granulosa cells. *Mol Hum Reprod* 2011; 17:399-404.

107. Hsieh M, Boerboom D, Shimada M, Lo Y, Parlow AF, Luhmann UF, Berger W, Richards JS. Mice null for Frizzled4 (Fzd4^{-/-}) are infertile and exhibit impaired corpora lutea formation and function. *Biol Reprod* 2005; 73:1135-1146.
108. Boyer A, Lapointe E, Zheng X, Cowan RG, Li H, Quirk SM, DeMayo FJ, Richards JS, Boerboom D. WNT4 is required for normal ovarian follicle development and female fertility. *FASEB J* 2010; 24:3010-3025.
109. Wang HX, Li TY, Kidder GM. WNT2 regulates DNA synthesis in mouse granulosa cells through beta-catenin. *Biol Reprod* 2010; 82:865-875.
110. Finnon KW, Kontogianna M, Li X, Farookhi R. Characterization of Wnt2 Overexpression in a Rat Granulosa Cell Line (DC3): Effects on CTNNB1 Activation. *Biol Reprod* 2012;
111. Boerboom D, Paquet M, Hsieh M, Liu J, Jamin SP, Behringer RR, Sirois J, Taketo MM, Richards JS. Misregulated Wnt/beta-catenin signaling leads to ovarian granulosa cell tumor development. *Cancer Res* 2005; 65:9206-9215.
112. Hernandez Gifford JA, Hunzicker-Dunn ME, Nilson JH. Conditional deletion of beta-catenin mediated by Amhr2cre in mice causes female infertility. *Biol Reprod* 2009; 80:1282-1292.
113. Parakh TN, Hernandez JA, Grammer JC, Weck J, Hunzicker-Dunn M, Zeleznik AJ, Nilson JH. Follicle-stimulating hormone/cAMP regulation of aromatase gene expression requires beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:12435-12440.
114. Danesh K, Durrett R, Havrilesky LJ, Myers E. A branching process model of ovarian cancer. *J Theor Biol* 2012; 314C:10-15.
115. Legro RS, Driscoll D, Strauss JF, 3rd, Fox J, Dunaif A. Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:14956-14960.
116. Legro RS, Spielman R, Urbanek M, Driscoll D, Strauss JF, 3rd, Dunaif A. Phenotype and genotype in polycystic ovary syndrome. *Recent Prog Horm Res* 1998; 53:217-256.
117. Goodman HM. Discovery of the luteinizing hormone of the anterior pituitary gland. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287:E818-819.
118. Gurney A, Axelrod F, Bond CJ, Cain J, Chartier C, Donigan L, Fischer M, Chaudhari A, Ji M, Kapoun AM, Lam A, Lazetic S, et al. Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109:11717-11722.
119. Mii Y, Taira M. Secreted Wnt "inhibitors" are not just inhibitors: regulation of extracellular Wnt by secreted Frizzled-related proteins. *Dev Growth Differ* 2011; 53:911-923.
120. Topol L, Jiang X, Choi H, Garrett-Beal L, Carolan PJ, Yang Y. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J Cell Biol* 2003; 162:899-908.
121. Chazenbalk G, Chen YH, Heneidi S, Lee JM, Pall M, Chen YD, Azziz R. Abnormal expression of genes involved in inflammation, lipid metabolism, and Wnt signaling in the adipose tissue of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97:E765-770.

122. Canto P, Soderlund D, Carranza-Lira S, Mendez JP. Mutation analysis of the WNT-4 gene in patients with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2006; 22:484-487.
123. Bitler BG, Nicodemus JP, Li H, Cai Q, Wu H, Hua X, Li T, Birrer MJ, Godwin AK, Cairns P, Zhang R. Wnt5a suppresses epithelial ovarian cancer by promoting cellular senescence. *Cancer Res* 2011; 71:6184-6194.
124. Gatcliffe TA, Monk BJ, Planutis K, Holcombe RF. Wnt signaling in ovarian tumorigenesis. *Int J Gynecol Cancer* 2008; 18:954-962.
125. Jacob F, Ukegjini K, Nixdorf S, Ford CE, Olivier J, Caduff R, Scurry JP, Guertler R, Hornung D, Mueller R, Fink DA, Hacker NF, et al. Loss of secreted frizzled-related protein 4 correlates with an aggressive phenotype and predicts poor outcome in ovarian cancer patients. *PLoS One* 2012; 7:e31885.
126. Richards JS, Fan HY, Liu Z, Tsoi M, Lague MN, Boyer A, Boerboom D. Either Kras activation or Pten loss similarly enhance the dominant-stable CTNNB1-induced genetic program to promote granulosa cell tumor development in the ovary and testis. *Oncogene* 2012; 31:1504-1520.
127. Jamieson S, Fuller PJ. Molecular pathogenesis of granulosa cell tumors of the ovary. *Endocr Rev* 2012; 33:109-144.
128. Hilliard TS, Gaisina IN, Muehlbauer AG, Gaisin AM, Gallier F, Burdette JE. Glycogen synthase kinase 3beta inhibitors induce apoptosis in ovarian cancer cells and inhibit in-vivo tumor growth. *Anticancer Drugs* 2011; 22:978-985.

