

La physiologie ovarienne : ce que nous disent les souris...

Philippe Monget
Stéphanie Hembert
Nadine Binart
Alain Gougeon
Jean-Jacques Panthier

La souris, éprouvette vivante, permet d'approcher la fonction du produit des gènes par les effets observés après leur invalidation ou leur surexpression. A chaque étape, de l'organogenèse ovarienne à la fécondation de l'ovule, l'activation de certains gènes est indispensable. Certains sont d'expression ubiquiste, d'autres sont, à l'inverse, très spécifiques, contrôlant la constitution du stock de cellules germinales, la croissance et la différenciation du follicule puis l'ovulation... Si le fait que les gonadotrophines hypothalamo-hypophysaires soient indispensables à la croissance du follicule n'a surpris personne, la mise en évidence des rôles de la leptine et du facteur hypothalamique Nhlh2, entre autres, a permis de préciser les liens entre métabolisme et fertilité.

ADRESSES

Ph. Monget: *chargé de recherche à l'Inra*. S. Hembert: *étudiante en thèse*; Inra, Station de physiologie de la reproduction des mammifères domestiques, Ura Cnrs 1291, 37380 Nouzilly, France. N. Binart: *directeur de recherche à l'Inserm*; Inserm U. 344, Endocrinologie moléculaire, Faculté de médecine Necker, 156, rue de Vaugirard, 75730 Paris Cedex 15, France. A. Gougeon: *directeur de recherche à l'Inserm*; Inserm U. 407, Faculté de médecine Lyon Sud, BP 12, 69921 Oullins Cedex, France. J.J. Panthier: *professeur à l'école vétérinaire d'Alfort (ENVA) et directeur de l'Ura Inra de génétique moléculaire de l'ENVA*; Ura Inra de génétique moléculaire, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, 7, avenue du Général-de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort Cedex, France.

La souris est à l'heure actuelle le seul mammifère chez lequel on peut étudier les conséquences de l'inactivation ou de la surexpression d'un gène donné. A ce jour plus de mille mutations ciblées ont été créées dans cette espèce. Elle est devenue à ce titre un outil inégalé pour tester la fonction biologique des gènes. Nous nous proposons de passer en revue les mutations ciblées mais également spontanées ayant des effets sur la fertilité des femelles. Pour éviter de diluer le propos et par souci de clarté, nous ne parlerons pas systématiquement, et de toute façon très brièvement, des effets chez le mâle.

Les caractéristiques principales de la folliculogenèse sont semblables chez la femme et chez la souris. Cependant, quelques différences méritent d'être relevées: la croissance follicu-

laire dure environ 45 jours chez la souris au lieu d'environ 6 mois chez la femme. Les follicules murins ovulent lorsqu'ils atteignent environ 800 µm, contre 20 mm dans l'espèce humaine. Et, surtout, le cycle génital dure 4 à 5 jours chez la souris au lieu de 28 jours chez la femme; la faible durée de la phase lutéale chez la souris est à l'origine de cette différence. L'extrapolation à la femme des résultats obtenus chez la souris doit donc toujours être faite avec prudence.

**Ce que nous disent
les souris sur...
la différenciation sexuelle
et l'organogenèse
de l'ovaire**

Les expériences de transgénèse ont permis de confirmer l'importance du gène *Sry* et de l'hormone antimüllé-

rienne (AMH) dans la différenciation sexuelle. En effet la surexpression du gène *Sry* par transgénèse aboutit à une inversion du sexe: les souris XX transgéniques pour le gène *Sry* ont des testicules [1]. Cependant ces testicules sont dépourvus de gamètes, ce qui souligne l'implication d'autres gènes dans la spermatogenèse. De même, la surexpression du gène de l'AMH chez la souris femelle induit non seulement une régression des canaux de Müller, mais également une dégénérescence des cellules germinales [1]. De plus, l'inactivation des gènes *WT1* (*Wilms Tumor associated gene*) et *SF1* (*Steroidogenic Factor-1*) a permis de montrer leur rôle-clé dans l'organogenèse des gonades. Plus précisément, l'absence de facteur *Wt1* aboutit à un arrêt de la différenciation du mésonéphros [1], tandis que celle du facteur *SF1* conduit à une perturbation très profonde de la différenciation de l'axe gonadotrope et surrénalien [1].

... sur la constitution du stock de cellules germinales

Plusieurs gènes jouant un rôle dans l'établissement de la population des cellules germinales ont été identifiés. Ainsi, le système récepteur à activité tyrosine kinase/ligand *Kit/Mgf* est indispensable à la survie des cellules primordiales germinales (PGC). En l'absence d'un système *Kit/Mgf* fonctionnel, les PGC meurent avant d'atteindre les ébauches gonadiques [2]. D'une façon similaire, l'inactivation de *Dazla* (*DAZ-like autosomal*) et de *TIAR* (*T-cell restricted intracellular antigen related protein*), qui codent toutes deux pour des protéines de liaison à l'ARN, conduit chez la souris à une absence de cellules germinales dans les deux sexes, à une agénésie des gonades et à une stérilité (*m/s* 1997, n° 12, p. 1486) [3, 4]. Des mutations au locus *Dazla* sont d'ailleurs suspectées d'être responsables d'anomalies de la spermatogenèse chez l'homme. L'inactivation du gène *Zfx* (*X-linked zinc finger protein*) altère également la constitution de la population des cellules germinales [5]. L'expression de ce gène est ubiquiste dans les deux sexes, et son inactivation aboutit à une réduction

du poids corporel d'environ 20%. Les mâles sont fertiles, malgré une baisse d'environ 50% du nombre des cellules germinales. Les femelles, en revanche, souffrent d'une baisse de fertilité liée à une réduction d'environ 75% du nombre de cellules germinales; leur durée de vie sexuelle est très courte. Soulignons ici l'analogie phénotypique entre les femelles *Zfx*^{-/-} et les femmes qui présentent un syndrome de déficit ovarien précoce, caractérisé par de fréquentes anomalies chromosomiques dans la région du gène *ZFX* sur le chromosome X, dont la forme la plus connue est le syndrome de Turner (45, XO).

Des anomalies de la méiose sont observées chez les souris femelles portant une inactivation du gène codant pour la sérine-thréonine kinase *Mos* [6]. Plus particulièrement, alors que chez les souris sauvages la méiose ovocytaire est bloquée en métaphase II après l'ovulation – elle ne reprend

qu'après la fécondation –, la méiose n'est pas bloquée chez les femelles *Mos*^{-/-}, ce qui aboutit à une activation parthénogénétique spontanée des ovocytes non fécondés (*m/s* 1994, n° 10, p. 1054). Les femelles *Mos*^{-/-} présentent également des kystes ovariens, et une fréquence élevée de tératomes.

Enfin des anomalies de recombinaison méiotique pourraient être responsables des troubles de fertilité observés chez les souris *Fac*^{-/-}. En effet chez l'homme, le gène *FAC* est muté chez des patients qui développent une anémie, dite anémie de Fanconi. Ces malades présentent également des malformations congénitales, une prédisposition à développer des tumeurs, et une fréquence élevée de cassures chromosomiques. Les patientes souffrant d'une anémie de Fanconi présentent également des troubles de la fertilité, caractérisés par des menstruations irrégulières et une ménopause anormalement précoce. Chez la souris, l'inactivation du

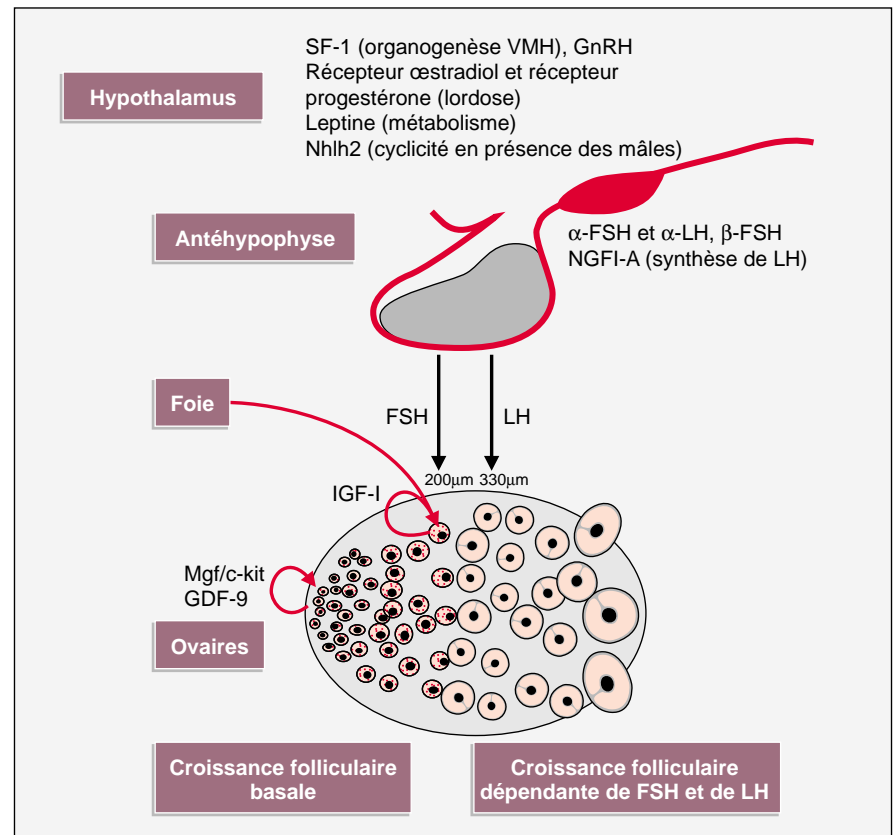


Figure 1. **Compartiments préférentiellement touchés par l'inactivation des gènes impliqués dans la régulation endocrine et paracrine de la folliculogénèse ovarienne.**

gène *Fac* n'est pas associée à une anémie ; elle est néanmoins responsable de stérilité dans les deux sexes, les gonades renfermant un nombre extrêmement faible de cellules germinales [7]. Il est probable que le déficit en protéine FAC soit responsable d'anomalies de réparation de l'ADN, les effets de ces anomalies étant en tout premier lieu détectés dans des cellules caractérisées par des taux de recombinaison élevés.

... sur les facteurs endocrines et paracrines dans l'ovaire

Chez les mammifères, il existe deux grandes phases dans la croissance d'un follicule ovarien. La phase de croissance dite « basale » va du follicule primordial jusqu'au follicule de 200 µm (grand préantral) chez la souris, et de 5 mm chez la femme. Elle est essentiellement sous la dépendance de facteurs de croissance à action paracrine. La phase de croissance dite « dépendante des gonadotrophines », va de la fin de la croissance « basale » jusqu'à l'ovulation.

Un nombre incalculable de travaux ont permis de montrer sans ambiguïté le rôle de facteurs de croissance faisant partie de la famille de l'EGF, des IGF, du TGFβ ou du FGF sur les cellules de granulosa de différentes espèces *in vitro*. Pourtant, très peu de données ont pour le moment permis de replacer ces résultats dans le contexte du développement folliculaire *in vivo* et, en particulier, au cours de ses toutes premières étapes. La raison tient au caractère à la fois ubiquiste et vital de bon nombre de ces facteurs, qui empêche souvent la production de souris mutantes viables.

Seule l'inactivation de quatre facteurs a conduit à un blocage de la croissance folliculaire « basale » : GDF9, Mgf, Kit et l'IGF-I. Les trois premiers sont caractérisés par une grande spécificité d'expression, à la différence de l'IGF-I et de bon nombre de facteurs de croissance. GDF9 en particulier, un facteur de la famille du TGFβ, est exprimé spécifiquement dans l'ovocyte chez la souris. L'inactivation de son gène aboutit à un blocage très précoce de la croissance folliculaire, au stade grand follicule primaire [8]. Le Mgf et son

récepteur Kit sont exprimés, respectivement, par la granulosa et l'ovocyte. Comme pour le GDF9, des mutations dans le gène du Mgf ou de Kit conduisent à un blocage au stade du follicule primaire [2].

Quant à l'IGF-I, son inactivation aboutit à un blocage de la croissance folliculaire au stade préantral, non levé par une stimulation gonadotrope [9]. L'IGF-I semble donc jouer un rôle-clé dans le passage de la folliculogénèse basale à la folliculogénèse dépendante des gonadotrophines.

A la différence du petit nombre de mutations qui affectent la croissance folliculaire basale, de très nombreux résultats ont permis de confirmer le véritable rôle de « chefs d'orchestre » des gonadotrophines hypophysaires dans la croissance folliculaire terminale. Ainsi, la mutation naturelle *hypogonadal* (*hpg/hpg*, délétion de la partie distale du gène *Gnrh* [10]), l'inactivation de la sous-unité α des gonadotrophines [11], de la sous-unité β de la FSH [12], ainsi que la surexpression de la sous-unité α de la toxine diphtérique dans les cellules gonadotropes [13], aboutissent toutes à un arrêt de synthèse des gonadotrophines hypophysaires, et à un blocage de la folliculogénèse au stade 200 µm. Quant à l'extinction du gène de la sous-unité β de la LH, consécutive à l'inactivation du gène codant pour le facteur de transcription Krox24, ou *NgfiA* [14, 15], elle aboutit à un blocage de la croissance folliculaire au stade 330 µm de diamètre. Signalons qu'une mutation nulle dans le gène de la sous-unité β de la FSH, ainsi que de son récepteur, ont été récemment identifiées chez des femmes chez lesquelles on avait diagnostiqué une stérilité avec altération profonde de la croissance folliculaire. Curieusement, chez l'homme comme chez la souris, la fertilité des mâles semble peu ou pas modifiée par une perturbation des niveaux ou de l'action de la FSH, même si la spermatogénèse est affectée (*m/s* 1993, n° 4, p. 481 ; 1997, n° 4, p. 584).

A l'inverse, l'augmentation des concentrations sériques en FSH, consécutive à l'inactivation du gène de la sous-unité α de l'inhibine, provoque l'apparition de tumeurs des gonades dès l'âge de 20 jours (*m/s* 1993, n° 1, p. 100) [16, 17]. Par

ailleurs, la surexpression de LH provoque chez la souris une baisse de fertilité avec dysovulation, formation de kystes ovariens rappelant la symptomatologie des ovaires polykystiques, ainsi qu'un allongement de la durée de la phase lutéale [18]. Des tumeurs de la thèque et de la granulosa sont également parfois détectées. On peut rapprocher ces modèles murins de la femme ménopausée chez laquelle l'augmentation des concentrations sériques de gonadotrophines est associée à une augmentation de la fréquence des cancers de l'ovaire.

Les souris transgéniques ont également permis de lever un coin de voile sur le rôle respectif des œstrogènes et de la progestérone dans la reproduction chez la femelle. L'inactivation du récepteur α de l'œstradiol conduit à une perte du réflexe de lordose, à une hypoplasie de l'utérus, un taux d'atrésie folliculaire élevé, associé à la formation de follicules ovariens kystiques et hémorragiques pauvres en cellules de granulosa [19]. Après inactivation du gène de l'aromatase en revanche, les follicules semblent morphologiquement normaux, mais incapables d'ovuler [20]*. Outre la perte du réflexe de lordose, la perte du récepteur de la progestérone empêche également toute ovulation, même après une stimulation gonadotrope, ce qui suggère un rôle-clé de la progestérone dans le processus de lutémisation [21].

L'inactivation de la prolactine et de son récepteur a également de graves conséquences sur la reproduction chez la femelle : cycles œstraux irréguliers, taux d'ovulation diminué, problèmes d'implantation et de développement des glandes mammaires (*m/s* 1997, n° 5, p. 735 ; 1998, n° 4, p. 514) [22, 23].

... sur la cellule de granulosa

La folliculogénèse ovarienne est caractérisée par des processus d'intense prolifération, puis de différenciation (stéroïdogénèse) des cel-

* Il faut toutefois se garder d'extrapoler cette observation à l'espèce humaine puisque les femmes présentant un déficit en 17α-hydroxylase peuvent ovuler lorsqu'elles sont stimulées par des gonadotrophines exogènes.

lules de granulosa dans les follicules en croissance, mais également de mort cellulaire programmée (apoptose) dans les follicules atériques. L'inactivation des gènes impliqués dans tous ces processus est donc susceptible d'aboutir à une altération de la fonction ovarienne. C'est le cas pour le gène de la cycline D2 (*Cnd2*), impliquée dans la transition G1/S du cycle cellulaire. Son inactivation est responsable d'une diminution importante du poids des ovaires, qui ne contiennent pas de follicules avec plus de quatre couches de cellules de granulosa, devenues incapables de proliférer [24]. Il est d'ailleurs intéressant de noter que des concentrations particulièrement élevées d'ARNm *Cnd2* ont été observées dans de nombreuses tumeurs ovariennes chez la femme. A l'inverse, l'inactivation du gène codant pour la protéine p27^{Kip1}, inhibitrice des complexes cycline-CDK et donc inhibitrice de la prolifération cellulaire, aboutit à une augmentation du poids corporel ainsi qu'à une hyperplasie du thymus, de l'hypophyse, des glandes surrénales et des gonades (*m/s* 1996, n° 11, p. 1272) [25]. L'examen histologique montre que dans les follicules des souris *Cdkn1b*^{-/-}, à l'opposé des follicules déficients en cycline D2, les cellules

de granulosa sont incapables de bloquer leur cycle cellulaire, et donc d'entamer un processus de différenciation ou d'apoptose. Quant à l'inactivation du facteur C/EBP β (*CCAAT/enhancer-binding protein β*), elle provoque également une stérilité chez la souris femelle, les cellules de granulosa étant incapables de se différencier en cellules lutéales [26].

Étant donné le fort pourcentage de follicules atériques dans un ovaire, on peut prédire que l'extinction des facteurs qui contrôlent l'entrée des cellules en apoptose perturbe la folliculogénèse. C'est le cas lorsque le gène de la protéine anti-apoptotique *Bcl2* est inactivé [27]. Les ovaires des souris *Bcl2*^{-/-} présentent une diminution d'environ 30 % du nombre de follicules primordiaux par rapport aux témoins. A l'inverse, les follicules atériques des ovaires de souris portant une mutation nulle dans le gène *Bax*, codant pour une protéine pro-apoptotique, sont composés d'un nombre anormalement élevé de cellules de granulosa, sans doute à cause d'un ralentissement dans le déroulement du processus de mort cellulaire [28]. C'est vraisemblablement pour les mêmes raisons que l'inactivation du gène *Fas*, un autre facteur pro-apoptotique responsable de l'activation des caspases, aboutit à un doublement du nombre des follicules de taille moyenne [29].

Enfin la transgénèse a également permis de montrer l'importance des contacts intercellulaires dans le développement folliculaire. En particulier chez la souris, la connexine 37 (*Cx37*) est présente entre l'ovocyte et les cellules du cumulus qui l'entourent. L'inactivation de son gène aboutit à une stérilité des femelles, due à une lutéinisation précoce des follicules ovariens, incapables d'ovuler, ainsi qu'à un défaut de maturation ovocytaire [30].

... sur l'ovulation

L'ovulation, déclenchée par la décharge de gonadotrophines, est souvent assimilée à un processus inflammatoire. Elle est d'ailleurs altérée chez les rongeurs par des injections de doses élevées d'anti-inflammatoires non stéroïdiens, tels que l'indométhacine. Rien d'étonnant donc que l'inactivation de gènes

intervenant dans la cascade de synthèse des prostaglandines et des leucotriènes affecte l'ovulation. Ainsi, l'inactivation de la phospholipase A2 cytosolique (*Cpla2*), qui catalyse la formation d'acide arachidonique à partir de phospholipides membranaires, est responsable d'une baisse de la fertilité et de la proliférite chez les femelles homozygotes pour l'allèle nul [31]. L'analyse phénotypique des souris portant une mutation nulle dans le gène codant pour la cyclo-oxygénase COX2, enzyme en aval de la phospholipase A2, fournit une explication aux troubles de la reproduction observés chez les souris *Cpla2*^{-/-}. En effet, l'inactivation du gène *Cox2* est responsable d'une réduction d'un tiers du taux d'ovulation en dépit d'une croissance folliculaire apparemment normale [32]. Ce phénotype est complété par une très forte altération du taux de fécondation des embryons *Cox2*^{-/-}, sans doute à cause d'un défaut de maturation ovocytaire.

Deux mutations affectant le recrutement et la différenciation des macrophages provoquent également, outre une ostéopérose, des troubles de la fertilité. Ainsi, chez les souris *Csfm^{pl}/Csfm^{pl}*, porteuses d'une mutation dans le gène codant pour le CSF1 (*colony stimulating factor-1*), et les souris *Mitf^{mi}/Mitf^{mi}*, porteuses d'une mutation au locus *microphthalmia* (*mi*), codant pour un facteur de transcription impliqué dans la différenciation des macrophages, on observe une diminution du taux d'ovulation [33, 34]. Une transplantation de moelle osseuse de souris sauvages chez des souris *Mitf^{mi}/Mitf^{mi}* permet de récupérer un taux d'ovulation quasiment normal [34]. Il est intéressant de noter que l'inactivation des gènes *Cox2* et *Cpla2* provoque également un déficit d'activation des macrophages après une injection de LPS, ce qui souligne l'importance fonctionnelle, insoupçonnée *a priori*, de ces cellules et des facteurs de l'inflammation dans l'ovulation et l'implantation.

... sur les interactions entre métabolisme et fertilité

Un ensemble de mutations, spontanées ou induites, sont responsables

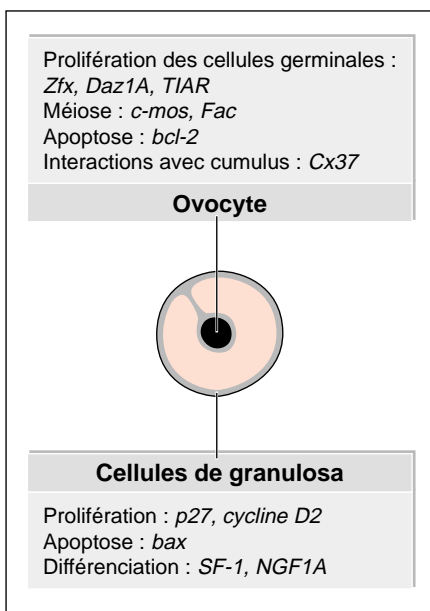


Figure 2. **Gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules folliculaires.**

de perturbations métaboliques profondes qui, directement ou non, conduisent à des troubles de fertilité. Rappelons que le principal « centre de la reproduction », celui qui gouverne le comportement sexuel et la sécrétion de GnRH, se situe au niveau de l'hypothalamus, véritable carrefour des nombreux circuits de contrôle de l'homéostasie : poids corporel, métabolisme énergétique, comportement alimentaire et thermogénèse. C'est ainsi qu'une sous-nutrition sévère provoque à plus ou moins long terme une perte du réflexe de lordose, une inhibition de la sécrétion de GnRH, donc un blocage de la croissance folliculaire et de l'ovulation.

La plupart des mutations responsables de diabète et d'obésité chez la souris sont associées à des troubles de la fertilité allant d'une altération du comportement sexuel et d'une irrégularité des cycles à une stérilité totale [35]. Nous rappellerons ceux largement décrits chez les souris *OBÈSE* (*Lep^{ob}/Lep^{ob}*) et *DIABÈTES* (*Lepr^{db}/Lepr^{db}*), caractérisées par des mutations nulles spontanées dans les gènes respectifs de la leptine et de son récepteur (voir l'article de Bruneau *et al.* dans ce numéro). Citons également les mutations aux locus *agouti*, *tubby* et du gène de la carboxypeptidase E (*m/s 1998*, n° 4, p. 496; *1996*, n° 8-9, p. 974; *1995*, n° 8, p. 1171). La pathogénie de ces troubles de fertilité est mal connue. Il est vraisemblable que la résistance à l'action de l'insuline et de la leptine induite par l'obésité, aboutisse à une perturbation de leur action stimulante sur la sécrétion du GnRH au niveau central, peut-être par l'intermédiaire d'une altération du rétrocontrôle exercé par l'œstradiol. Dans ces modèles d'obésité, la mutation du gène *Nhlh2* (*nescient helix-loop-helix2*) est un cas à part [36]. En effet les femelles *Nhlh2^{-/-}*, obèses, présentent des troubles de cyclicité profonds lorsqu'elles sont séparées des mâles, et deviennent fertiles lorsqu'elles sont en contact avec leurs partenaires. Même si le mécanisme d'action du facteur *Nhlh2* est totalement inconnu, ce modèle souligne une fois de plus les liens étroits qui unissent métabolisme énergétique, comportement sexuel et fertilité.

Les anomalies de la croissance, en particulier les anomalies de l'axe somatotrope, aboutissent également à des troubles de fertilité. C'est le cas des souris naines porteuses de mutations dans le gène *Pit-1*, dans celui de la GH ou de son récepteur (syndrome de Laron [37]), ainsi que, comme nous l'avons vu, dans celui de l'IGF-I [9]. C'est aussi le cas des souris qui surexpriment une protéine de liaison des IGF (l'IGFBP-I (*m/s 1997*, n° 5, p. 711) [38, 39]), ou qui présentent une inactivation ciblée au niveau hépatique du gène *Hnf-1 α* (*m/s 1996*, n° 3, p. 405) [40]. Ces souris développent un diabète plus ou moins sévère, ont des concentrations d'IGF-I faibles voire nulles dans le sérum, présentent une diminution du poids corporel, ainsi que des troubles de la fertilité plus ou moins marqués chez les femelles.

Il faut cependant noter que pour ce qui relève de l'axe somatotrope, les résultats obtenus chez la souris ne sont pas directement extrapolables à l'homme. En particulier, les femmes qui présentent un nanisme de type Laron ont une fertilité normale, malgré des concentrations d'IGF-I effondrées. Or à la différence des rongeurs, il y a deux à trois fois plus d'IGF-II que d'IGF-I dans le sérum humain. La sécrétion hépatique de l'IGF-II dépendant moins de l'action de la GH que celle de l'IGF-I, les patients souffrant de ce syndrome ont des concentrations sériques en IGF-II faibles, mais non nulles (entre 60 et 230 ng/ml [41]). Par ailleurs, le follicule préovulatoire de la femme est caractérisé par une forte expression locale d'IGF-II, qui dépend des gonadotrophines hypophysaires, et non de la GH, ce qui le rend sans doute insensible à toute perturbation des niveaux d'IGF périphériques.

Conclusions : ce que nous disent les souris...

Parmi les facteurs que la transgénèse a confortés dans leur rôle majeur, permettant souvent de préciser leur rôle, on retrouve les incontournables : SF1, FSH et LH, prolactine, œstradiol, progestérone. Plus intéressants sont les éléments qu'aucune donnée concernant le spectre d'expression ou d'action ne permet-

tait *a priori* de ranger parmi les facteurs limitants de la fertilité, et dont la fonction a véritablement été mise en lumière grâce à l'étude des conséquences de leur inactivation. Citons par exemple les facteurs COX2 et CSF1, nécessaires aux processus d'inflammation et d'activation des macrophages au moment de l'ovulation, mais également la cycline D2 et le facteur p27^{hip1}, pour lesquels ubiquité d'expression n'est pas synonyme d'ubiquité de fonction.

Par ailleurs, si la transgénèse chez la souris ne produit pas toujours un phénotype identique à celui que l'on observe chez la femme – ce qui permet de souligner des différences d'espèces telles que celles concernant l'axe somatotrope –, elle fournit parfois des modèles de pathologie humaine intéressants. C'est le cas de la maladie de Fanconi, du syndrome de Turner, mais également des ovaires polykystiques. C'est également le cas des nombreuses anomalies du métabolisme affectant la reproduction. L'avenir nous dira dans quelle mesure l'étude de ces modèles nous permettra de mieux comprendre la pathogénie de ces syndromes.

... et ce qu'elles ne nous disent pas

Il existe une majorité de gènes pour lesquels les conclusions quant aux effets spécifiques sur la fonction de reproduction sont difficiles à tirer, à cause de leurs effets pléiotropes sur l'organisme. C'est le cas de certains facteurs à l'interface entre croissance, métabolisme et reproduction. C'est surtout le cas des très nombreux facteurs dont l'inactivation est létale avant l'âge de la puberté [42]. La connaissance du rôle de ces différents facteurs dans les différents tissus dans lesquels ils sont exprimés nécessitera un recours aux systèmes d'inactivation conditionnelle ou inductible de recombinaison homologue.

Il existe également une longue liste de gènes que nous n'avons pas cités ici, car leur inactivation ne provoque aucune altération apparente sur la reproduction. Pour ne citer qu'un exemple, les souris *Irs1^{-/-}* dépourvues de la protéine intracellulaire IRS1 (*insulin receptor substrate 1*), qui joue un rôle pivot dans la signalisation du récepteur de l'insuline et de l'IGF-I,

sont fertiles, malgré une diminution attendue de leur poids corporel par rapport aux témoins, et en dépit de leur résistance à l'action de l'insuline et de l'IGF-I (m/s 1996, n° 5, p. 620) [43]. Plusieurs raisons non exclusives sont susceptibles d'expliquer ces paradoxes. La première, souvent évoquée, tient au caractère éminemment redondant des familles auxquelles appartiennent ces facteurs. Les cellules des souris *Irs1*^{-/-} développent par exemple une voie de signalisation alternative mettant en jeu un facteur baptisé IRS2, capable de pallier les effets de l'inactivation d'IRS1 [43]. La deuxième raison, moins souvent évoquée, tient au fait qu'un phénotype subtil induit par une recombinaison homologue n'est pas toujours visible aux non-initiés. Le cas de l'inactivation du gène *Bcl2* est à ce titre illustratif. Le premier article décrivant le phénotype des souris *Bcl2*^{-/-} faisait état d'un retard de croissance, d'un taux d'apoptose très important dans le thymus et la rate, d'une polykystose rénale ainsi que d'un défaut de pigmentation des poils. Aucune précision n'était apportée sur la fertilité, ce qui laissait supposer que la fonction de reproduction était parfaitement normale [44]. Un peu plus tard pourtant, une analyse de la folliculogénèse ovarienne révélait une diminution du nombre des follicules primordiaux (dont nous avons parlé plus haut) chez les souris homozygotes. Cet exemple inspire trois remarques. La première est que les conséquences de l'inactivation d'un gène doivent être évaluées le plus complètement possible et avec un degré de précision maximal, c'est-à-dire en collaboration avec des spécialistes de chacune des fonctions sur lesquelles est susceptible d'agir le facteur. La deuxième remarque, consécutive à la première, concerne la robustesse des grandes fonctions chez les mammifères. Dans notre exemple, c'est cette robustesse qui permet une croissance folliculaire et une fertilité normale malgré la perte d'un tiers de la réserve en follicules primordiaux chez les souris *Bcl2*^{-/-}. Enfin il est toujours prudent de considérer l'effet de l'inactivation d'un gène dans des fonds génétiques différents, ce qui peut mettre en lumière des phénotypes discrets passés inaperçus ■

RÉFÉRENCES

- Barbaux S, Vilain E, McElreavey K, Fulous M. Le point sur le déterminisme du sexe chez les mammifères. *Med Sci* 1995; 11 : 529-36.
- Besmer P, Manova K, Duttlinger R, Huang EJ, Packer A, Gyssler C, Bachvarova R. The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Development* 1993 (suppl) : 125-37.
- Ruggiu M, Speed R, Taggart M, McKay SJ, Kilanowsky F, Suanders P, Dorin J, Cooke HJ. The mouse *Dazl* gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature* 1997; 389 : 73-7.
- Beck ARP, Miller IJ, Anderson P, Streuli M. RNA-binding protein TIAR is essential for primordial germ cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 9 : 2331-6.
- Luoh SW, Bain PA, Polakiewicz RD, Goodheart ML, Gardner H, Jaenisch R, Page DC. *Zfx* mutation results in small animal size and reduced germ cell number in male and female mice. *Development* 1997; 124 : 2275-84.
- Colledge WH, Carlton MBL, Udy GB, Evans MJ. Disruption of *c-mos* causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature* 1994; 370 : 65-8.
- Chen M, Tomkins DJ, Auerbach W, et al. Inactivation of *FAC* in mice produces inducible chromosomal instability and reduced fertility reminiscent of Fanconi anemia. *Nat Genet* 1996; 12 : 448-51.
- 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 : 531-5.
- Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellvé AR, Efstratiadis A. Effects of an *Igf1* gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol* 1996; 10 : 903-18.
- Mason AJ, Hayflick JS, Zoeller RT, Young WS, Philips HS, Nikolics K, Seeburg PH. A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the *hpg* mouse. *Science* 1986; 234 : 1366-71.
- Kendall SK, Samuelson LC, Saunders TL, Wood RI, Camper SA. Targeted disruption of the pituitary glycoprotein hormone α -subunit produces hypogonadal and hypothyroid mice. *Genes Dev* 1995; 9 : 2007-19.
- Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet* 1997; 15 : 201-4.
- Kendall SK, Saunders TL, Jin L, Llyod RV, Glode LM, Nett JM, Kevi RA, Nilson JH, Camper SA. Targeted ablation of pituitary gonadotropes in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 1991; 5 : 2025-36.
- Lee SL, Sadowsky Y, Swirloff AH, Polish JA, Goda P, Gavriliina G, Milbrandt J. Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). *Science* 1996; 273 : 1219-21.
- Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Trembleau A, Gourdjji D, Driancourt MA, Rao ChV, Charnay P. Multiple pituitary and ovarian defects in *Krox-24* (*NGFI-A*, *Egr-1*)-targeted mice. *Mol Endocrinol* 1997; 12 : 107-22.
- Matzuk MM, Finegold MJ, Su JGJ, Hsueh AJW, Bradley A. α -inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature* 1992; 360 : 313-9.
- Kumar TR, Wang Y, Matzuk MM. Gonadotropins are essential modifier factors for gonadal tumor development in inhibin-deficient mice. *Endocrinology* 1996; 137 : 4210-6.
- Risma KA, Clay CM, Nett TM, Wagner T, Yun J, Nilson JH. Targeted overexpression of luteinizing hormone in transgenic mice leads to infertility, polycystic ovaries, and ovarian tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92 : 1322-6.
- Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90 : 11162-6.
- Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95 : 6965-70.
- Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Shyamala G, Conneely O, O'Malley BW. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 1995; 9 : 2266-78.
- Ormandy CJ, Camus A, Barra J, Damotte D, Lucas B, Buteau H, Edery M, Brousse N, Babinet C, Binart N, Kelly PA. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev* 1997; 11 : 167-78.
- Horseman ND, Zhao W, Montecino-Rodriguez E, Tanaka M, Nakashima K, Engle SJ, Smith F, Markoff E, Dorshkind K. Defective mammapoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *EMBO J* 1997; 16 : 6926-35.
- Sicinski P, Donaher JL, Geng Y, Parker SB, Gardner H, Park MY, Röbbker RL, Richards JS, McGinnis LK, Biggers JD, Eppig JJ, Bronson RT, Elledge SJ, Weinberg RA. Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature* 1996; 384 : 470-4.
- Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, Horii I, Loh DY, Nakayama KI. Mice lacking p27^{Kip1} display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 1996; 85 : 707-20.

RÉFÉRENCES

26. Sterneck E, Tessarollo L, Johnson PF. An essential role for C/EBP β in female reproduction. *Genes Dev* 1997; 11: 2153-62.
27. Ratts VS, Flaws JA, Kolp R, Sorenson CM, Tilly JL. Ablation of *bcl-2* gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology* 1995; 136: 3665-8.
28. Knudson CM, Tung KSK, Tourtelotte WG, Brown GAJ, Korsmeyer SJ. *Bax*-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 1995; 270: 96-9.
29. Sakamaki K, Yoshida H, Nishimura Y, Nishikawa SI, Manabe N, Yonehara S. Involvement of Fas antigen in ovarian follicular atresia and luteolysis. *Mol Reprod Dev* 1997; 47: 11-8.
30. Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 1997; 385: 525-9.
31. Bonventre JV, Huang Z, Taheri MR, O'Leary E, Li E, Moskowitz MA, Sapirstein A. Reduced fertility and postischemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A₂. *Nature* 1997; 390: 622-5.
32. Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 1997; 91: 197-208.
33. Cohen PE, Zhu L, Pollard JW. Absence of colony stimulating factor-1 in osteopetrotic (*csfm^{op}/csfm^{op}*) mice disrupts estrous cycles and ovulation. *Biol Reprod* 1997; 56: 110-8.
34. Watanabe H, Tatsumi K, Yokoi H, Higuchi T, Iwai M, Fukuoka M, Fujiwara H, Fujita K, Nakayama H, Mori T, Fujita J. Ovulation defect and its restoration by bone marrow transplantation in osteopetrotic mutant mice of *Mit^{fmi}/Mit^{fmi}* genotype. *Biol Reprod* 1997; 57: 1394-400.
35. Bray GA. Obesity and reproduction. *Hum Reprod* 1997 (suppl 1): 26-32.
36. Good DJ, Porter FD, Mahon KA, Parlow AF, Westphal H, Kirsch IR. Hypogonadism and obesity in mice with a targeted deletion of the *Nhlh2* gene. *Nat Genet* 1997; 15: 397-401.
37. Zhou Y, Xu BC, Maheshwari HG, et al. A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 13215-20.
38. Gay E, Seurin D, Babajko S, Doublier S, Cazillis M, Binoux M. Liver-specific expression of human insulin-like growth factor binding protein-1 in transgenic mice: repercussions on reproduction, ante- and perinatal mortality and postnatal growth. *Endocrinology* 1997; 138: 2937-47.
39. Huang H, Rajkumar K, Murphy LJ. Reduced fecundity in insulin-like growth factor binding protein-1 transgenic mice. *Biol Reprod* 1997; 56: 284-9.
40. Lee YH, Sauer B, Gonzalez FJ. Laron dwarfism and non-insulin-dependent diabetes mellitus in the *Hnf-1 α* knock-out mouse. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 3059-68.
41. Rosenfeld RG, Rosenbloom AL, Guevara-Aguirre J. Growth-Hormone (GH) insensitivity due to primary GH receptor deficiency. *Endocr Rev* 1994; 15: 369-90.
42. Copp AJ. Death before birth: clues from gene knockouts and mutations. *Trends Genet* 1995; 11: 87-93.
43. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brüning JC, Haag III B, Johnson RS, Kahn CR. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the *IRS-1* gene. *Nature* 1994; 372: 186-90.
44. Veis DJ, Sorensen CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. *Bcl-2*-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 1993; 75: 229-40.

Summary

Ovarian physiology: what we have learnt from the mouse...

Generation of transgenic mice that lack functional copies of one or several endogenous genes, or that overexpress an exogenous gene, as well as the phenotypic characterization of spontaneous mutations, has recently allowed physiologists to investigate the functional role of these genes *in vivo*. In this review, we describe mutations that specifically affect fertility in female mice. Some mutations affect sexual differentiation and organogenesis of the ovaries, basal and terminal follicular growth and atresia, and/or ovulation. Other mutations indirectly alter female fertility by interacting with metabolism. Among all the mutations that have been shown to alter female fertility, some of them were expected (FSH β , estradiol receptor), while others were serendipitous (*Nhlh2*, *CSF1*). Finally, transgenic technology proves useful to produce animal models of human diseases such as Turner's syndrome or polycystic ovaries.

TIRÉS À PART

Ph. Monget.

**Le Prix
Benjamin Delessert
est décerné en 1999
au Professeur Axel Kahn**