



**HAL**  
open science

# PATL2, une protéine ovocytaire nécessaire à la maturation ovocytaire et au développement embryonnaire préimplantatoire

Magali Dhellemmes

► **To cite this version:**

Magali Dhellemmes. PATL2, une protéine ovocytaire nécessaire à la maturation ovocytaire et au développement embryonnaire préimplantatoire. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALV020 . tel-04166245

**HAL Id: tel-04166245**

**<https://theses.hal.science/tel-04166245>**

Submitted on 19 Jul 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### **DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Biologie cellulaire

Unité de recherche : IAB : Epigenetics, Environment, Cell Plasticity, Cancer  
(UGA / Inserm U1209 / CNRS UMR 5309)

## **PATL2, une protéine ovocytaire nécessaire à la maturation ovocytaire et au développement embryonnaire préimplantatoire**

## **PATL2, an oocyte protein necessary for oocyte maturation and preimplantation embryo development**

Présentée par :

**Magali DHELLEMES**

#### Direction de thèse :

**Christophe ARNOULT**  
DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS

Directeur de thèse

#### Rapporteurs :

**Nathalie BEAUJEAN**  
DIRECTEUR DE RECHERCHE, Stem Cell and Brain Research  
Institute, Lyon

**Manuel AVILES SANCHEZ**  
PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Murcia,  
Espagne

#### Thèse soutenue publiquement le 6 avril 2023, devant le jury composé de :

**Christophe ARNOULT**  
DIRECTEUR DE RECHERCHE, Institut pour  
l'Avancée des Biosciences, Grenoble

Directeur de thèse

**Pascale HOFFMANN-CUCUZ**  
PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN  
HOSPITALIER,  
Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes

Présidente

**Nathalie BEAUJEAN**  
DIRECTEUR DE RECHERCHE, Stem Cell and  
Brain Research Institute, Lyon

Rapporteuse

**Manuel AVILES SANCHEZ**  
PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de  
Murcia, Espagne

Rapporteur

**Véronique DURANTHON**  
DIRECTEUR DE RECHERCHE, INRAE, Biologie de la  
Reproduction, Environnement, Epigénétique, et  
Développement, Paris

Examinatrice





---

## Résumé

---

### PATL2, une protéine ovocytaire nécessaire à la maturation ovocytaire et au développement embryonnaire préimplantatoire

À la naissance, la réserve ovarienne de la femme est composée d'environ 1 million d'ovocytes primaires, arrêtés en prophase de première méiose. Ces ovocytes, stockés dans un état immature, vont devoir réaliser plusieurs étapes avant de devenir aptes à soutenir le développement d'un embryon. Une première phase, dite phase de croissance, est caractérisée par une élévation importante du volume ovocytaire. Elle est suivie d'une phase de maturation méiotique qui débute par la rupture de la vésicule germinale et l'achèvement de la première méiose, étape marquée par l'extrusion du premier globule polaire. L'ovocyte devient alors un ovule mature, bloqué en métaphase de seconde méiose, et capable d'être fécondé. La dernière étape de maturation ovocytaire dépend de facteurs apportés par le spermatozoïde et ne sera réalisée qu'après la fécondation. La formation du second globule polaire marque alors l'achèvement de la seconde division méiotique.

La phase de croissance ovocytaire est caractérisée par une activité transcriptionnelle intense permettant la production de nombreux ARN messagers. À partir de la maturation méiotique, la transcription est arrêtée, elle ne reprendra qu'à l'activation du génome embryonnaire, au stade 2-cellules chez la souris, et entre les stades 4 et 8-cellules chez la femme. La production des protéines nécessaires à la maturation méiotique, à la fécondation et au développement embryonnaire jusqu'à l'activation du génome embryonnaire dépend alors des ARNm accumulés au cours de la croissance ovocytaire. La régulation de leur stockage, de leur traduction au moment opportun, mais aussi de leur dégradation lorsqu'ils ne sont plus nécessaires, sont des éléments essentiels à la production d'ovules capables de se développer.

L'échec de maturation ovocytaire est un type d'infertilité féminine caractérisé par la production d'ovules immatures, incapables d'être fécondés. Un variant du gène *Patl2*, à l'origine d'un codon stop prématuré, a été identifié comme responsable de ce type d'infertilité. L'orthologue de PATL2 chez le xénope est une ribonucléoprotéine abondante dans les ovocytes et impliquée dans la régulation de la traduction des ARNm ovocytaires. La fonction de la protéine est, en revanche, mal caractérisée chez les Mammifères. Dans ce travail de thèse, j'ai montré que PATL2 est abondante dans les ovocytes et reste présente dans les embryons de souris jusqu'au stade zygote. De plus, cette protéine est essentielle à la formation d'ovules et d'embryons de qualité et son absence est responsable d'anomalies de maturation méiotique, d'arrêts prématurés du développement embryonnaire préimplantatoire et induit la formation de blastocystes anormaux.

**Mots clés** : infertilité féminine, maturation ovocytaire, échec de maturation ovocytaire, qualité ovocytaire, développement embryonnaire préimplantatoire, PATL2.

---

## Abstract

---

### PATL2, an oocyte protein necessary for oocyte maturation and preimplantation embryo development

At birth, female ovarian reserve is composed of approximately 1 million primary oocytes arrested in prophase of first meiosis. These oocytes, stored in an immature state, will have to go through several stages before becoming able to support the development of an embryo. A first period, called the growth phase, is characterized by a significant increase in oocyte volume. It is followed by meiotic maturation which begins with germinal vesicle breakdown and completion of the first meiosis, marked with the extrusion of the first polar body. The oocyte becomes an egg, blocked in metaphase of second meiosis, and capable of being fertilized. After fertilization, the second polar body extrusion marks the second meiotic division achievement.

The oocyte growth phase is characterized by an intense transcriptional activity and the production of numerous messenger RNAs. From meiotic maturation stage, transcription is stopped and will not resume until the activation of the embryonic genome, at the 2-cell stage in mice, and between the 4 and 8-cell stage in women. Synthesis of proteins necessary for meiotic maturation, fertilization and embryonic development until embryonic genome activation depends on the mRNAs accumulated during oocyte growth. The correct regulation of mRNAs storage, their translation at the appropriate time but also their degradation when they are not necessary anymore, are essential elements to produce competent eggs.

Oocyte maturation failure is a type of female infertility characterized by the production of immature eggs, unable to be fertilized. A *PATL2* variant, at the origin of a premature stop codon, has been identified and is responsible for this type of infertility. *PATL2*'s xenopus orthologue is a ribonucleoprotein abundant in oocytes, which contributes to regulate maternal mRNA translation. In Mammals, *PATL2* function is poorly characterized. In this project, I showed that, in mice, *PATL2* is abundant in oocytes and is still present in zygotes. Moreover, this protein is essential for the formation of good quality eggs and embryos and its absence is responsible for aberrant meiotic maturation, premature embryo development arrest and induces the formation of abnormal blastocysts.

Keywords: female infertility, oocyte maturation, oocyte maturation failure, oocyte quality, preimplantation embryo development, *PATL2*.

*Aux deux générations de femmes qui m'ont donné la vie,  
Je vous dédie cette thèse sur la qualité ovocytaire,  
Cette cellule si particulière...*

Soutenance de thèse, présentée publiquement, le 6 avril 2023.

*« En présence de mes pairs. Parvenue à l'issue de mon doctorat en biologie cellulaire, et ayant ainsi pratiqué, dans ma quête du savoir, l'exercice d'une recherche scientifique exigeante, en cultivant la rigueur intellectuelle, la réflexivité éthique et dans le respect des principes de l'intégrité scientifique, je m'engage, pour ce qui dépendra de moi, dans la suite de ma carrière professionnelle quel qu'en soit le secteur ou le domaine d'activité, à maintenir une conduite intègre dans mon rapport au savoir, mes méthodes et mes résultats. »*

---

## Remerciements

---

Ces remerciements sont pour moi, l'opportunité de remercier toutes les personnes ayant, de près ou de loin, contribué à l'aboutissement de ce projet. La pudeur m'empêche de dire tout ce que je pense, mais je sais que vous saurez lire entre les lignes...

Tout d'abord, je souhaite remercier l'ensemble des membres de ce jury, pour avoir accepté de prendre le temps de juger ce travail, malgré des emplois du temps chargés. Au professeur Pascale Hoffmann-Cucz, merci de me faire l'honneur de présider ce jury. Au docteur Nathalie Beaujean et au professeur Manuel Aviles Sanchez, merci d'avoir accepté d'être mes rapporteurs. Au docteur Véronique Duranthon, après avoir participé à mon comité de suivi individuel, je vous remercie de prendre part à ce jury.

Je remercie le docteur Christophe Arnoult, pour m'avoir accordé sa confiance et donné l'opportunité de faire ce doctorat. Merci d'avoir corrigé ce manuscrit, merci pour les précieux conseils scientifiques, merci de m'avoir aidé à connaître les besoins spécifiques des ovocytes et des embryons, je retiens cette phrase, souvent vérifiée : « en FIV, le diable se cache dans les détails ».

J'apporte des remerciements particuliers au docteur Aminata Touré, il n'y a pas de mot pour décrire toutes tes qualités.

Je remercie le professeur Pierre Hainaut, pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Je remercie le professeur Pierre Ray pour sa disponibilité et sa bienveillance.

Mes sincères remerciements au docteur Guillaume Martinez, scientifique brillant et bienveillant. Merci de m'avoir fait participer à tes projets scientifiques, parfois un peu fous, et toujours très intéressants ! Merci pour tes nombreux conseils, ta réactivité, travailler à tes côtés était plaisant en enrichissant.

Au docteur Corinne Loeuillet, merci de m'avoir permis de faire mon premier pas dans le monde de la recherche et de m'avoir aidé à préparer ma soutenance. Merci de partager mes valeurs écologiques, et merci de prendre soin de ma petite Pocket.

Geneviève, merci pour tous les génotypages.

Emeline, la meilleure prof d'ICSI, un immense merci pour ta présence, ta bonne humeur, tes conseils, tes mots qui réconfortent, ton soutien indéfectible... A bientôt au détour d'une rando, d'une cascade ou autour de marrons chauds au marché de Noël !

Un immense merci au gang des étudiantes, toujours soudées, dans les bons moments, comme dans les moins bons. Merci pour votre soutien et votre bonne humeur, merci pour les discussions scientifiques (et celles moins scientifiques) et tout le reste !

Marie, merci de m'avoir formée à l'art de manipuler les ovocytes et de m'avoir transmis l'amour de la biologie de la reproduction. Merci Pauline, mon acolyte de Master, « force et honneur », j'ai hâte de lire ta thèse ! Julie, Dr Juju, quand je t'ai vue pour la première fois, je n'aurai jamais cru que, sous tes faux ongles, se cachait une véritable amitié ! Charline, merci pour ton humour et ton sens de l'orientation la dérision ! Merci Jana, à deux, c'est plus facile ! Regarde, la montagne et les murs d'escalade nous attendent ! Merci Caro, tu es au top, tu gères tout d'une main de maître et tu as toujours les mots qui font du bien ! Elsa, merci pour ta bonne humeur et ta pertinence scientifique, partager avec toi est toujours un plaisir. Merci Emma, carrément géniale, tu es la définition même de la gentillesse ! Marjo, (tu noteras ta présence dans ce paragraphe, signe d'une jeunesse éternelle... Hum hum...), un exemple scientifique (prix l'Oréal une année, concours CR l'année suivante !), ton soutien est précieux. Dans la machine de Jean Roget, il n'y a pas assez de Kinder Buenos et de cappuccinos noisette Oréo pour te remercier !

Et de façon plus générale, je tiens également à remercier toute l'équipe GETI, merci de m'avoir accueillie dans ce laboratoire où j'ai tant appris.

Je remercie toute l'équipe LETI du CEA de Grenoble, et en particulier William, Ondrey et Chiara, pour cette belle collaboration permettant de visualiser le développement embryonnaire en time lapse 3D.

Je remercie les ingénieurs de la plateforme de microscopie de l'Institut Albert Bonniot, et en particulier Alexei Grichine, pour m'avoir aidé à imager les ovocytes.

A mes amis, toujours présents. Merci Prune, merci Benjamin. Merci Jack, vivement la prochaine rando avec Jadou !

A Arnaud, mon partenaire de cordée, de rando, et tellement plus. Il nous reste tant de voies à gravir, tant de chemins à arpenter, tant de lieux à visiter. Merci de m'avoir soutenue (et supportée !) ces derniers mois. Merci de m'avoir donné l'énergie nécessaire pour terminer mon manuscrit, par tes encouragements et tes bons petits plats. Merci pour tout...

A ma famille, même si vous ne comprenez rien à ce que je fais, vous m'avez soutenue dans ce projet de doctorat et je vous remercie. A mon frère, à mon père, à Fabienne, merci de m'avoir encouragée, épaulée, écoutée et conseillée. Merci à mon grand-père, l'homme le plus fort que je connaisse.

Merci à ma grand-mère, la femme la plus forte que j'ai connue. Tu as été bien plus qu'une mamie pour moi. Merci maman, tes cellules vivent encore à travers les miennes. Vous me manquez tant...

---

## Table des matières

---

Résumé .....	1
Abstract.....	2
Remerciements.....	5
Table des matières.....	7
Table des illustrations.....	13
Liste des abréviations .....	16
<b>Introduction Bibliographique .....</b>	<b>21</b>
<b>Chapitre n°1 : La biogenèse des ovocytes de Mammifères.....</b>	<b>22</b>
I.    Le système reproducteur féminin .....	22
1. Contexte général .....	22
2. Axe gonado-hypothalamo-hypophysaire .....	22
3. Le cycle ovarien : cas de la femme .....	23
4. Le cycle œstral : cas de la souris.....	25
II.   La folliculogenèse : de la formation du follicule à sa dégradation.....	25
1. Etablissement de la lignée germinale.....	25
2. Les interactions ovocytes – cellules folliculaires.....	26
3. Formation des follicules primordiaux.....	28
4. Activation des follicules primordiaux et formation des follicules primaires.....	29
5. Du follicule primaire au follicule secondaire.....	32
6. Formation du follicule tertiaire et du follicule antral.....	33
7. Sélection du follicule dominant.....	37
8. L’ovulation .....	39
9. La formation du corps jaune .....	42
II.   L’ovogenèse.....	44
1. Régulation de l’arrêt et de la reprise de la méiose .....	45
2. La maturation nucléaire .....	49
3. La maturation cytoplasmique.....	52

<b>Chapitre n°2 : la fécondation, l'activation ovocytaire et l'activation du génome embryonnaire.....</b>	<b>58</b>
I.    L'interaction ovule/spermatozoïde .....	58
1. Le passage de la zone pellucide .....	58
2. L'adhésion et la fusion des gamètes .....	59
II.   L'activation ovocytaire .....	60
1. Les oscillations calciques .....	60
2. Les voies de signalisation à l'origine de l'élévation calcique .....	61
3. L'activation ovocytaire : les évènements contrôlés par le calcium.....	62
III.  L'activation du génome embryonnaire (EGA) .....	66
<b>Chapitre n°3 : la régulation de l'expression des gènes dans l'ovocyte .....</b>	<b>68</b>
I.    Le transcriptome maternel.....	69
1. Importance du transcriptome maternel .....	69
2. Synthèse et maturation des ARNm .....	69
3. Le stockage des ARNm .....	70
4. La dégradation des ARNm .....	71
II.   Régulation de la traduction dans les ovocytes.....	73
1. L'initiation de la traduction dans les cellules eucaryotes .....	73
2. Polyadénylation et traduction.....	75
3. Protéines clés de la régulation de la traduction ovocytaire.....	76
4. Les protéines de la famille PAT1 .....	81
<b>Chapitre n°4 : La qualité ovocytaire .....</b>	<b>86</b>
I.    Importance de l'ovocyte dans le développement embryonnaire.....	86
I.    Qu'est-ce qu'un ovule de qualité ? .....	86
1. Le complexe cumulo-ovocytaire .....	86
1.a. <i>Morphologie du complexe cumulo-ovocytaire</i> .....	86
1.b. <i>Apoptose des cellules folliculaires</i> .....	87
1.c. <i>Expression des gènes du complexe cumulo-ovocytaire</i> .....	87
1.d. <i>Métabolisme du complexe cumulo-ovocytaire</i> .....	88
2. La morphologie de l'ovule .....	88
2.a. <i>La maturité nucléaire</i> .....	88
2.b. <i>Le fuseau méiotique</i> .....	89
2.c. <i>Le globule polaire</i> .....	91
2.d. <i>Le cytoplasme</i> .....	93

2.e.	<i>La zone pellucide</i> .....	95
2.f.	<i>L'espace périvitellin</i> .....	97
2.g.	<i>Les ovules géants</i> .....	98
2.h.	<i>Conclusion</i> .....	99
3.	L'aneuploïdie .....	100
4.	Les paramètres métaboliques .....	100
<b>Chapitre n°5 : La qualité embryonnaire</b> .....		104
I.	Le développement embryonnaire préimplantatoire des Mammifères .....	104
II.	Les méthodes non invasives d'évaluation de la qualité embryonnaire .....	105
1.	Paramètres morpho-cinétiques .....	105
2.	Analyse du milieu de culture : les microARN .....	113
3.	L'analyse du milieu de culture : les paramètres métaboliques.....	114
III.	Les méthodes invasives d'évaluation de la qualité embryonnaire .....	118
1.	Le diagnostic préimplantatoire .....	118
2.	Etude du profil d'expression des gènes dans les embryons .....	119
3.	Quantification des blastomères dans les blastocystes.....	120
4.	Etude de l'intégrité chromosomique .....	121
5.	Etude des vagues calciques .....	121
<b>Chapitre n°6 : Les facteurs influençant la qualité ovocytaire et embryonnaire</b> .....		123
I.	L'infertilité .....	123
II.	Les causes d'altération de la qualité ovocytaire .....	123
1.	L'âge.....	123
2.	La stimulation ovarienne .....	124
3.	L'échec de maturation ovocytaire.....	126
4.	Les causes génétiques de l'infertilité .....	126
<b>Problématique et objectifs de la thèse</b> .....		132
<b>Matériel &amp; Méthodes</b> .....		135
I.	Echantillons biologiques.....	136
1.	Déclaration d'éthique.....	136
2.	Souris utilisées .....	136
3.	Obtention et préparation des ovocytes au stade GV .....	136
4.	Obtention et préparation des ovules au stade MII .....	136
5.	Préparation et culture des embryons .....	137

6. Composition des milieux utilisés .....	138
II. RT-qPCR .....	140
1. Analyse de l'expression de <i>Patl2</i> dans les ovocytes et les embryons .....	140
2. Analyse de l'expression de gènes importants pour le développement embryonnaire dans un blastocyste unique .....	140
3. Sondes TaqMan .....	141
III. Synthèse d'ARNm de <i>Patl2</i> et <i>mCherry</i> .....	141
1. Transformation bactérienne et culture .....	141
2. Extraction et purification d'ADN plasmidique .....	142
3. Préparation d'ARNm à partir d'ADN .....	142
4. Electrophorèse sur gel d'agarose .....	143
5. Observation des protéines produites à partir des ADN ou ARNm <i>mCherry</i> et <i>Patl2</i> .....	143
IV. Microinjection d'ovocytes au stade GV .....	143
V. Maturation ovocytaire <i>in vitro</i> .....	144
VI. Immunofluorescence .....	144
1. Immunofluorescence sur ovocytes et embryons .....	144
2. Anticorps .....	145
VII. Western Blot .....	145
1. Transfection de cellules HEK-293T .....	145
2. Extraction de protéines .....	146
3. Western Blot .....	146
VIII. Analyses statistiques .....	147
<b>Résultats</b> .....	<b>148</b>
<b>1ère partie : Etude d'un modèle de mauvaise qualité ovocytaire chez la souris, le modèle <i>Patl2</i><sup>-/-</sup></b> .....	<b>149</b>
I. Problématique .....	149
II. PATL2, une protéine ovocytaire, éliminée après la fécondation chez la souris ....	150
III. L'absence de PATL2 est responsable de défauts ovocytaires modérés .....	152
IV. L'absence de PATL2 perturbe fortement le développement embryonnaire .....	154
V. Discussions .....	160
1. PATL2 est une protéine ovocytaire dont la présence est fortement régulée chez la souris	160
2. Effet de l'absence de PATL2 sur la maturation ovocytaire dans un modèle murin non stimulé .....	161

3.	Augmentation du nombre d'ovules chez les femelles <i>Patl2</i> <sup>-/-</sup> .....	163
4.	Effet de l'absence de PATL2 sur le développement embryonnaire .....	164
VI.	Conclusions des travaux de la 1 <sup>ère</sup> partie .....	166
<b>2<sup>ème</sup> partie : impact de la stimulation ovarienne dans le modèle de mauvaise qualité ovocytaire <i>Patl2</i><sup>-/-</sup> .....</b>		
<b>168</b>		
I.	Contexte .....	168
II.	La stimulation ovarienne aggrave certains défauts ovocytaires, particulièrement chez les femelles <i>Patl2</i> <sup>+/+</sup> .....	168
III.	La stimulation ovarienne altère le développement embryonnaire des femelles <i>Patl2</i> <sup>+/+</sup> et <i>Patl2</i> <sup>-/-</sup> .....	171
IV.	Discussions .....	174
1.	Impact de la stimulation ovarienne sur la qualité ovocytaire et embryonnaire chez les femelles <i>Patl2</i> <sup>+/+</sup> et <i>Patl2</i> <sup>-/-</sup> .....	175
2.	Amélioration des protocoles de stimulation .....	176
3.	Evolution phénotypique des lignées murines utilisées en recherche biomédicale .....	178
<b>3<sup>ème</sup> partie : Mise en place d'une stratégie visant à évaluer l'importance de PATL2 après la GVBD .....</b>		
<b>181</b>		
I.	Contexte .....	181
II.	Stratégie n°1 : suppression de PATL2 dans les ovocytes GV .....	182
1.	Utilisation du milieu M16 pour faire maturer les ovocytes <i>in vitro</i> .....	182
2.	L'injection de morpholinos dans les ovocytes ne permet pas de supprimer PATL2 .....	182
III.	Stratégie n°2 : Rétablissement de PATL2 dans des ovules <i>Patl2</i> <sup>-/-</sup> .....	185
1.	L'ARNm <i>mCherry</i> synthétisé <i>in vitro</i> et injecté dans des ovules, permet la production d'une protéine fluorescence non toxique pour le développement embryonnaire .....	185
2.	L'ARNm <i>Patl2</i> synthétisé <i>in vitro</i> et inséré dans des cellules HEK-293T ne permet pas la production d'une protéine détectable en Western Blot .....	186
3.	L'ARNm <i>Patl2</i> synthétisé <i>in vitro</i> et injecté dans des ovules ne permet pas la production de protéine détectable en immunofluorescence .....	187
IV.	Discussions .....	187
1.	Difficultés rencontrées dans la suppression transitoire de PATL2 dans les ovocytes GV .....	188
2.	Difficultés à exprimer une protéine à partir d'ARNm ou d'ADN plasmidique injecté dans les ovules .....	189
V.	Conclusion des travaux de la 3 <sup>ème</sup> partie .....	192

<b>Discussion générale &amp; perspectives</b> .....	193
I. Comparaison du profil d'expression de <i>Patl2</i> chez les Vertébrés.....	194
II. Caractérisation de la fonction de PATL2 chez les Vertébrés.....	195
III. Limites du modèle utilisé .....	196
IV. Utilisation du modèle murin <i>Patl2</i> <sup>-/-</sup> dans la recherche de nouveaux marqueurs de qualité ovocytaire et embryonnaire .....	197
Autres travaux de thèse.....	198
<b>Références Bibliographiques</b> .....	205

---

## Table des illustrations

---

Figure 1 : Le contrôle du cycle ovarien.....	24
Figure 2 : Le cycle œstral de la souris.....	25
Figure 3 : Interactions ovocytes - cellules folliculaires par les projections transzonales.....	27
Figure 4 : Interactions bi-directionnelles entre l'ovocyte et les cellules folliculaires. ....	28
Figure 5 : Représentation simplifiée des différents stades de la folliculogenèse chez la souris. ..	29
Figure 6 : Représentation schématique de la voie de signalisation PI3K/PTEN régulant l'activation des follicules primordiaux. ....	31
Figure 7 : Représentation schématique du follicule de De Graaf. ....	33
Figure 8: Représentation schématique de la structure du récepteur à la FSH (FSHR). ....	34
Figure 9 : Voies de signalisation impliquées dans la formation d'estradiol par les cellules de la granulosa. ....	35
Figure 10 : Représentation des facteurs sécrétés par l'ovocytes et les cellules somatiques, nécessaires au développement du follicule. ....	36
Figure 11 : cinétique du recrutement des follicules et de la sélection du follicule dominant chez la femme. ....	37
Figure 12 : Voies de signalisation à l'origine de l'expansion du cumulus. ....	41
Figure 13 : Voies de signalisation permettant de réguler la production de progestérone par le corps jaune. ....	43
Figure 14 : Intensité de l'activité transcriptionnelle au cours de l'ovogenèse chez la souris. ....	45
Figure 15 : Augmentation de CDK1, un prérequis à la maturation ovocytaire. ....	46
Figure 16 : Régulation de l'état d'activation du complexe CDK1/Cycline B1 par phosphorylation .....	46
Figure 17 : Régulation des voies de signalisation impliquées dans le maintien de l'arrêt méiotique .....	48
Figure 18 : Représentation schématique de la formation du fuseau dans les ovocytes. ....	51
Figure 19 : Le devenir des mitochondries paternelles dans les embryons de Mammifères. ....	54
Figure 20 : Réorganisation du réticulum endoplasmique au cours de la maturation ovocytaire chez la souris.....	56
Figure 21 : Modèle simplifié de l'interaction ovule-spermatozoïde. ....	60
Figure 22 : Le profil libération calcique est espèce-dépendante. ....	61
Figure 23 : Représentation simplifiée des voies de signalisation responsables de la libération de calcium et nécessaires à l'activation ovocytaire. ....	62
Figure 24 : L'exocytose des granules corticaux est médiée par le complexe SNARE.....	64
Figure 25 : L'activation ovocytaire, les événements contrôlés par le calcium. ....	65
Figure 26 : Chronologie du développement embryonnaire préimplantatoire et de l'activation du génome embryonnaire chez l'Homme et la souris. ....	67
Figure 27 : La régulation de l'expression des gènes dans les cellules eucaryotes. ....	68
Figure 28 : Ensemble des mécanismes permettant la formation des protéines dans les cellules eucaryotes. ....	70

Figure 29 : Etablissement et remodelage du transcriptome maternel chez la souris. ....	72
Figure 30 : Représentation simplifiée de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes. ....	74
Figure 31 : Régulation de l'initiation de la traduction dans les cellules eucaryotes. ....	75
Figure 32: Représentation simplifiée de la régulation de l'élongation de la queue poly(A) par CPEB1 chez le xénope. ....	77
Figure 33 : Représentation simplifiée de la régulation de la traduction par CPEB1 chez le xénope, proposition d'un modèle impliquant 4E-T. ....	78
Figure 34 : Régulation de la traduction de Ringo/Spy par le complexe PUM2-DAZL-EPAB au cours de la maturation ovocytaire. ....	79
Figure 35 : Evolution des protéines de la famille PAT1. ....	81
Figure 36 : Structure des protéines de la famille PAT1. ....	82
Figure 37 : Dualité de fonction de PAT1B dans le cytoplasme et le noyau. ....	84
Figure 38 : Les partenaires de PATL2 chez le xénope : des acteurs de la régulation des ARNm. ..	85
Figure 39: La maturité nucléaire. ....	89
Figure 40 : Observation du fuseau méiotique en microscopie à polarisation. ....	91
Figure 41 : Les anomalies morphologiques du premier globule polaire. ....	92
Figure 42 : Les anomalies cytoplasmiques des ovules : agrégats de réticulum endoplasmique lisse .....	94
Figure 43 : Les anomalies cytoplasmiques des ovules : la granulation et les corps réfractiles. ....	95
Figure 44 : Observation de la zone pellucide en microscopie à polarisation. ....	97
Figure 45 : Les anomalies de l'espace périvitellin. ....	98
Figure 46 : Observation d'un ovule de taille normale et d'un ovule géant chez la femme. ....	98
Figure 47 : Schéma récapitulatif des paramètres morphologiques utilisés pour évaluer la qualité d'un ovule. ....	99
Figure 48 : Chronologie du développement embryonnaire préimplantatoire chez la femme et chez la souris. ....	105
Figure 49 : Observation d'un halo cytoplasmique dans un embryon de femme au stade zygote .....	107
Figure 50 : Images d'embryons humains au stade morula présentant différents profils de compaction. ....	108
Figure 51 : Observation, par microscopie time lapse, des contractions de blastocystes humains .....	111
Figure 52 : Schéma simplifié illustrant l'apprentissage d'une intelligence artificielle pour l'évaluation de la qualité embryonnaire. ....	113
Figure 53 : Evolution de la consommation d'oxygène d'un embryon entre le stade zygote et le stade 8-cellules. ....	115
Figure 54 : Représentation schématique du système permettant de mesurer la consommation d'oxygène d'un embryon. ....	116
Figure 55 : Le profil de consommation d'oxygène au cours des premières divisions embryonnaires varie en fonction du potentiel d'implantation de l'embryon. ....	117
Figure 56 : Corrélacion entre le nombre de cellules d'un blastocyste et son potentiel de développement. ....	120

Figure 57 : Corrélation entre la dynamique cytoplasmique et les oscillations calciques suite à la fécondation d'un ovule de souris. ....	122
Figure 58 : le syndrome d'échec de maturation ovocytaire. ....	126
Figure 59 : Multiplicité des phénotypes liés aux mutations des gènes ZP1-4 chez la femme. ....	127
Figure 60 : Les facteurs génétiques responsables d'infertilité féminine. ....	131
Figure 61 : Profil d'expression de PATL2 dans les ovocytes et les embryons chez la souris. ....	151
Figure 62 : Anomalies morphologiques des ovules <i>Patl2</i> <sup>-/-</sup> obtenus en ovulation naturelle. ....	153
Figure 63 : Influence de l'absence de PATL2 sur la taille du fuseau méiotique. ....	154
Figure 64 : L'absence de PATL2 est responsable d'une altération du développement embryonnaire préimplantatoire. ....	156
Figure 65 : Anomalies morphologiques des blastocystes issus des femelles <i>Patl2</i> <sup>-/-</sup> . ....	157
Figure 66 : Analyse du niveau d'expression de gènes importants pour le développement embryonnaire, dans les blastocystes issus des femelles <i>Patl2</i> <sup>-/-</sup> . ....	159
Figure 67 : la stimulation ovarienne altère la morphologie des ovules <i>Patl2</i> <sup>+/+</sup> et <i>Patl2</i> <sup>-/-</sup> . ....	170
Figure 68 : la stimulation ovarienne influence le développement des embryons issus des femelles <i>Patl2</i> <sup>+/+</sup> et <i>Patl2</i> <sup>-/-</sup> , dès le stade 2-cellules. ....	172
Figure 69 : la stimulation ovarienne perturbe le développement embryonnaire préimplantatoire chez les femelles <i>Patl2</i> <sup>+/+</sup> et <i>Patl2</i> <sup>-/-</sup> . ....	174
Figure 70 : Personnalisation du protocole de stimulation ovarienne en fonction de la réserve ovarienne chez la femme. ....	177
Figure 71 : L'arbre généalogique des souris de laboratoire C57BL/6. ....	179
Figure 72 : Optimisation de la maturation ovocytaire in vitro : choix du milieu de culture. ....	182
Figure 73 : Comparaison de la structure de l'ADN et des morpholinos. ....	183
Figure 74 : Evaluation de l'efficacité des morpholinos par quantification de PATL2-HA en immunofluorescence. ....	184
Figure 75 : Vérification de l'innocuité de mCherry sur le développement embryonnaire préimplantatoire. ....	185
Figure 76 : Analyse de l'ARNm <i>Patl2</i> sur gel d'agarose et par Western Blot sur extraits protéiques de cellules HEK-293T transfectées. ....	186
Figure 77 : Production de protéines PATL2 à partir d'acides nucléiques injectés au cours d'une ICSI. ....	187
Figure 78 : Méthode permettant la détection des ARNm correctement coiffés et correctement polyadénylés. ....	191
Figure 79 : Différences du profil d'expression de PATL2/P100 chez le lapin et chez le xénope. .	194
Tableau 1 : Critères de classification des blastocystes adaptés de la méthode de DK. Gardner et W. Schoolcraft. ....	109
Tableau 2 : Composition du milieu KSOM. ....	138
Tableau 3 : Composition du milieu NIM. ....	139
Tableau 4 : Composition du milieu HCZB. ....	139
Tableau 5: Liste des anticorps utilisés. ....	145
Tableau 6 : Sélection des gènes dont l'expression est utilisée pour évaluer la qualité des blastocystes de souris <i>Patl2</i> <sup>-/-</sup> . ....	158

---

## Liste des abréviations

---

### -A-

AC : Adénylate Cyclase  
ACE : Association of Clinical Embryologists  
ADAMTS-1 : A Disintegrin And Metalloproteinase With Thrombospondin Motifs 1  
AGO : Argonaute  
AKT (PKB) : RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, (Protein Kinase B)  
AMP : Assistance Médicale à la Procréation  
AMPc : Adenosine MonoPhosphate Cyclique  
APC/C : Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome  
ARE : AU-Rich Element  
ARE-BP : ARE-Binding Protein  
AREG : Amphiregulin

### -B-

BAX : Bcl-2–Associated X  
BFS : British Fertility Society  
BIRC5 : Baculoviral IAP Repeat Containing 5  
BMP15 : Bone Morphogenetic Protein 15  
BMPR1B : Bone Morphogenetic Protein receptor type-IB  
BMPR2 : Bone Morphogenetic Protein receptor type II  
BRCA1 : BReast CAncer 1  
BTG4 : B-cell Translocation Gene 4  
BUB1 : Budding Uninhibited by Benomyl

### -C-

CaMKII : calcium/calmodulin dependent protein kinase II  
CAT : CATalase  
CCO : Complexe Cumulo-Ovocyttaire  
CCR4 : C-C chemokine Receptor type 4  
CDC : Cell Division Cycle  
CDK1 : Cyclin-Dependent Kinase 1  
CDX : Caudal-type homeobox  
CEEFs : Cumulus-Expansion Enabling Factors  
CKS2 : CDC28 Protein Kinase Regulatory Subunit 2  
CoQ10 : Coenzyme Q<sub>10</sub>  
CPE(B) : Cytoplasmic Polyadenylation Element (Binding protein)  
CPSF : Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor  
CREB : cAMP-response element-binding protein  
CSF : Facteur CytoStatique  
CSTF : Cleavage-STimulatory Factor  
CTSL : Cathepsin L  
Cx : Connexines

CYP11A1 : Cytochrome P450 Family 11 Subfamily A Member 1 (Protéine = P450SCC)  
CYP19A1 : Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1 (Protéine = Aromatase)

**-D-**

DAG : Diacylglycerol  
DAZL : Deleted in Azoospermia-Like  
DCP1/2 : mRNA-decapping enzyme subunit 1/2  
DDX6 : DEAD-Box Helicase 6

**-E-**

EB1 : End-Binding protein 1  
EDC3 : Enhancer Of mRNA DeCapping 3  
EDN2 : Endothelin-2  
EIF : Eukaryotic Initiation Factor  
EGA : Embryonic Genome Activation (Activation du Génome Embryonnaire)  
EGF(R) : Epidermal Growth Factor (Receptor)  
EIF4E : Eukaryotic translation Initiation Factor 4E  
4E-T : EIF4E transporter  
EMI : Early Mitotic Inhibitor  
EREG : Epregeulin  
ERK1/2 : Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2

**-F-**

FIGLA : Factor in the Germline Alpha  
FISH : Fluorescent In-Situ Hybridization  
FIV : Fécondation In Vitro  
FZR1 : Fizzy-Related protein homolog  
FOXO3 : Forkhead Box O3  
FSH : Follicle-Stimulating Hormone  
FSHR : Follicle-Stimulating Hormone Receptor

**-G-**

GDF9 : Growth Differentiation Factor 9  
GLD2 : Germ Line Development 2  
GLUT 1/5 : GLUcose Transporter 1/5  
GMPc : Guanosine Monophosphate Cyclique  
GM130 : Golgi Matrix protein  
GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormone  
GnSAF : Gonadotropin Surge-Attenuating Factor  
GPX1 : Glutathione Peroxidase 1  
GSTM2 : Glutathione S-Transferase Mu 2  
GV : Germinal Vesicle (vésicule germinale)  
GVBD : Germinal Vesicle Break Down (rupture de la vésicule germinale)  
G6PDH : Glucose-6-Phosphate DésHydrogénase

**-H-**

HAS: Hyaluronan Synthase 2

HCG : Human Chorionic Gonadotropin  
HEK : Human Embryonic Kidney  
HMG : Human Menopausal Gonadotrophin  
3 $\beta$ -HSD : 3 Beta-HydroxySteroid Dehydrogenase  
HSPA9B : Heat Shock Protein Family A, Member 9B

-I-

ICSI : Intra Cytoplasmic Serpm Injection (injection intracytoplasmique de spermatozoïde)  
IGF2 : Insulin-like Growth Factor 2  
IGFR : Insulin-like Growth Factor Receptor  
INft : Interferon-tau  
IP<sub>3</sub> : Inositol 1,4,5-triphosphate

-K-

KIF : Kinesin Family

-L-

LFNG : Lunatic fringe  
LH : Luteinizing Hormone  
LHR : Luteinizing Hormone Receptor  
LHX8 : LIM Homeobox protein 8  
LLPT : Liquid-Liquid Phase Transition  
LSM1-7 : Sm-Like protein 1-7

-M-

MAD2 : Mitotic Arrest Deficient  
MCI : Masse Cellulaire Interne  
MEI1 : Meiosis Inhibitor Protein 1  
MFN2 : Mitofusin 2  
MLCK : Myosin Light-Chain Kinase  
MLH1 : MutL Homolog 1  
MMAF : Multiple Morphological Abnormalities of the Flagella  
MMP : Matrix MetalloProteinase  
MPF : Maturation Promoting Factor  
MSY2 : Mouse Specific Y-box protein 2  
MTOC : MicroTubule Organizing Center  
mTORC1 : Mammalian Target of Rapamycin Complex 1

-N-

NEK5 : NIMA Related Kinase 5  
NES : Nuclear Export Signal  
NGS : Normal Goat Serum  
NLS : Nuclear Localization Signal  
Nobox : Newborn Ovary homeobox gene  
NPPC : Natriuretic Peptide Precursor type C  
NPR2 : Natriuretic Peptide Receptor 2  
NSN : Non-Surrounded Nucleolus  
NuMA : Nuclear Mitotic Apparatus

**-O-**

OCT4 : Octamer-binding transcription factor 4, (gène = POU5F1)  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé

**-P-**

PABP : Poly(A)-Binding Protein  
PAF : Platelet Activating Factor  
PAK4 : P21 Protein (Cdc42/Rac)-Activated Kinase 4  
PAN3 : Poly(A) Specific Ribonuclease Subunit PAN3  
PAP : Poly(A) Polymerase  
PAPPA : Pregnancy Associated Plasma Protein-A  
PAS : PolyAdenylation Site  
PAT : Protein Associated with Topoisomerase II  
PATL2: PAT1 Homolog 2  
PBE : Pumilio-Binding Element  
PBS : Phosphate Buffered Saline  
PDE : PhosphoDiEstérase  
PGR : Progesterone Receptor  
PIC : Pre-Initiation Complex  
PIP<sub>2</sub> : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate  
PI3K : Phosphatidylinositol 3 Kinase  
PKA : Protéine Kinase A  
PKR : dsRNA-dependent Protein Kinase  
PLK1 : Polo-Like Kinase 1  
PMSG : Pregnant Mare Serum Gonadotropin  
POU5F1 : POU Domain, Class 5, Transcription Factor 1 (Protéine = OCT4)  
PRDX3 : Peroxiredoxin 3  
PGRMC1: Progesterone Receptor Membrane Component 1  
PRKAR $\beta$  : Protein Kinase CAMP-Dependent Type II Regulatory Subunit Beta)  
PTEN : Phosphatase and Tensin homolog detected on chromosome 10  
PTGS2 : Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2  
PTX 3 : Pentraxin 3  
PUF : Pumilio Family  
PUM1/PUM2 : Pumilio 1/Pumilio2  
PVDF : PolyVinylidene Fluoride

**-R-**

RASD1 : Ras Dexamethasone-induced protein 1  
RBD : RNA-Binding Domain  
RBP : RNA-Binding Proteins  
RE : Réticulum endoplasmique  
RINGO : Rapid Inducer of G2-M in Oocytes  
RNP : RiboNucléoProtéines  
RRM : RNA Recognition Motif

**-S-**

SIAE : Sialic acid Acetyl Esterase  
SCD1 : Stéaryl-CoA Désaturase 1  
SCMC : SubCortical Maternal Complex

SDHA : Succinate Dehydrogenase Complex, Subunit A  
SERC : Smooth Endoplasmic Reticulum Cluster  
SERCA : Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase  
SGO2 : Shugoshin 2  
SMC1B : Structural Maintenance of Chromosomes 1B  
SN : Surrounded Nucleolus  
SOC : Store-Operated Channels  
SOD1/2 : SuperOxide Dismutase 1/2  
SOHLH1 : Spermatogenesis And Oogenesis Specific Basic Helix-Loop-Helix 1  
SRE : Smaug Recognition Element  
STAR : STeroidogenic Acute Regulatory protein

**-T-**

TACCs : Transforming Acidic Coiled Coil  
TAFs : TBP-Associated Factors  
TBP2 : TATA-box-binding protein 2  
TBPL2 : TBP-Like 2  
TGF- $\beta$  : Transforming Growth Factor- $\beta$   
TLE6 : Transducin-Like Enhancer of split 6  
TLR : Toll-Like Receptor  
TNFAIP6 : Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Protein 6  
TOP2B : ADN Topoisomérase II Beta  
TP 53 : Tumor Protein 53  
TRIP13 : Thyroid Receptor-Interacting Protein 13  
TRP : Transient Receptor Potential  
TSC1 : Tuberous Sclerosis Complex 1  
TUBB8 : Tubulin Beta 8 Class VIII  
TXN2 : Thioredoxin 2

**-X-**

XRN1 : 5'-3' Exoribonuclease 1

# Introduction

# Bibliographique

---

## Chapitre n°1 : La biogenèse des ovocytes de Mammifères

---

### I. Le système reproducteur féminin

#### 1. Contexte général

L'appareil reproducteur interne féminin est composé du vagin, des ovaires, des oviductes et de l'utérus. Chez la femme, les oviductes sont appelés trompes de Fallope. Les ovocytes sont produits et stockés dans les ovaires, organe assurant également une fonction endocrine via la sécrétion d'œstrogènes et de progestérone. De façon cyclique, tous les 28 jours en moyenne chez la femme et tous les 4,5 jours chez la souris, un ou plusieurs ovocyte(s) est (sont) libéré(s) dans un oviducte ou une trompe de Fallope où il(s) pourra (pourront) être fécondé(s) par un spermatozoïde. Tout en migrant le long de la trompe de Fallope/oviducte, l'embryon ainsi formé se divisera par mitoses successives pour former un blastocyste au cours d'un processus appelé développement embryonnaire préimplantatoire. Au 4<sup>ème</sup> jour post fécondation chez la souris et au 5<sup>ème</sup> jour post fécondation chez la femme, le blastocyste éclos pour s'implanter dans l'endomètre, muqueuse qui tapisse l'intérieur de l'utérus. Cette étape, appelée nidation, a lieu 5 jours après la fécondation chez la souris et entre 7 et 10 jours après la fécondation chez la femme.

Dans ce manuscrit, le gamète féminin stocké dans les ovaires est appelé ovocyte. Le terme ovocyte GV (Germinale Vesicle) sera utilisé pour parler d'un ovocyte primaire bloqué en prophase de première méiose, stade caractérisé par la présence de la vésicule germinale. Au cours de sa maturation, l'ovocyte achève la première division de méiose avant de subir un nouvel arrêt méiotique en métaphase de seconde méiose. Il devient alors un ovocyte MII. Une fois ovulé, ce gamète devient un ovule qui pourra être fécondé pour former un zygote. Le terme ovule immature sera utilisé pour décrire un gamète ovulé sans avoir atteint le stade de maturation caractéristique des ovules.

#### 2. Axe gonado-hypothalamo-hypophysaire

L'axe gonado-hypothalamo-hypophysaire, regroupant l'hypothalamus, l'hypophyse et les gonades, est un acteur essentiel du contrôle du système reproducteur puisqu'il permet la sécrétion d'hormones clés de la reproduction. Sécrétée de manière pulsatile par l'hypothalamus, la GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) permet la sécrétion de LH (Luteinizing Hormone) et de FSH (Follicle-Stimulating Hormone) par l'antéhypophyse. La LH et la FSH sont des gonadotrophines ou hormones gonadotropes qui régulent le fonctionnement des gonades. Ces gonadotrophines sont des glycoprotéines composées d'une sous-unité alpha commune et d'une sous-unité bêta propre à chacune. Leurs récepteurs respectifs sont tous deux des récepteurs transmembranaires appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. En se fixant sur son récepteur FSHR (Follicle-Stimulating Hormone Receptor) à la surface des cellules de la granulosa, la FSH permet de stimuler la croissance des follicules et la sécrétion d'œstrogène et de

progestérone (Palermo, 2007). La LH qui se fixe à son récepteur LHR (Luteinizing Hormone Receptor) à la surface des cellules de la thèque est nécessaire à la maturation ovocytaire, à l'ovulation et au développement du corps jaune (ou *corpus luteum*) qui se forme à partir du follicule après l'ovulation. En retour, le corps jaune produit de la progestérone qui permet de préparer l'endomètre à l'accueil de l'embryon. La LH permet aussi la sécrétion d'androgènes par les cellules de la thèque. Une sécrétion anormale de LH peut conduire à une altération de la maturation ovocytaire, une absence d'ovulation et peut perturber le cycle menstruel de la femme, le tout pouvant conduire à une infertilité. De même, une anomalie au niveau du récepteur de la FSH peut conduire à une insuffisance ovarienne prématurée (Cordts, Christofolini, Dos Santos, Bianco, & Barbosa, 2011).

### 3. Le cycle ovarien : cas de la femme

D'une durée d'environ 28 jours, le cycle ovarien, hautement régulé, se divise en trois phases : la phase folliculaire, l'ovulation et la phase lutéale (Messinis, Messini, & Dafopoulos, 2014), (Figure 1).

Phase folliculaire : au début de la phase folliculaire, les cellules de la granulosa des follicules en croissance sécrètent de l'inhibine B et de la GnSAF (Gonadotropin Surge-Attenuating Factor). L'inhibine B inhibe la sécrétion de FSH et la GnSAF limite la sécrétion de LH. L'estradiol, d'abord produit en faible quantité, stimule la croissance de l'endomètre et exerce un rétrocontrôle négatif sur le complexe hypothalamo-hypophysaire. A la fin de la phase folliculaire, l'inhibine B diminue ce qui permet une augmentation de la FSH qui favorise la croissance des follicules antraux et la production d'estradiol.

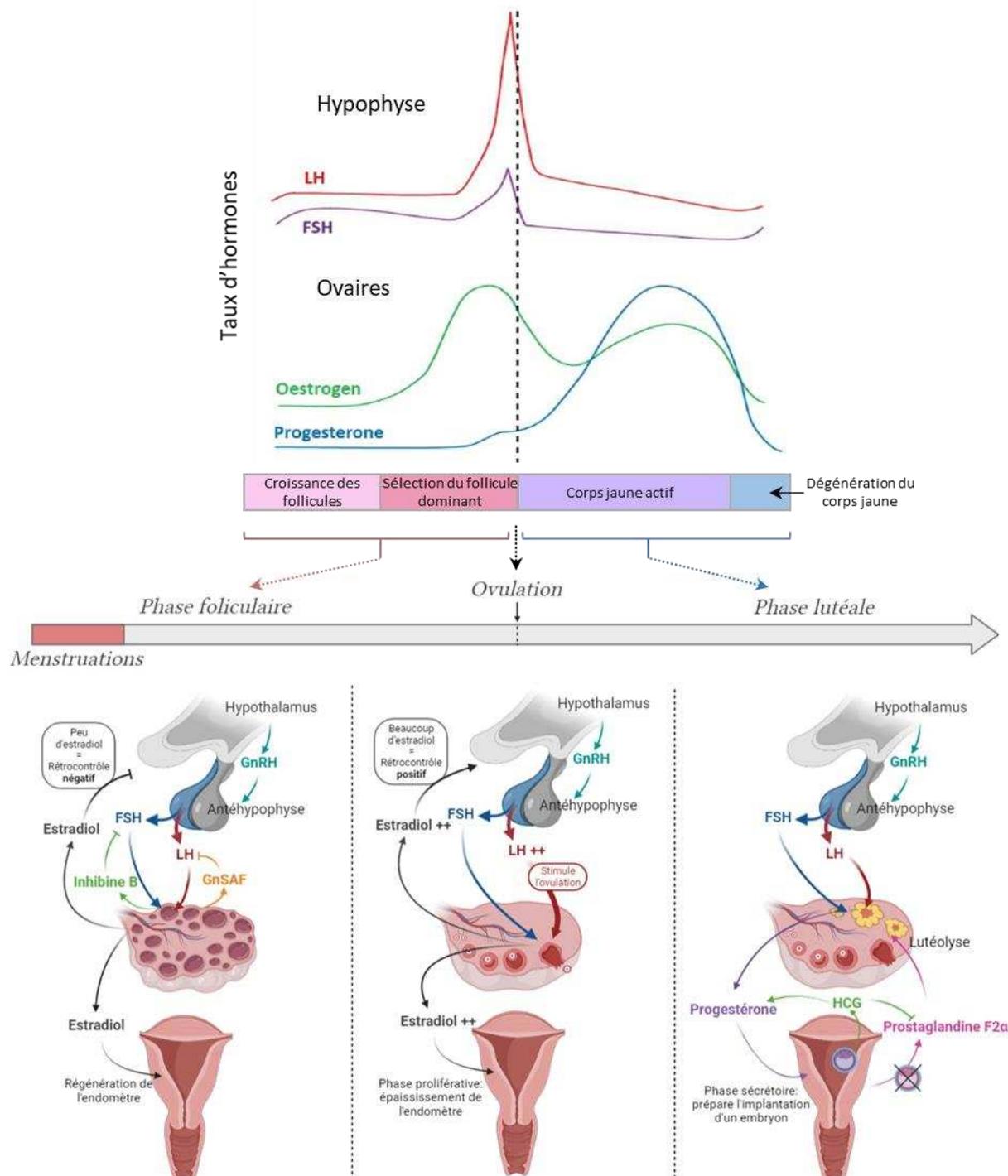
Ovulation : la sélection du follicule dominant s'accompagne d'une forte augmentation du taux d'estradiol et la dégénérescence des follicules subordonnés entraîne une diminution de la GnSAF levant ainsi l'inhibition de la production de LH. L'estradiol, produit en grande quantité exerce désormais un rétrocontrôle positif sur le complexe hypothalamo-hypophysaire et la sécrétion de GnRH augmente. Ce rétrocontrôle positif, associé à la diminution de l'inhibine B et de la GnSAF, permet la production de gonadotrophines et notamment de LH. L'élévation rapide de la LH déclenche alors l'ovulation.

Phase lutéale : après l'ovulation, le reste du follicule forme le corps jaune qui produit une grande quantité d'inhibine A et de progestérone. Sous l'effet de la progestérone, l'endomètre entre en phase sécrétoire permettant l'accueil d'un embryon.

En absence de grossesse, l'utérus produit de la prostaglandine F2 $\alpha$  qui induit la dégénérescence du corps jaune, c'est la lutéolyse. La dégradation du corps jaune entraîne une diminution de la progestérone et de l'estradiol qui, associés à l'augmentation de la prostaglandine F2 $\alpha$ , permet les contractions et la desquamation de l'endomètre. Un nouveau cycle débute avec les menstruations, la diminution de la progestérone et de l'estradiol permet une augmentation transitoire de la FSH qui signe l'entrée dans une nouvelle phase folliculaire (Messinis et al., 2014).

En cas de gestation, les cellules du trophoblaste produisent de l'HCG qui stimule la sécrétion de progestérone, d'inhibine A et d'estradiol et inhibe la production de prostaglandine F2 $\alpha$ . Le rétrocontrôle négatif du complexe hypothalamo-hypophysaire réduit la sécrétion de

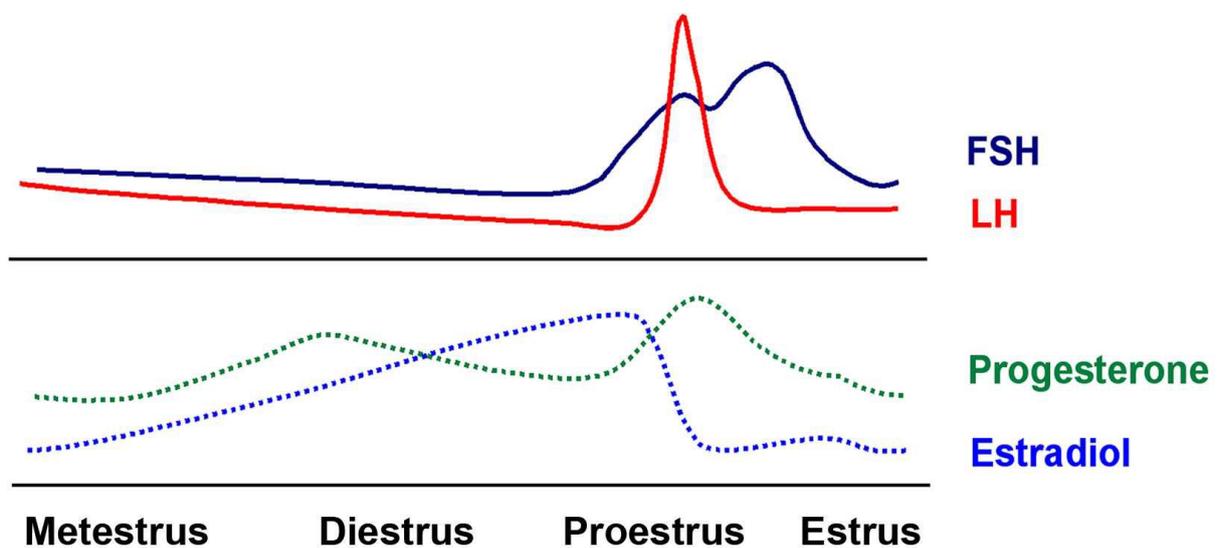
gonadotrophines et bloque l'entrée dans une nouvelle phase folliculaire (Mihm, Gangooly, & Muttukrishna, 2011).



**Figure 1 : Le contrôle du cycle ovarien.**  
Figure créée avec BioRender.

#### 4. Le cycle œstral : cas de la souris

Le modèle souris est largement utilisé dans les études de biologie de la reproduction. Le cycle œstral de la souris, qui dure en moyenne 4.5 jours, est composé de quatre phases : le proœstrus, l'œstrus, le metœstrus et le diœstrus. Le proœstrus correspond à la fin de la phase folliculaire de la femme et est caractérisé par des changements au niveau de l'utérus et notamment un épaissement de l'endomètre. Au début du proœstrus, le taux d'œstradiol est élevé, s'ensuit une augmentation rapide du taux de FSH et de LH puis une diminution brutale du taux d'œstradiol. Cette diminution marque l'entrée dans l'œstrus qui correspond à la phase ovulatoire (Figure 2). Chez la souris, l'ovulation se fait à la fin de l'œstrus, soit environ 12 h après le pic de FSH et de LH. Le metœstrus, d'une durée d'environ 8 h chez la souris, est la phase la plus courte du cycle œstral. Elle est suivie par le diœstrus d'une durée d'environ 48 à 72 h. Ces deux phases sont marquées par une nouvelle augmentation du taux d'œstradiol (Ajayi & Akhigbe, 2020).



**Figure 2 : Le cycle œstral de la souris.**

Au cours du metœstrus et du diœstrus, la quantité d'œstradiol augmente progressivement pour atteindre un pic lors du proœstrus. Ce pic d'œstradiol permet la production de FSH et de LH nécessaire à l'ovulation. Ainsi, l'ovulation a lieu au cours de l'œstrus, environ 12 h après le pic de FSH et de LH. D'après (Miller & Takahashi, 2013).

## II. La folliculogénèse : de la formation du follicule à sa dégradation

### 1. Etablissement de la lignée germinale

La production des ovocytes commence durant le développement embryonnaire avec la prolifération intense des cellules germinales primordiales qui se différencient en spermatogonies chez l'homme et en ovogonies chez la femme. Entre la 6<sup>ème</sup> et la 20<sup>ème</sup> semaine de gestation, le nombre d'ovogonies présentes dans les ovaires du fœtus passe d'environ 10 000 à environ 7 millions. Entre 8 et 13 semaines de gestation, les ovogonies vont entrer en première division de méiose pour former des ovocytes primaires arrêtés au stade diplotène de la première prophase. A partir de la 20<sup>ème</sup> semaine de gestation, une quantité importante de ces cellules rentre en

atréisie. À la naissance, les ovaires du nouveau-né contiennent environ 1 million d'ovocytes primaires (Jamnongjit & Hammes, 2005; Machaty, Miller, & Zhang, 2017; Oktem & Urman, 2010). Ce manuscrit s'intéresse au développement et à la qualité des ovocytes à partir du stade primaire, la biogenèse des ovocytes avant la naissance ne sera pas détaillée.

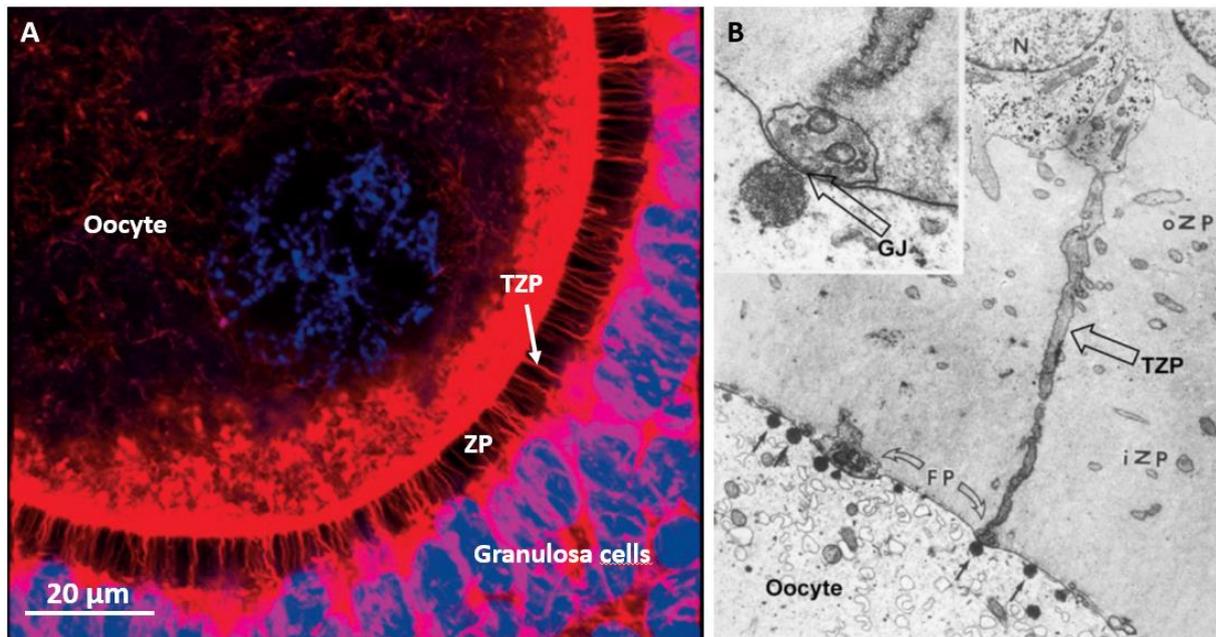
## 2. Les interactions ovocytes – cellules folliculaires

Le follicule, unité fonctionnelle des ovaires, est une structure sphérique composée d'un ovocyte entouré de différents types de cellules somatiques : les cellules de la granulosa (également appelées cellules folliculaires) et les cellules de la thèque. En fonction de leur état de différenciation, les cellules de la granulosa forment les cellules murales de la granulosa ou les cellules du cumulus. Les cellules de la thèque, quant à elles, forment les cellules de la thèque interne et les cellules de la thèque externe. Les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque sont séparées par la membrane basale.

Les cellules folliculaires, qui se multiplient activement au cours de la croissance ovocytaire, sont essentielles à la formation d'un ovule capable de se développer. Les interactions entre l'ovocyte et les cellules qui l'entourent sont permanentes et bidirectionnelles, et ce, malgré la présence de la zone pellucide qui les sépare. Il existe différents types d'interactions entre l'ovocyte et les cellules folliculaires.

### 2.a. Les projections transzonales

Les projections transzonales (PTZ) sont des extensions cytoplasmiques des cellules folliculaires qui traversent la zone pellucide pour atteindre la membrane plasmique de l'ovocyte (**Figure 3**). Au niveau de la zone de contact entre les projections transzonales et la membrane plasmique de l'ovocyte, se trouvent deux types de jonctions : les jonctions adhérentes (ou zonula) composées de protéines de la famille des cadhérines et des caténines et qui participent à l'adhésion cellulaire, et des jonctions communicantes, aussi appelées « gap jonctions », formées par des protéines de types connexines (R. Li & Albertini, 2013). Les jonctions communicantes permettent les échanges de molécules telles que des sucres, des acides aminés ou des acides nucléiques (Clarke, 2018) et participent à réguler la maturation ovocytaire puisqu'elles assurent le transfert du cGMP des cellules de la granulosa vers l'ovocyte, permettant ainsi le maintien de l'arrêt méiotique (Baena & Terasaki, 2019), (**Figure 4**).



**Figure 3 : Interactions ovocytes - cellules folliculaires par les projections transzonales.**

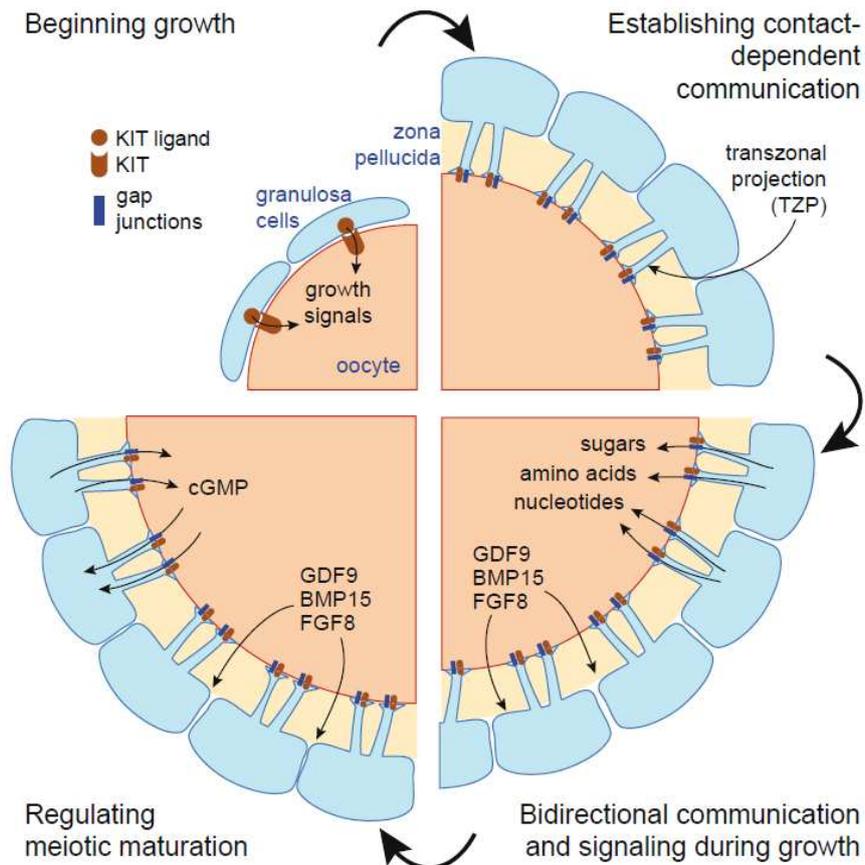
Les projections transzonales (TZP) sont des prolongements cytoplasmiques des cellules de la granulosa qui traversent la zone pellucide et rentrent en contact avec l'ovocyte par l'intermédiaire des jonctions communicantes.

A : observation des TZP dans un follicule bovin par marquage des filaments d'actine avec de la phalloïdine (rouge). D'après (R. Li & Albertini, 2013).

B : observation, en microscopie électronique à transmission, des TZP et des jonctions communicantes (gap jonction, GJ) présentes à l'interface entre un ovocyte et les cellules de la granulosa chez le marmouset. D'après (Gilchrist, Lane, & Thompson, 2008).

### 2.b. Les interactions paracrine

L'ovocyte communique également avec les cellules folliculaires de manière paracrine, c'est-à-dire par l'intermédiaire de composés qui, sécrétés par une cellule, agissent sur les cellules voisines. GDF9 (Growth Differentiation Factor 9) et BMP15 (Bone Morphogenetic Protein 15) sont des facteurs de croissance de la famille des TGF $\beta$  sécrétés par l'ovocyte et qui régulent la prolifération des cellules de la granulosa au cours de la folliculogenèse (Figure 4). De même, les CEEF sécrétés par l'ovocyte agissent de manière paracrine sur les cellules du cumulus afin d'initier l'expansion du cumulus (Gilchrist et al., 2008).



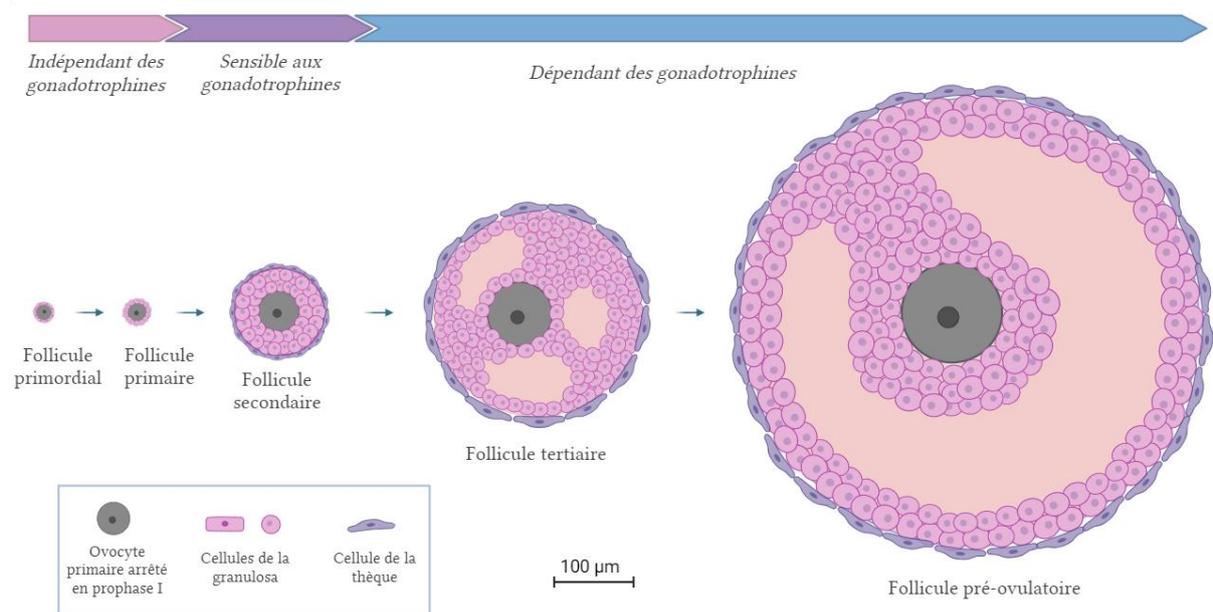
**Figure 4 : Interactions bi-directionnelles entre l'ovocyte et les cellules folliculaires.**

Dans les follicules primordiaux, avant la mise en place de la zone pellucide, la membrane plasmique de l'ovocyte est en contact direct avec celle des cellules de la granulosa. L'activation des follicules primordiaux passe par l'interaction entre le ligand kit sécrété par les cellules de la granulosa et son récepteur à la surface de l'ovocyte. Dans le follicule en croissance, la mise en place de la zone pellucide sépare l'ovocyte des cellules de la granulosa. Ces dernières entrent alors en contact avec l'ovocyte grâce à des prolongements cytoplasmiques qui passent à travers la zone pellucide et se terminent par différents types de jonctions et notamment des jonctions communicantes (gap junctions) qui assurent le transfert de nutriments et de cGMP vers l'ovocyte. En retour, l'ovocyte sécrète des facteurs de croissance (GDF9, BMP15) agissant sur les cellules de la granulosa de manière paracrine. Les interactions entre l'ovocyte et les cellules folliculaires sont donc bidirectionnelles et essentielles à la croissance des follicules et à la régulation méiotique. D'après (Clarke, 2018).

### 3. Formation des follicules primordiaux

L'ovogenèse et la folliculogenèse sont deux processus étroitement liés puisque chaque ovocyte grandit et mature au sein de son follicule. La folliculogenèse peut être divisée en deux phases : la phase pré-antrale et la phase antrale. Au cours de la phase pré-antrale, la croissance des follicules est indépendante des gonadotrophines. A la 15<sup>ème</sup> semaine de gestation, les ovocytes primaires, d'un diamètre d'environ 35 µm, s'entourent d'une couche unique de cellules épithéliales aplaties, appelées cellules de la granulosa, et forment les follicules primordiaux. A la

naissance, ces follicules insensibles aux gonadotrophines sont stockés dans un état quiescent et constituent la réserve ovarienne de la femme (Conti & Chang, 2016; Oktem & Urman, 2010).



**Figure 5 : Représentation simplifiée des différents stades de la folliculogénèse chez la souris.**

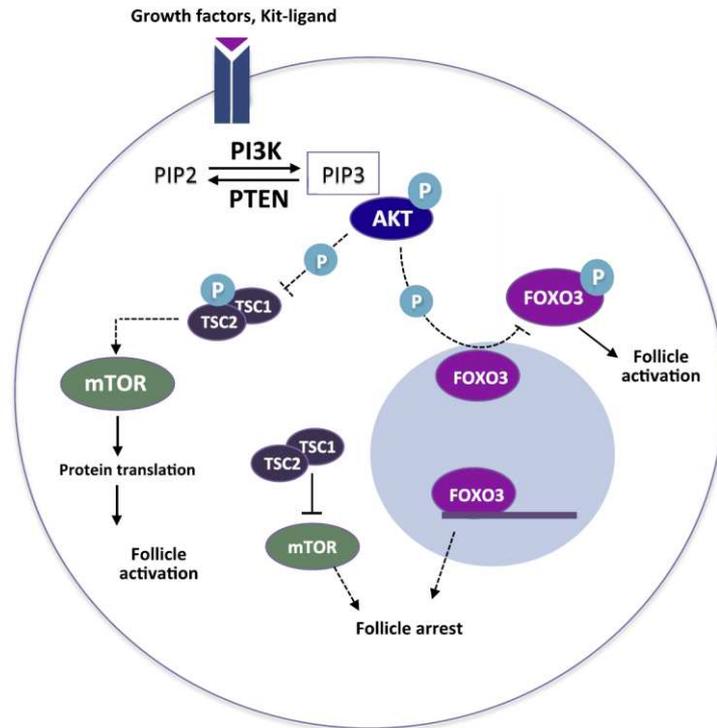
A la naissance, la réserve ovarienne est constituée de follicules primordiaux composés d'un ovocyte primaire occupant la majorité du volume du follicule. Cet ovocyte est arrêté en prophase I et entouré d'une couche unique de cellules de la granulosa. Chez la souris, le follicule primordial mesure environ 25 µm de diamètre et contient un ovocyte mesurant environ 17 µm. Chez la femme, le follicule primordial de 40 µm de diamètre contient un ovocyte primaire mesurant environ 35 µm. Régulièrement et de façon indépendante des gonadotrophines, une cohorte de follicules primordiaux est recrutée et reprend son développement. Les cellules de la granulosa, initialement aplaties, prennent une forme cubique dans les follicules primaires puis se multiplient pour former les follicules secondaires entourés de plusieurs couches de cellules de la granulosa. Une nouvelle couche de cellules appelées cellules de la thèque se forme en périphérie des follicules secondaires. Dans les follicules pré-antraux désormais sensibles aux gonadotrophines, du liquide commence à s'accumuler entre les cellules de la granulosa, ce liquide formera la cavité caractéristique des follicules antraux. A partir de la puberté, l'augmentation de la FSH circulante stimule le recrutement cyclique d'un groupe de follicules antraux au sein duquel le follicule dominant se démarquera par une croissance plus importante. Le follicule dominant sécrète alors de l'inhibine et des œstrogènes ayant pour conséquence l'arrêt du développement des autres follicules. Chez la souris, le diamètre du follicule pré-ovulatoire est d'environ 550 µm. Chez la femme, il atteint les 2 mm. Figure créée avec BioRender.

#### 4. Activation des follicules primordiaux et formation des follicules primaires

Au cours d'un processus appelé recrutement initial, un pool de follicules primordiaux est sélectionné et rentre en croissance. Le recrutement initial, indépendant des gonadotrophines, s'oppose au recrutement cyclique qui permettra, à partir de la puberté, de sélectionner un follicule

dominant qui sera ovulé (McGee & Hsueh, 2000). Parmi les follicules sélectionnés, l'immense majorité va dégénérer au cours d'un processus appelé atresie.

La formation des follicules primaires à partir de follicules primordiaux se caractérise par un changement de forme des cellules de la granulosa : initialement aplaties dans les follicules primordiaux, les cellules de la granulosa prennent une forme cubique dans les follicules primaires. De plus, ces cellules commencent à exprimer les récepteurs de la FSH. La zone pellucide commence à se former autour de l'ovocyte et les jonctions communicantes s'installent entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa, en passant par la zone pellucide. Ce phénomène est finement régulé et plusieurs voies de signalisation sont impliquées. Acteur clé de cette régulation, la voie de signalisation PTEN/PI3K joue un rôle majeur dans l'activation des follicules primordiaux. Cette voie de signalisation met en jeu deux protéines antagonistes : la phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin homolog detected on chromosome 10) responsable du maintien des follicules dans un état quiescent et PI3K (Phosphatidylinositol 3 Kinase), une protéine kinase nécessaire à l'activation des follicules primordiaux. La fixation du ligand kit, un facteur de croissance sécrété par les cellules de la granulosa, à son récepteur à la surface des ovocytes, permet l'activation de la protéine kinase PI3K. En phosphorylant PIP2 en PIP3, PI3K permet la phosphorylation et l'activation de la protéine kinase B ou AKT, une sérine-thréonine kinase impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire. Cette protéine kinase va alors phosphoryler et inhiber FOXO3 (forkhead box O3), un facteur de transcription impliqué dans l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire qui maintient l'ovocyte dans un état quiescent (Reddy et al., 2005) (Sanchez & Smitz, 2012). L'activation de AKT permet également la phosphorylation et l'inactivation de TSC1 (Tuberous Sclerosis Complex 1), un gène suppresseur de tumeur qui régule négativement mTORC1 (Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1) et maintient, lui aussi, les follicules dans un état quiescent (Sanchez & Smitz, 2012). Ainsi, l'inhibition de FOXO3 et l'activation de mTOR via PI3K permet l'activation des follicules primordiaux et la formation des follicules primaires.



**Figure 6 : Représentation schématique de la voie de signalisation PI3K/PTEN régulant l'activation des follicules primordiaux.**

L'activation de PI3K via la fixation du ligand kit sur son récepteur à la surface des ovocytes permet de phosphoryler et d'activer AKT. En retour, AKT phosphoryle FOXO3 qui est alors transloqué du noyau vers le cytoplasme et devient inactif. En inhibant TSC1, régulateur négatif de mTORC1, l'activation de AKT permet également l'activation de mTORC1. Ainsi, l'inactivation de FOXO3 et l'activation de mTORC1 participent au développement des follicules primordiaux et des follicules primaires (Sanchez & Smitz, 2012).

*NOBOX* (Newborn ovary homeobox gene), gène exprimé par l'ovocyte, est un acteur essentiel de la folliculogénèse puisque son absence chez la souris rend les femelles infertiles du fait d'un arrêt du développement folliculaire au stade follicule primordial. *NOBOX* est un facteur de transcription qui régule l'expression de plusieurs gènes clés de la folliculogénèse, dont *GDF9* et *BMP15*, des facteurs de croissance sécrétés par l'ovocytes et qui agissent de manière paracrine sur les cellules de la granulosa.

L'expression des récepteurs de la FSH par les cellules de la granulosa et la formation des jonctions communicantes entre ces cellules et l'ovocyte sont deux événements clés ayant lieu dans les follicules primaires. L'expression des récepteurs à la FSH est contrôlée par l'activine, hormone antagoniste de l'inhibine, produite par les cellules de la granulosa et agissant ici de manière autocrine (Conti & Chang, 2016). En 1993, Manabu Nakamura et son équipe ont montré que le traitement des cellules de la granulosa de rats avec de l'activine permet d'augmenter de manière dose dépendante la quantité d'ARNm codant pour le récepteur à la FSH (M. Nakamura et al., 1993). Les jonctions communicantes sont composées de protéines transmembranaires qui forment des pores permettant des échanges d'ions et de petites molécules inférieures à 1 kD (incluant l'Adenosine 3',5'MonoPhosphate Cyclique ou AMPc) entre deux cellules adjacentes.

L'unité fondamentale des jonctions communicantes s'appelle le connexon et est composée de protéines appartenant à la famille des connexines (Cx). Les connexines 32 (Cx32) et 43 (Cx43) forment les jonctions des cellules de la granulosa entre elles. Chez les souris déficientes en Cx43, les cellules de la granulosa ne prolifèrent pas et la folliculogénèse s'arrête avant le stade de follicule secondaire (Ackert, Gittens, O'Brien, Eppig, & Kidder, 2001). Les connexines 37 (Cx37) forment les jonctions communicantes entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa qui l'entourent. L'absence de ces connexines chez les souris est responsable d'une infertilité des femelles du fait d'une absence d'ovulation et de la production d'ovocytes méiotiquement incompetents, caractérisés par une forte altération de leur capacité à faire la GVBD (Germinal Vesicle Break Down), première étape de la reprise de la méiose (Simon, Goodenough, Li, & Paul, 1997). Cela souligne donc l'importance des facteurs apportés par les cellules de la granulosa, tant pour leur prolifération que pour la maturation de l'ovocyte.

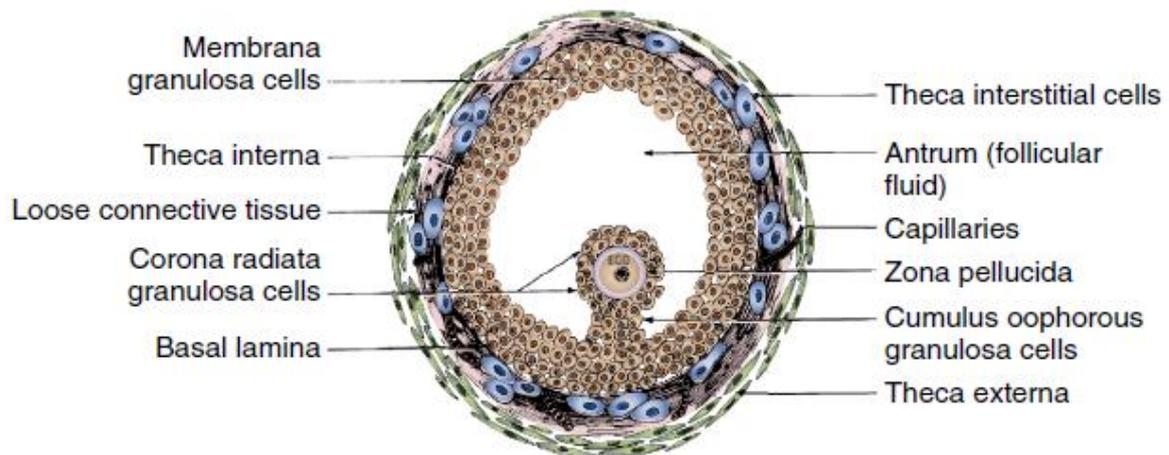
## 5. Du follicule primaire au follicule secondaire

Dans le follicule secondaire, l'ovocyte grossit et s'entoure de plusieurs couches de cellules de la granulosa. Une couche de cellules se différencie pour former les cellules de la thèque, séparées des cellules de la granulosa par la membrane de Slavjanski. Les cellules de la thèque sont entourées de vaisseaux sanguins qui assurent le transport des nutriments et des gonadotrophines vers le follicule. Le développement du follicule secondaire prend plusieurs mois chez la femme et est indépendant des gonadotrophines. Il dépend de plusieurs facteurs sécrétés par les cellules de la granulosa (l'activine), les cellules de la thèque (BMP4 et BMP7) ou bien par l'ovocyte lui-même (TBP2, GDF9, BMP15).

TBP2 (TATA-box-binding protein 2) est un facteur de transcription exprimé exclusivement par l'ovocyte et impliqué dans la régulation de la transcription. Son absence chez la souris entraîne une dérégulation de l'expression de plusieurs gènes clés de la folliculogénèse dont *Bmp15* et *Gdf9*. Les femelles déficientes en TBP2 ont une réduction du nombre de follicules secondaires et sont infertiles. GDF9 et BMP15 sont des protéines appartenant à la famille des TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) et régulées par NOBOX. Sécrétées exclusivement par l'ovocyte, elles régulent le développement des follicules, la maturation ovocytaire et l'ovulation. GDF9 a une importance toute particulière dans la formation des follicules secondaires car elle régule la prolifération des cellules de la granulosa de façon indépendante de la FSH (Elvin, Clark, Wang, Wolfman, & Matzuk, 1999). La fixation de GDF9 sur son récepteur Bmpr2 (BMP receptor type II) sur les cellules de la granulosa permet l'activation de la voie de signalisation SMAD2/3 via ALK5. BMP15, quant à elle, active la voie de signalisation SMAD1/5/8 via ALK6 (Cadenas et al., 2022; Vitt, Mazerbourg, Klein, & Hsueh, 2002). Chez la souris, les femelles déficientes en GDF9 sont infertiles du fait d'un arrêt de la folliculogénèse au stade de follicule primaire. BMP15 régule également la prolifération des cellules du cumulus. Toujours chez la souris, elle est moins essentielle que GDF9 puisque les femelles déficientes en BMP15 sont sous-fertiles (Yan et al., 2001). Chez la femme, une dérégulation de GDF9 ou BMP15 est observée chez des patientes atteintes du syndrome des ovaires polykystiques ou d'insuffisance ovarienne précoce (Chang, Qiao, & Leung, 2016).

## 6. Formation du follicule tertiaire et du follicule antral

A la fin du stade de follicule secondaire, lorsque celui-ci mesure environ 200  $\mu\text{m}$  de diamètre, du liquide commence à s'accumuler entre certaines cellules de la granulosa et le follicule devient un follicule tertiaire ou pré-antral, dont les cellules de la granulosa expriment les récepteurs à la FSH et à la LH, et les cellules de la thèque expriment les récepteurs à la LH. Au cours du développement pré-antral, la taille de l'ovocyte augmente rapidement, les cellules de la granulosa et de la thèque continuent de proliférer, la vascularisation autour des cellules de la thèque augmente et le follicule devient sensible aux gonadotrophines. Lorsque le follicule atteint 400  $\mu\text{m}$ , le fluide forme une cavité appelée antrum, d'où le nom de follicule antral ou cavitaire. Les cellules de la granulosa se différencient en deux populations : les cellules murales et les cellules du cumulus. Les cellules de la thèque se différencient également et forment les cellules interstitielles de la thèque qui expriment les récepteurs à la LH, et les cellules de la thèque externe. A la fin du développement de l'antrum, le follicule est un follicule de De Graaf, ce qui correspond au dernier stade de maturation des follicules (Figure 7).



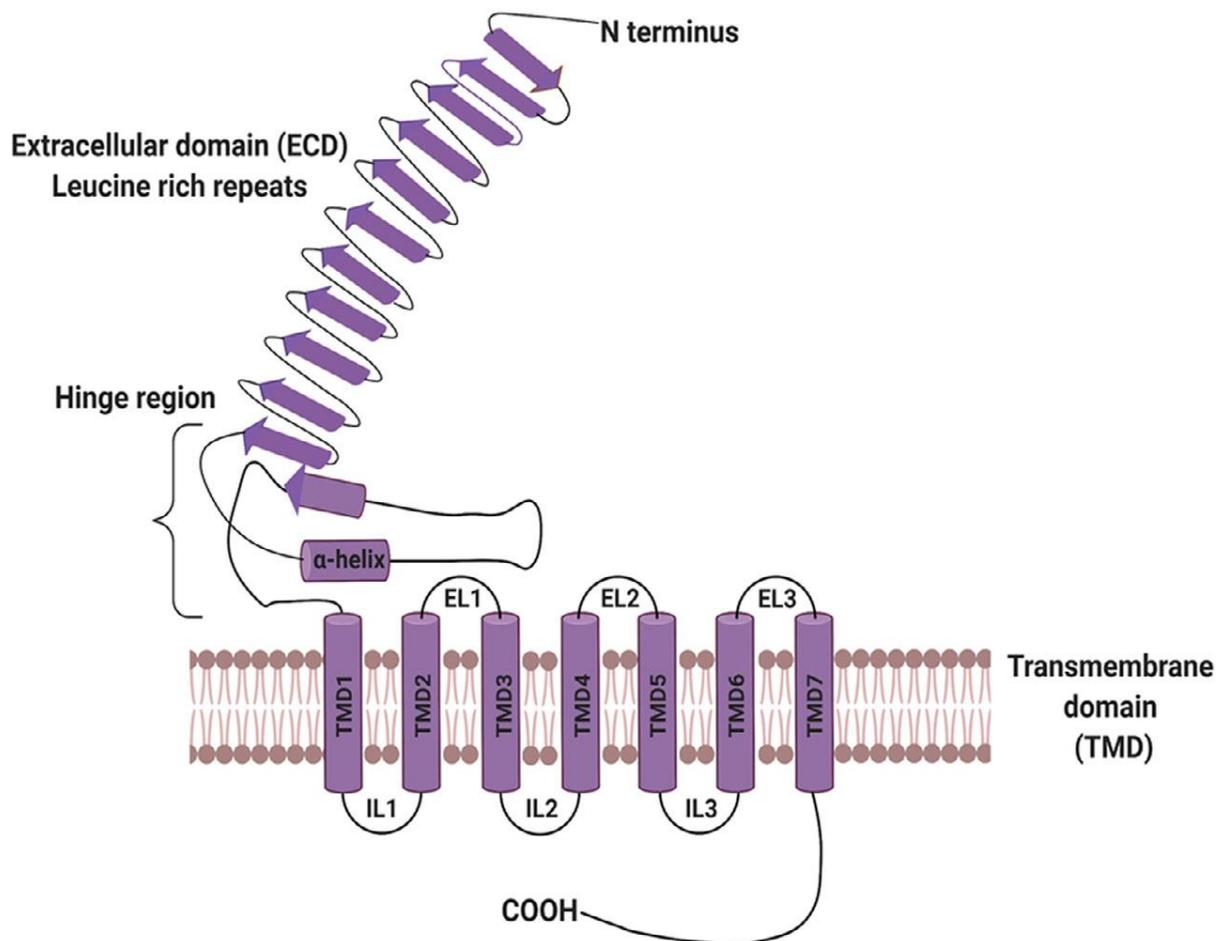
**Figure 7 : Représentation schématique du follicule de De Graaf.**

Dernier stade de la folliculogenèse, le follicule de De Graaf mesure environ 2 cm avant l'ovulation et contient un ovocyte ayant atteint sa taille maximale soit environ 120  $\mu\text{m}$  chez la femme. Il est composé d'une cavité centrale appelée antrum et est entouré par plusieurs types de cellules somatiques. Les cellules de la granulosa, différenciées en cellules murales et en cellules du cumulus, expriment LHR et FSHR et sécrètent l'estradiol et la progestérone. Les cellules de la thèque expriment LHR et sécrètent des androgènes qui stimulent l'expression de LHR et FSHR par les cellules de la granulosa (Conti & Chang, 2016; Erickson, 2009).

La FSH est l'élément majeur du développement des follicules antraux puisqu'elle permet la prolifération des cellules de la granulosa et est nécessaire à la survie des follicules. Elle permet, de plus, l'expression des récepteurs à la LH par les cellules de la thèque, rendant le follicule sensible à l'hormone nécessaire à l'ovulation. Enfin, la FSH stimule la production d'estradiol par les cellules de la granulosa (Conti & Chang, 2016; Sanchez & Smitz, 2012).

La LH et la FSH, tout comme la TSH et l'hCG, sont des glycoprotéines hétérodimériques formées d'une sous-unité alpha commune et d'une sous-unité bêta spécifique. Leur ressemblance est liée

au fait que les gènes codant pour ces protéines sont issus d'un gène ancestral commun. Les récepteurs de ces hormones sont des récepteurs couplés aux protéines G, caractérisés par un domaine transmembranaire « rhodospine-like » composé de sept hélices alpha en C-ter, et un domaine extracellulaire riche en leucines en région N-ter (Figure 8). Avec 70 % d'homologie, le domaine transmembranaire est fortement conservé entre les différents récepteurs. La région extracellulaire, moins conservée (40 % d'homologie), est responsable de la reconnaissance et de la fixation des hormones, elle fait donc la spécificité de chaque récepteur (Smits et al., 2003).

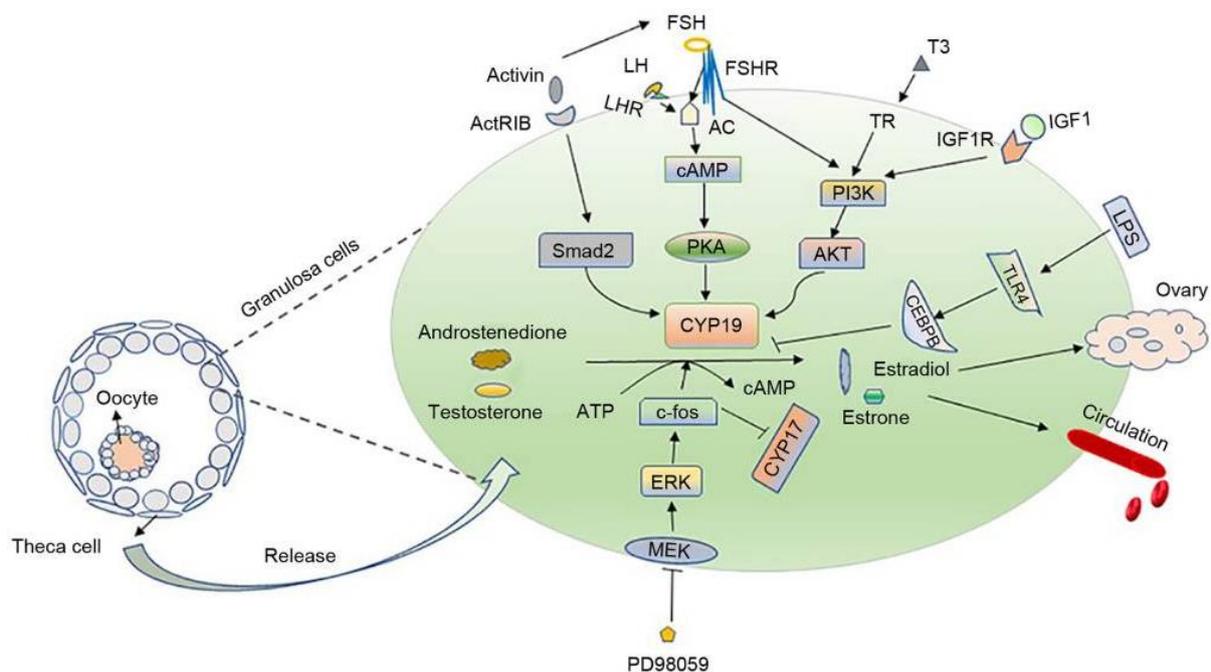


**Figure 8: Représentation schématique de la structure du récepteur à la FSH (FSHR).**

La région C-terminale de FSHR est composée d'un domaine transmembranaire contenant sept hélices alpha. En région N-terminale se trouve un domaine extracellulaire riche en leucines, capable de lier le ligand FSH avec une forte spécificité et une forte affinité. Ces deux régions sont reliées entre elles par une région charnière. D'après (Banerjee, Joseph, & Mahale, 2021).

D'abord synthétisé sous forme immature, FSHR subit plusieurs types de modifications post-traductionnelles. Après avoir été glycosylé en région N-ter et palmitoylé en région C-ter, le récepteur peut se replier au niveau du réticulum endoplasmique pour former sa structure 3D. Il est ensuite transféré à la surface des cellules de la granulosa via l'appareil de Golgi et devient fonctionnel. La fixation de la FSH sur le domaine extracellulaire de son récepteur permet de stimuler plusieurs voies de signalisation dont la voie AC/AMPC/PKA. Brièvement, la fixation de la

FSH sur son récepteur active l'Adénylate Cyclase (AC), ce qui entraîne une augmentation de la concentration en AMPc qui active la PKA (Protéine Kinase A). Cette protéine kinase va ensuite phosphoryler et activer CREB (cAMP-Response Element-Binding protein), un facteur de transcription permettant l'expression de CYP19A1 (Cytochrome P450 Aromatase) et la production d'aromatase (T. Liu, Huang, & Lin, 2021; Rimon-Dahari, Yerushalmi-Heinemann, Alyagor, & Dekel, 2016). L'aromatase permet alors de produire de l'estradiol à partir de la testostérone fournie par les cellules de la thèque (Devesa & Caicedo, 2019) (Figure 9). Chez la souris, l'absence de la FSH ou du récepteur à la FSH entraîne un blocage de la folliculogénèse avant la formation de l'antrum (Burns, Yan, Kumar, & Matzuk, 2001; Dierich et al., 1998).

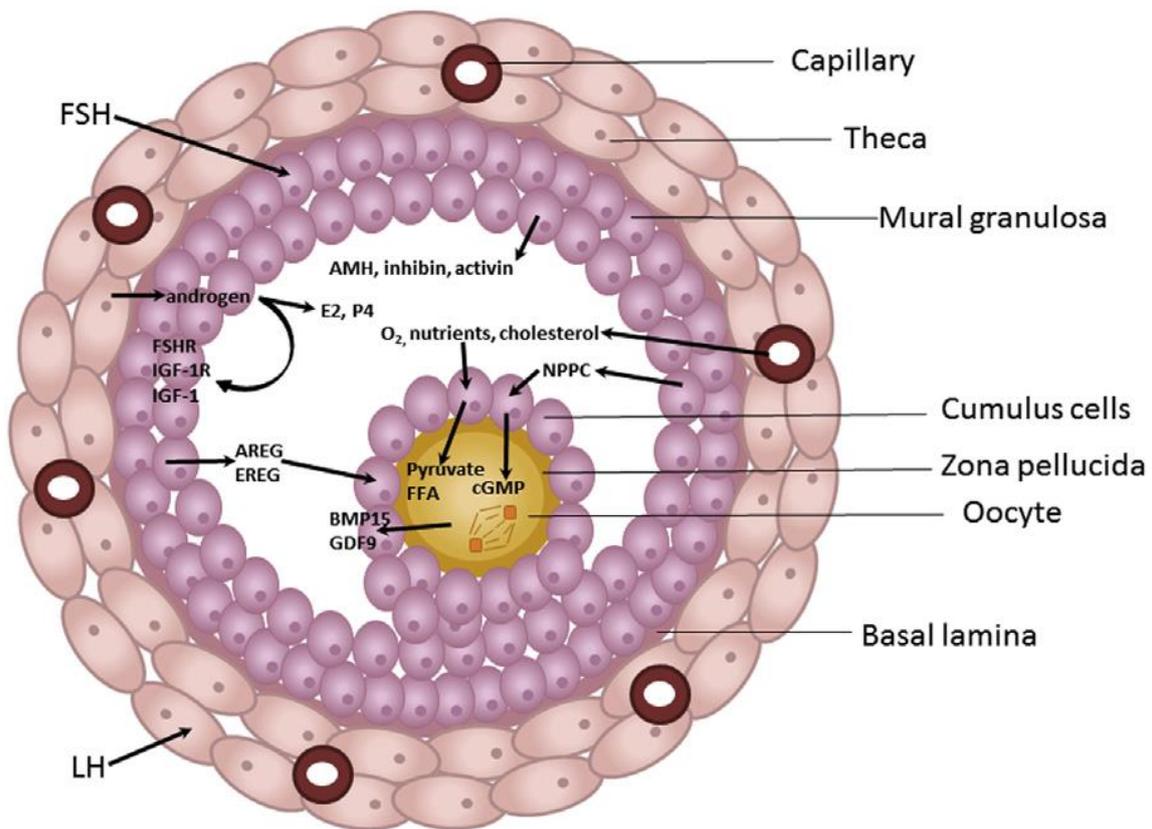


**Figure 9 : Voies de signalisation impliquées dans la formation d'estradiol par les cellules de la granulosa.**

Au sein du follicule existe une étroite communication impliquant l'ovocyte, les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque. Les cellules de la thèque produisent de l'androstènedione, une hormone stéroïdienne de la famille des androgènes et précurseur de la testostérone. En se fixant sur leurs récepteurs respectifs à la surface des cellules de la granulosa, la LH et la FSH activent la voie de signalisation AC/AMPC/PKA, l'IGF1 active la voie de signalisation PI3K/AKT et l'activine active la voie de signalisation Smad2. Ces voies de signalisation participent à la formation d'aromatase permettant la formation d'estradiol à partir de testostérone. D'après (T. Liu et al., 2021).

En plus de la FSH, plusieurs membres de la famille des TGF- $\beta$  régulent la formation des follicules antraux (Knight & Glistler, 2006). GDF9 et BMP15, sécrétées par les ovocytes, et l'activine, sécrétée par les cellules de la granulosa, déjà acteurs du développement des follicules secondaires, conservent leur rôle dans la régulation de la prolifération des cellules de la granulosa. L'activine régule aussi l'expression des récepteurs à la FSH, favorise le développement du follicule dominant et réprime le développement des autres follicules en croissance. A l'inverse, l'inhibine, également produite par les cellules de la granulosa, réprime la sécrétion de FSH et la prolifération

des cellules folliculaires (Deffieux & Antoine, 2003). En plus de leur action autocrine sur les cellules de la granulosa, l'activine et l'inhibine régulent de manière paracrine la production d'androgènes par les cellules de la thèque. Ces androgènes participent au maintien du niveau d'estradiol (Sanchez & Smitz, 2012) (Figure 10). La quantité d'activine et d'inhibine varie au cours du développement folliculaire puisque la sécrétion d'activine est supérieure à celle de l'inhibine dans les petits follicules, puis l'inhibine devient prédominante dans les follicules pré-ovulatoires (Yamoto, Minami, & Nakano, 1991).



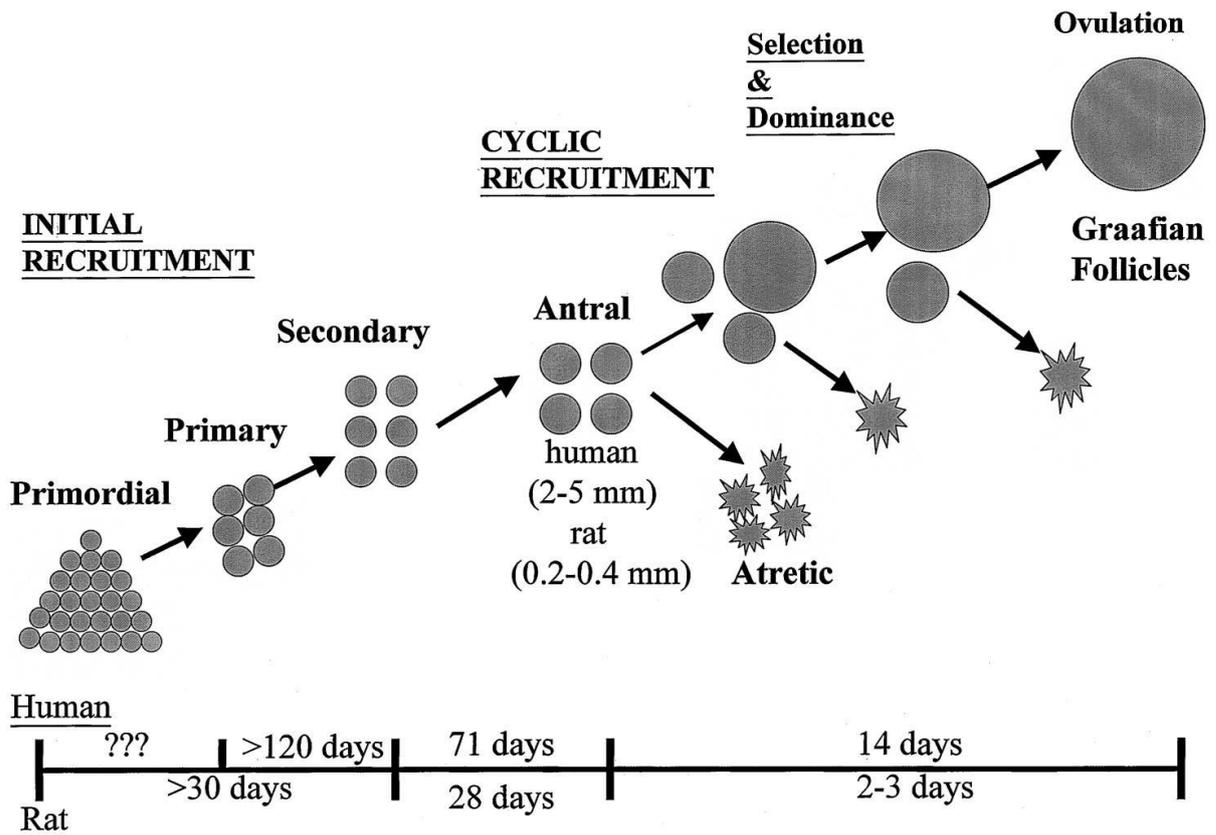
**Figure 10 : Représentation des facteurs sécrétés par l'ovocytes et les cellules somatiques, nécessaires au développement du follicule.**

Dans les follicules antraux, les cellules de la thèque, stimulées par la LH, produisent des androgènes qui serviront à la production d'estradiol par les cellules de la granulosa, elles-mêmes stimulées par la FSH. De plus, l'ovocyte sécrète des facteurs (GDF9, BMP15) qui, par action paracrine, favorisent la prolifération des cellules de la granulosa. Le développement du follicule dépend donc des interactions bidirectionnelles présentes entre l'ovocytes et les cellules somatiques qui l'entourent (Dumesic, Meldrum, Katz-Jaffe, Krisher, & Schoolcraft, 2015).

L'hormone antimüllérienne (AMH) est également un membre de la famille des TGF- $\beta$  et est produite par les cellules de la granulosa. Son dosage est un marqueur de réserve ovarienne (La Marca et al., 2010). La production d'AMH est drastiquement réduite lorsque le diamètre du follicule atteint 8 à 10 mm et cette hormone est connue pour inhiber l'action de la FSH et réduire le recrutement des follicules (Eilso Nielsen, Rasmussen, Fukuda, Westergaard, & Yding Andersen, 2010; Knight & Glister, 2006). À l'inverse, la concentration en inhibine et en estradiol augmente à la fin du développement des follicules antraux (Andersen et al., 2010).

## 7. Sélection du follicule dominant

La sélection du follicule dominant est une étape clé de la fonction reproductrice de la femme puisqu'un dysfonctionnement de ce processus peut causer une absence d'ovulation ou, au contraire, un excès d'ovulation, responsable de grossesses multiples ou d'insuffisance ovarienne précoce. Le phénomène de sélection du follicule dominant commence nécessairement par l'entrée en croissance d'une cohorte de follicules antraux puis l'émergence d'un (ou plusieurs) follicule(s) qui sera(ont) ovulé(s) alors que les autres follicules de la cohorte entrent en atresie.



**Figure 11 : cinétique du recrutement des follicules et de la sélection du follicule dominant chez la femme.**

Au cours du recrutement initial indépendant des gonadotrophines, un groupe de follicules primordiaux entre en croissance et forme les follicules primaires puis secondaires. Chez la femme, plus de 120 jours sont nécessaires à la formation d'un follicule secondaire à partir d'un follicule primaire. La plupart des follicules sélectionnés arrêteront leur développement pour entrer en atresie. A partir de la puberté, l'augmentation du taux de FSH circulante permet à un groupe de follicules antraux d'échapper à l'atresie pour continuer leur développement. Au sein de ce groupe, le follicule le plus sensible à la FSH grossit plus vite et produit de l'inhibine et des estrogènes, stoppant ainsi le développement des autres follicules qui rentrent alors en atresie. Le follicule dominant devient alors un follicule de De Graaf qui pourra être ovulé. La formation du follicule de De Graaf à partir d'un follicule antral nécessite 14 jours chez la femme et 2 à trois jours chez la ratte. Figure d'après (McGee & Hsueh, 2000).

Par opposition au recrutement initial qui permet la croissance des follicules primordiaux, l'entrée en croissance d'une cohorte de follicules antraux est appelée recrutement cyclique car elle se fait par vagues. En 2003, Angela R. Baerwald et son équipe ont montré que plusieurs

cohorte de follicules antraux étaient recrutées au cours d'un même cycle menstruel d'une femme. Ainsi, une vague folliculaire correspond à la croissance synchrone d'un groupe de follicules antraux mesurant entre 2 et 5 mm et est précédée par une augmentation de la FSH. Soixante-huit pour-cent des femmes ont deux vagues folliculaires par cycle, 32 % des femmes en ont trois. Ces vagues folliculaires sont définies comme majeures lorsqu'elles donnent lieu à la sélection d'un follicule dominant mesurant au minimum 2 mm de plus que les autres follicules et ayant un diamètre supérieur à 10 mm. Les vagues folliculaires majeures s'opposent aux vagues folliculaires mineures à l'issue desquelles aucun follicule dominant n'est sélectionné. À l'inverse des vagues folliculaires mineures qui sont systématiquement anovulatoires, les vagues folliculaires majeures peuvent conduire ou non à l'ovulation. Le follicule dominant des vagues folliculaires majeures ovulatoires est toujours plus gros que les follicules des vagues majeures non ovulatoires (Baerwald, Adams, & Pierson, 2003).

L'entrée en croissance d'une cohorte de follicules antraux à lieu à partir de la puberté et est dépendante de l'augmentation de la concentration en FSH. Les follicules en croissance sécrètent alors des facteurs inhibant l'action de la FSH et notamment de l'œstradiol et de l'inhibine. Parmi cette cohorte, le follicule le plus sensible à la FSH grossit plus vite que les autres, la prolifération de ses cellules folliculaires est plus importante et il produit plus d'œstrogènes et d'inhibine. Par action paracrine, l'inhibine stimule la production d'androgènes par les cellules de la thèque puis les androgènes stimulent l'expression de LHR et FSHR par les cellules de la granulosa et permettent la production d'œstradiol grâce à l'aromatase. Par un phénomène d'amplification, ce follicule produit davantage d'inhibine et d'œstradiol et augmente sa sensibilité à la LH et à la FSH. L'œstradiol et l'inhibine ainsi produits entraînent une diminution du taux de FSH qui permettrait la survie des autres follicules, ce qui stoppe leur développement. Le follicule dominant a, quant à lui, acquis la capacité de poursuivre son développement malgré la diminution de la FSH (McGee & Hsueh, 2000; Yding Andersen, 2017). L'étape de déviation correspond au moment où le follicule dominant continue de grossir alors que les autres follicules, appelés subordonnés, commencent à dégénérer. Elle s'accompagne d'importants changements qui permettront au follicule dominant de poursuivre son développement et d'acquérir la capacité à ovuler (Garcia-Guerra, Wiltbank, Battista, Kirkpatrick, & Sartori, 2018).

Des études réalisées chez la vache ont montré que la quantité d'ARNm codant pour les récepteurs à la FSH diminue dans les cellules de la granulosa du follicule dominant alors que la quantité d'ARNm codant pour les récepteurs à la LH augmente (Mihm et al., 2006). Cela traduit un changement majeur du follicule dominant qui perd sa dépendance à la FSH et acquiert une importante dépendance à la LH, hormone nécessaire à l'ovulation. De plus, toujours chez la vache, juste avant la déviation, la concentration intra-folliculaire en IGF-I libre diminue dans les follicules subordonnés et reste importante dans le follicule dominant. Le maintien de la concentration en IGF-I à un niveau élevé permet la sécrétion d'œstradiol et d'inhibine par le follicule dominant (Beg & Ginther, 2006), ce paramètre est donc en accord avec l'augmentation de la concentration en œstradiol observée par Wenxiang Luo et son équipe en 2011 (W. Luo, Gumen, Haughian, & Wiltbank, 2011). De plus, la déviation du follicule dominant est associée à une modification de l'expression de certains gènes tels que *CYP19A1* et *PAPPA* (Pregnancy Associated Plasma Protein-A) (W. Luo et al., 2011).

Chez les Mammifères, le nombre d'ovocytes ovulés à chaque cycle est une caractéristique propre à chaque espèce. Certaines espèces (lapins, souris, truies...) dites poly-ovulantes ovulent plusieurs ovules par cycle et donnent naissance à plusieurs individus par portée. A l'inverse, la femme, la vache ou bien la jument sont des espèces mono-ovulantes qui ovulent, en général, un seul ovule par cycle. Cette caractéristique dépend, entre autres, de la concentration en FSH et en estradiol. En effet, les espèces poly-ovulantes ont un taux de FSH plus élevé et un taux d'estradiol plus bas que les espèces mono-ovulantes (Chaffin & Vandevoort, 2013). Cependant, le niveau de FSH et d'estradiol n'est pas le seul paramètre à entrer en jeu. L'étude de races de moutons particulièrement prolifiques a permis de mettre en évidence l'implication de plusieurs gènes dans la régulation du taux ovulatoire. Chez les brebis Booroola, une mutation du gène *BMPR-1B* (Bone Morphogenetic Protein (BMP) type-IB Receptor) est responsable d'une augmentation du nombre d'ovules ovulés par les femelles. Cette augmentation, déjà significative dans le cas d'une mutation à l'état hétérozygote, l'est d'autant plus lorsque la mutation est à l'état homozygote. La présence de la mutation chez les brebis est associée à une sélection plus précoce des follicules antraux entrant en maturation, une modification du taux d'estradiol (McNatty et al., 1986) et à une modification de la cinétique de croissances de ces follicules (Driancourt, Gauld, Terqui, & Webb, 1986). D'autres mutations responsables d'une augmentation du taux ovulatoire ont été identifiées sur les gènes *BPM15* et *GDF9* (Fabre et al., 2006; Garcia-Guerra et al., 2018). De la même façon, des chercheurs néerlandais ont identifié des mutations sur les gènes *FSHB* et *SMAD3* chez des femmes ayant donné naissance à des faux jumeaux. *FSHB* code pour la sous-unité  $\beta$  de la FSH et le variant est associé à une augmentation du taux de FSH et à une diminution du taux de LH (Mbarek et al., 2016). *SMAD3* intervient dans la voie de signalisation de *GDF9* et son absence chez la souris diminue la réponse des follicules à la FSH (Gong & McGee, 2009).

## 8. L'ovulation

L'ovulation correspond à la libération du complexe cumulo-ovocytaire dans une trompe de Fallope chez la femme ou dans un oviducte chez la souris. Ce processus finement régulé est déclenché par une élévation importante et rapide du taux de LH sanguin, induisant l'activation de cascades de signalisation multiples à l'origine de l'expansion du cumulus et de la rupture du follicule permettant l'expulsion de l'ovule.

### 8.a. Le pic de LH

Le pic de LH fait référence à l'élévation rapide du taux de LH sanguin qui intervient environ 38 h avant l'ovulation chez la femme (Fritz et al., 1992) et 12 à 14 h chez la souris (Miller & Takahashi, 2013). Au cours de la sélection du follicule dominant, les follicules subordonnés dégénèrent induisant une diminution de la GnSAF et donc une diminution de l'inhibition de la sécrétion de LH. De plus, l'estradiol sécrété en grande quantité par les cellules de la granulosa du follicule dominant induit une augmentation de la sensibilité de l'hypophyse pour la GnRH qui produit alors une grande quantité de LH (Laws, Webster, & Miller, 1990; Messinis et al., 2014). Le pic de LH est d'ailleurs précédé d'un pic d'estradiol (**Figure 1**).

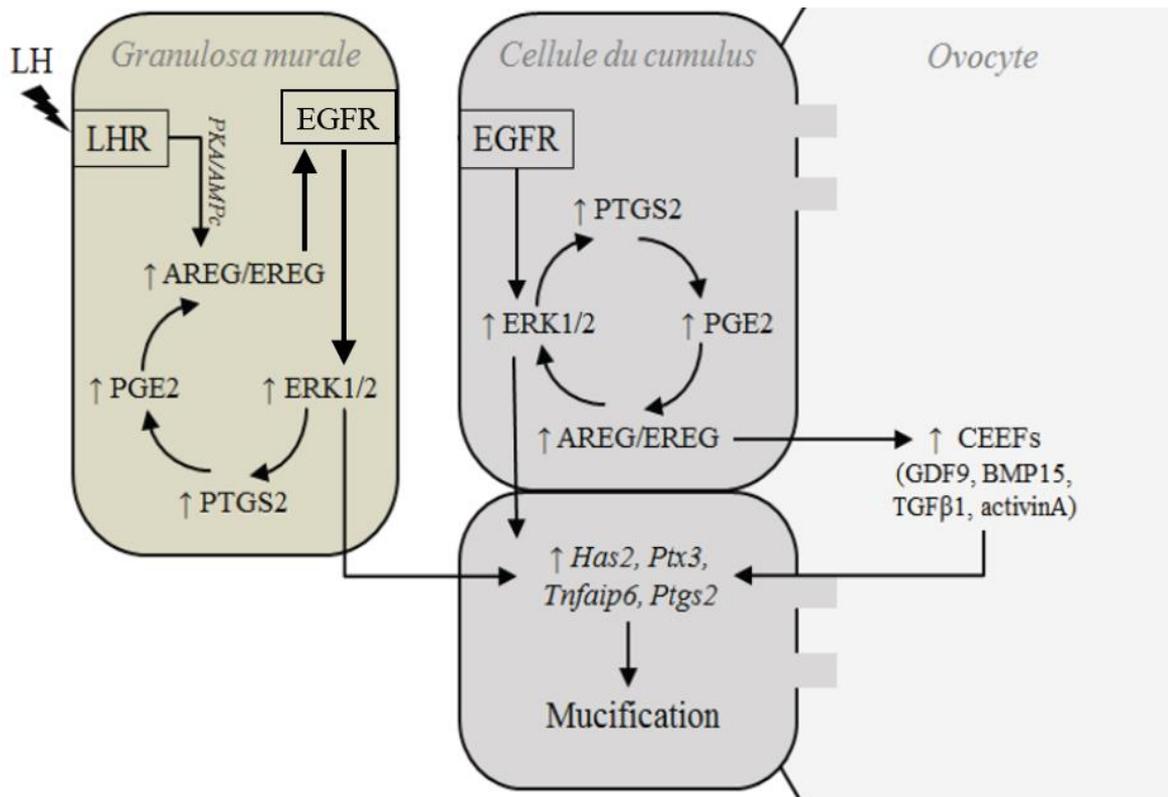
### 8.b. La progestérone

La progestérone est une hormone stéroïdienne nécessaire à l'ovulation et à la préparation de l'endomètre pour l'accueil de l'embryon. Chez la souris, l'absence de récepteur à la progestérone (PGR) induit une profonde altération du système reproducteur des femelles. En effet, malgré un développement folliculaire normal et l'induction de l'expansion du cumulus en réponse à la LH, l'absence de PGR inhibe l'ovulation, induit une hyperplasie utérine et perturbe le développement des glandes mammaires (Lydon et al., 1995). La sécrétion de progestérone par les cellules de la granulosa commence peu avant le pic de LH (Russell & Robker, 2007). Puis, sous l'action de la LH, les cellules de la granulosa expriment PGR (Natraj & Richards, 1993). Ce récepteur est un facteur de transcription essentiel car il régule l'expression de multiples gènes impliqués dans le processus d'ovulation et notamment des gènes responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire qui entoure le follicule. Chez la souris, l'absence de ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases) dans les cellules murales de la granulosa bloque l'expression de PGR signifiant que l'expression de ce récepteur dépend de la voie de signalisation des MAPK/ERK, elle-même dépendante de la LH (H. Y. Fan et al., 2009; Richards & Ascoli, 2018; Tapia-Pizarro et al., 2017). Cette voie de signalisation est détaillée dans le paragraphe 8.c « *La mucification ou l'expansion du cumulus* ».

### 8.c. La mucification ou l'expansion du cumulus

L'expansion du cumulus, phénomène également appelé mucification, correspond à la sécrétion, par le complexe cumulo-ovocytaire, d'une matrice extra-cellulaire riche en acide hyaluronique. Malgré le fait que les cellules du cumulus n'expriment pas ou peu de récepteurs à la LH (J. Y. Park et al., 2004), ce phénomène est dépendant de cette gonadotrophine (**Figure 12**). Pour cela, la LH interagit avec ses récepteurs à la surface des cellules de la granulosa induit l'expression de facteur de type EGF (Epidermal Growth Factors (EGF)-like) tels que l'épiréguline EREG, l'amphiréguline AREG. Ces facteurs de type EGF interagissent avec leurs récepteurs EGFR présents la fois sur les cellules murales de la granulosa et sur les cellules du cumulus et activent, de manière autocrine et paracrine, la voie de signalisation des ERK1/2. L'activation de cette voie de signalisation induit alors l'expression de gènes essentiels à l'expansion du cumulus : *HAS* (Hyaluronan Synthase) permet la synthèse de l'acide hyaluronique, *TNFAIP6*, *PTX3* et versican permettent l'assemblage et le maintien de la matrice extracellulaire (Rimon-Dahari et al., 2016; Sanchez & Smitz, 2012). La voie de signalisation des ERK1/2 induit également l'expression de *PTGS2* (Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2) permettant la production de prostaglandine E2 par les cellules du cumulus. Par son action autocrine, la prostaglandine E2 induit la production de facteurs de types EGF supplémentaires ce qui amplifie le signal (Ben-Ami et al., 2006; Sanchez & Smitz, 2012).

L'expansion du cumulus dépend aussi de l'action paracrine de CEEF (Cumulus-Expansion-Enabling Factor) sécrété par l'ovocyte. Ces facteurs dont BMP15 et GDF9 font partis, induisent également l'expression *HAS*, *TNFAIP6*, *PTX3* et *PTGS2*, ce qui apporte une voie d'amplification supplémentaire (Gilchrist et al., 2008; Sanchez & Smitz, 2012).



**Figure 12 : Voies de signalisation à l'origine de l'expansion du cumulus.**

En se fixant sur ses récepteurs à la surface des cellules de la granulosa, la LH active une cascade de réactions impliquant AMPc/PKA et permettant l'expression de facteurs de types EGF, dont AREG et EREG. Ces facteurs interagissent avec leurs récepteurs présents à la fois sur les cellules murales de la granulosa et sur les cellules du cumulus et induisent, par l'intermédiaire de ERK1/2, l'expression de facteurs favorables à la mucification (*HAS*, *PTX3*, *TNFAIP6*). Cette voie de signalisation permet également l'expression de PTGS2 et donc la production de prostaglandine E2 qui, en régulant AREG et EREG, induit une amplification du signal. L'expansion du cumulus est de plus régulée par action paracrine des facteurs ovocytaires CEEF qui permettent, eux aussi, l'expression de *HAS*, *PTX3* et *TNFAIP6*. Figure modifiée à partir de (Guillaume Martinez, 2016).

#### 8.d. La rupture du follicule

La libération du complexe cumulo-ovocytaire requiert une réorganisation structurale majeure du follicule et du tissu ovarien qui l'entoure puisqu'elle nécessite la rupture de la lame basale entre les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque et la formation d'un trou appelé macula pellucida à la surface de l'ovaire. Ce processus est régulé par une variété d'acteurs, certains étant eux-mêmes régulés par PGR dont l'absence chez la souris inhibe la formation de la macula pellucida (Lydon et al., 1995).

La formation de la macula pellucida est liée à la dégradation de la matrice extracellulaire qui s'amincit et se fissure. Cette dégradation est permise par une combinaison d'apoptose cellulaire et d'action protéolytique par les protéases ADAMTS-1 et la cathepsine L (codée par le gène *CTSL*) (Russell & Robker, 2007). Dans les petits follicules, *CTSL* est faiblement exprimé par les cellules de la granulosa et de façon dépendante de la FSH, mais indépendamment de la LH et de la

progestérone. En revanche, lors de l'ovulation, l'expression de *CTSL*, tout comme celle de *ADAMTS-1*, est fortement augmentée, et ce, de manière dépendante de la LH et du récepteur à la progestérone (Robker et al., 2000). PGR induit également l'expression l'endothelin-2 (*EDN2*) qui génère des contractions de myofibroblastes, action mécanique favorable à l'expulsion du follicule (C. J. Ko, Cho, Ham, Cacioppo, & Park, 2022).

La membrane basale entre les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque est principalement composée de laminine, de collagène de type IV, de fibronectine et de protéoglycanes. La dégradation de cette membrane basale dépend de l'action de protéases telles que les gélatinases MMP-2 et MMP-9 qui appartiennent à la famille des métalloprotéinases matricielles et dont l'expression est indépendante de la progestérone. Les protéases *ADAMTS-1* et la cathepsine L sont exprimées via l'action de PGR et participent également à la dégradation de la membrane basale (Robker et al., 2000; Russell & Robker, 2007).

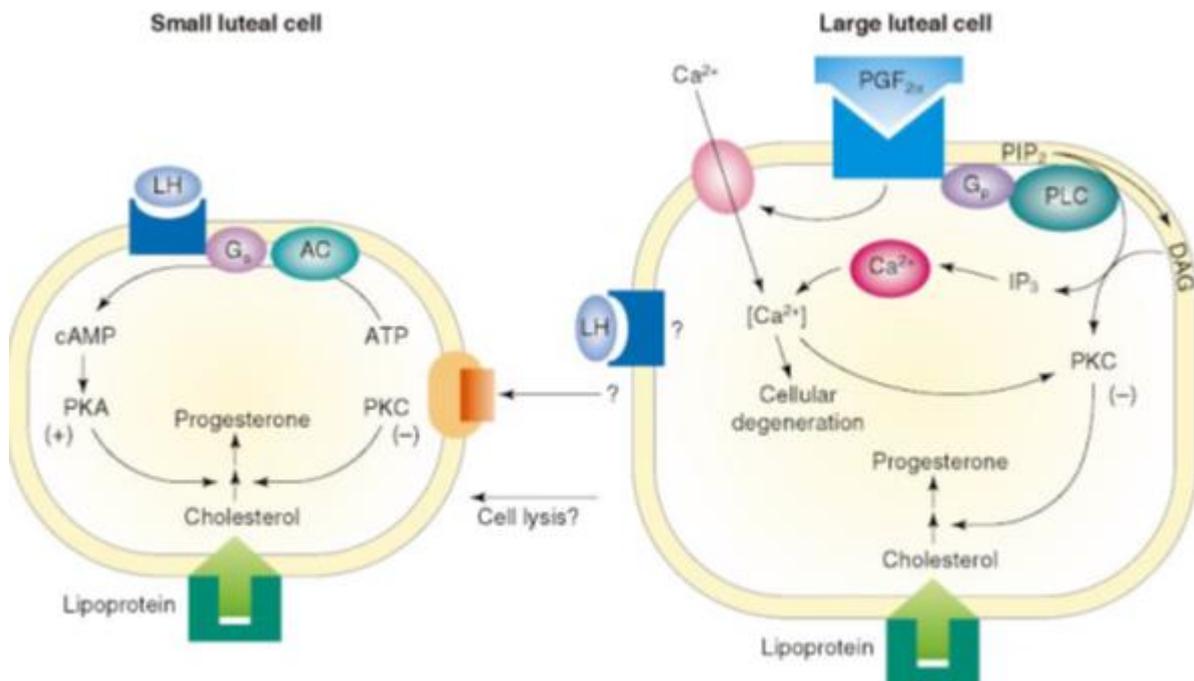
Enfin, certaines cellules du système immunitaire contribuent à la rupture du follicule, et notamment les macrophages et les neutrophiles, recrutés en nombre suite au pic de LH. En sécrétant des protéases dont MMP-8, les neutrophiles participent à la dégradation de la matrice extracellulaire. De plus, des leucocytes et des Facteurs d'Activation Plaquettaire (PAF) induisent une réaction inflammatoire qui favorise la dégradation des tissus (Russell & Robker, 2007).

## 9. La formation du corps jaune

Le corps jaune est une structure très vascularisée qui se forme à partir du reste du follicule après l'ovulation, au cours d'un processus nommé lutéinisation. Il est composé de plusieurs types cellulaires dont les petites cellules lutéales originaires des cellules de la thèque et les grandes cellules lutéales issues des cellules de la granulosa. Le corps jaune contient aussi des péricytes, des cellules endothéliales, des fibroblastes ou des cellules immunitaires. Au cours de la lutéinisation, la membrane basale, qui séparait les cellules de la thèque des cellules de la granulosa, disparaît et permet la pénétration des vaisseaux sanguins à l'intérieur du corps jaune. Ces vaisseaux sanguins sont formés grâce à la sécrétion, par les cellules endothéliales, de facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF, FGF ou ANG-1 (Mlyczynska et al., 2022). La principale fonction du corps jaune étant de produire la progestérone nécessaire à l'implantation de l'embryon et au maintien de la gestation, ces vaisseaux sanguins sont nécessaires pour assurer l'apport de nutriments et de cholestérol vers le corps jaune puis l'export de la progestérone vers les tissus cibles, dont l'utérus et les glandes mammaires (Rimon-Dahari et al., 2016). La production de progestérone dépend de la protéine STAR (STERoidogenic Acute Regulatory protein) qui permet le transport du cholestérol vers la membrane interne des mitochondries. Puis, P450SCC, situé dans la membrane interne des mitochondries, catalyse la conversion du cholestérol en prégnénolone qui diffuse alors vers le réticulum endoplasmique où elle est convertie en progestérone par la 3 $\beta$ -HSD (Diaz et al., 2002).

La production de la progestérone par les petites et les grandes cellules lutéales est complexe car en plus d'être espèce-dépendante, elle est régulée par différents mécanismes selon le type cellulaires. Les grandes cellules lutéales sont responsables de la sécrétion de progestérone de

manière constitutive et les petites cellules lutéales sécrètent la progestérone de manière dite aigue, c'est-à-dire en réponse à un stimuli, notamment la LH (Niswender, 2002). Le transport du cholestérol par STAR est l'étape critique de la production aigue de progestérone et l'expression STAR est régulée par plusieurs voies de signalisation. L'un des modes de régulation de cette protéine repose sur son état de phosphorylation : la phosphorylation des résidus Ser194/195 par la PKA stimule l'activité de STAR, en revanche, la phosphorylation de STAR par la protéine par PKC diminue le transport du cholestérol et donc la production de progestérone (Arakane et al., 1997; Wiltbank, Belfiore, & Niswender, 1993). Dans un modèle simplifié représenté sur la Figure 13, la fixation de la LH sur les récepteurs LHR à la surface des petites cellules lutéales active la voie de signalisation AMPc/PKA induisant l'activation de STAR et la production de progestérone. La fixation de la prostaglandine F<sub>2α</sub> sur les récepteurs à la surface des grandes cellules lutéales active la voie de signalisation PIP<sub>2</sub>/DAG/PKC et inhibe la production de progestérone (Niswender, 2002). Ainsi, la LH est une hormone lutéotrophique qui favorise le maintien du corps jaune, la prostaglandine F<sub>2α</sub> est une hormone lutéolytique qui favorise la lutéolyse. Une autre action de la prostaglandine F<sub>2α</sub> consiste à activer la phospholipase C (PLC) induisant alors une augmentation de la concentration en calcium. En plus d'amplifier l'activation de PKC, le calcium active des endonucléases et induit la formation de monoxyde d'azote provoquant la mort cellulaire (Niswender et al., 2007).



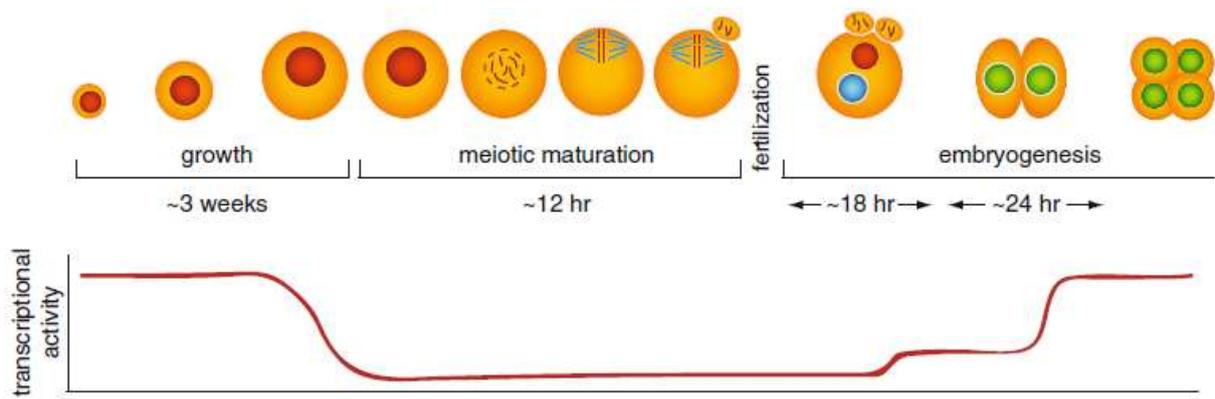
**Figure 13 : Voies de signalisation permettant de réguler la production de progestérone par le corps jaune.**

Dans les petites cellules lutéales, la fixation de la LH sur son récepteur induit l'activation de PKA ce qui stimule l'activation de STAR et donc la production de progestérone. Dans les grandes cellules lutéales, l'activation du récepteur de la prostaglandine F<sub>2α</sub> induit la formation de PKC qui, en inhibant STAR, inhibe la production de progestérone. De plus, la prostaglandine F<sub>2α</sub> participe à l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire ce qui, d'une part, contribue à stimuler PKC et d'autre part, active des processus responsables de la dégénération cellulaire. Ainsi, la prostaglandine F<sub>2α</sub> participe à la lutéolyse. Figure d'après (Niswender, 2002).

En absence d'implantation embryonnaire, l'utérus produit de la prostaglandine F2 $\alpha$  qui inhibe la production de progestérone et déclenche les contractions utérines nécessaires à l'induction des menstruations. En cas de gestation, l'HCG produit par les cellules du trophoblaste avant même l'implantation de l'embryon, active les LHR et entretient la production de progestérone (Gridelet et al., 2020). La progestérone permet alors la préservation du corps jaune et l'inhibition des contractions utérines (Putnam, Brann, Kolbeck, & Mahesh, 1991), assurant ainsi le maintien de la gestation.

## II. L'ovogenèse

L'ovogenèse est le processus biologique permettant la formation d'un ovule pouvant être fécondé et former un embryon. Elle comprend deux phases : une phase de croissance ovocytaire au cours de laquelle l'ovocyte est bloqué au stade diplotène de la prophase I et une phase de maturation méiotique. Comme son nom l'indique, la phase de croissance s'accompagne d'une forte augmentation de la taille de l'ovocyte. Chez la femme, le diamètre de l'ovocyte atteint 120  $\mu\text{m}$  au moment de l'ovulation alors qu'il ne mesurait que 35  $\mu\text{m}$  dans le follicule primordial. L'intensité de l'activité transcriptionnelle (qui coïncide avec la prolifération active des cellules folliculaires) permet une production importante d'ARNm pouvant être traduits en protéines nécessaires à la maturation de l'ovocyte et au développement du futur embryon. A sa maturité, l'ovocyte contient environ 200 fois plus d'ARN qu'une cellule somatique (Sternlicht & Schultz, 1981; Wassarman & Kinloch, 1992). A la fin de la croissance ovocytaire, lorsque le follicule est au stade antral, l'ovocyte rentre en maturation méiotique, étape caractérisée par la rupture de la vésicule germinale (GVBD) et l'arrêt de la transcription. A l'ovulation, l'ovule est bloqué en métaphase de seconde méiose et achèvera sa méiose après avoir été fécondé (**Figure 14**).



**Figure 14 : Intensité de l'activité transcriptionnelle au cours de l'ovogenèse chez la souris.**

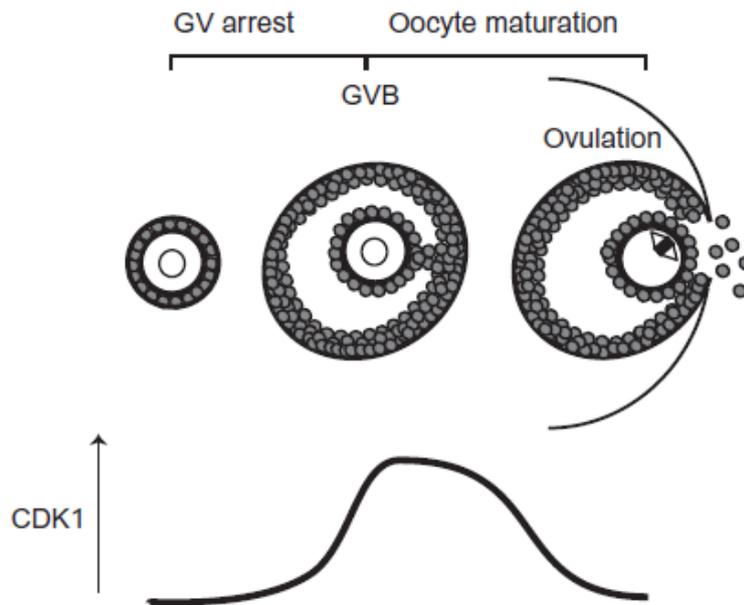
D'une durée de 3 semaines chez la souris (et environ 10 semaines chez la femme), la croissance ovocytaire est caractérisée par une forte augmentation du diamètre de l'ovocyte et une activité transcriptionnelle intense. Au moment de la maturation méiotique, l'ovocyte qui était jusqu'alors bloqué au stade diplotène de prophase I, reprend sa méiose. Cette étape, qui dure environ 12 h chez la souris et 10 jours chez la femme, est caractérisée par la rupture de la vésicule germinale et l'arrêt de la transcription. L'extrusion du 1<sup>er</sup> globule polaire signe l'achèvement de la première division méiotique, l'ovocyte est alors bloqué en métaphase II et terminera sa seconde division méiotique après avoir été fécondé. L'activité transcriptionnelle reprend à partir du stade 2-cellules chez la souris, c'est l'activation du génome embryonnaire (EGA). Figure d'après (Clarke, 2012).

## 1. Régulation de l'arrêt et de la reprise de la méiose

### 1.a. Le complexe CDK1/Cycline B1

La régulation de l'activité méiotique dans les ovocytes est principalement médiée par le MPF (Maturation Promoting Factor), un hétérodimère composé d'une sous-unité catalytique (CDK1 (Cyclin-Dependent Kinase), également connue sous le nom de CDC2) et d'une sous-unité régulatrice (Cycline B1). CDK1 est une protéine kinase essentielle au développement des embryons qui régule l'avancement du cycle cellulaire en mitose. De façon intéressante, les cellules déficientes en CDKs nécessaires à l'interphase (CDK2, CDK3, CDK4 et CDK6) parviennent tout de même à se diviser car CDK1 est capable de prendre le relais (Santamaria et al., 2007).

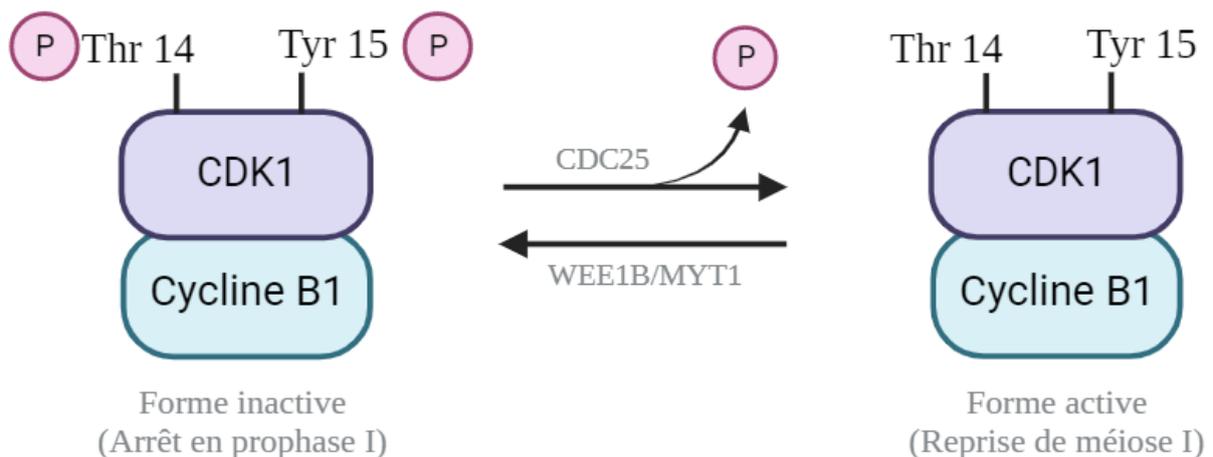
Au moment de la maturation méiotique et sous l'action de la LH, l'activité de ce complexe, jusqu'alors faible, augmente rapidement et transitoirement. Cette augmentation d'activité du MPF permet la reprise de la méiose, la condensation de la chromatine et la rupture de la membrane nucléaire. Au moment du pic de LH, tous les ovocytes contenus dans les ovaires ne mûrent pas. La compétence méiotique, c'est-à-dire la capacité d'un ovocyte à reprendre la méiose dépend de la quantité de l'hétérodimère CDK1/Cycline B1. Sachant que la Cycline B1 est en excès par rapport à CDK1, l'activité du MPF dépend principalement de la quantité de CDK1 (**Figure 15**). Ainsi, les ovocytes contenus dans les petits follicules ne contiennent pas assez de CDK1 et sont incapables de faire la GVBD (Holt, Lane, & Jones, 2013; Jones, 2004).



**Figure 15 : Augmentation de CDK1, un prérequis à la maturation ovocytaire.**

Dans les petits follicules, les ovocytes arrêtés en prophase I ont un taux de CDK1 faible. Dans les ovocytes des follicules antraux, le pic de LH est suivi d'un pic de CDK1 nécessaire à la reprise de la méiose. L'augmentation de CDK1 doit être transitoire car la sortie de la méiose I nécessite un taux de CDK1 faible. Figure d'après (Holt et al., 2013).

L'état de phosphorylation du complexe CDK1/Cycline B1 est un élément majeur de sa régulation. Dans les ovocytes arrêtés en prophase I, le MPF est maintenu inactif par la phosphorylation des résidus thréonine 14 et tyrosine 15 de CDK1 via les protéines kinases WEE1B (également appelée WEE2) et MYT1. A l'inverse, la phosphatase CDC25 a la capacité d'activer le complexe en déphosphorylant CDK1 sur les mêmes sites (Figure 16) (Holt et al., 2013; Jones, 2004).



**Figure 16 : Régulation de l'état d'activation du complexe CDK1/Cycline B1 par phosphorylation.**

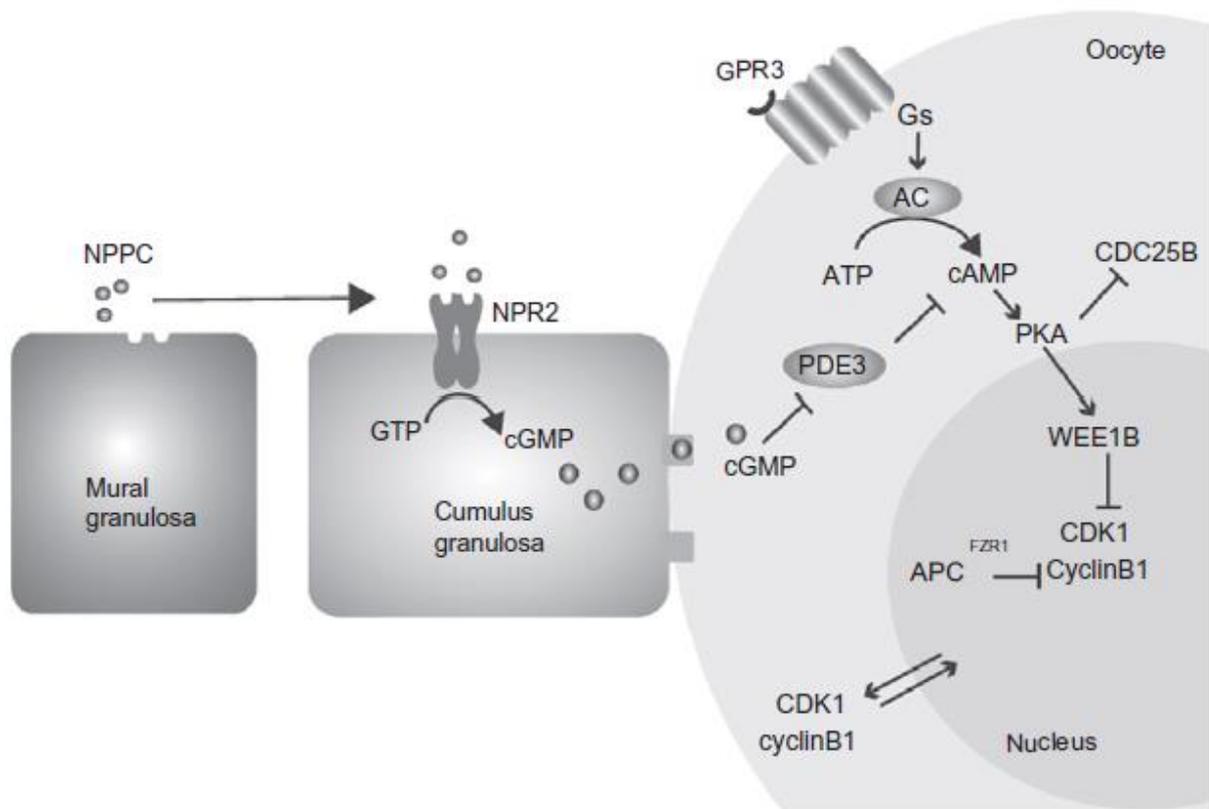
La phosphorylation des résidus thréonine 14 et tyrosine 15 de CDK1 par les protéines kinases WEE1B et MYT1 inactive le MPF, maintenant l'arrêt méiotique en prophase I. Sous l'action de la phosphatase CDC25, le MPF est déphosphorylé et activé, permettant ainsi la reprise de la méiose. Figure inspirée de (Guillaume Martinez, 2016).

### *1.b. Régulation de la quantité de Cycline B1*

Le fonctionnement du MPF est également régulé par la quantité de l'hétérodimère CDK1-Cycline B1 puisque la synthèse de Cycline B1 et son interaction avec CDK1 est nécessaire au fonctionnement du complexe protéique. Lors de l'arrêt méiotique, la quantité de Cycline B1 est contrôlée par un système de dégradation dépendant du protéasome. L'APC/C (Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome) est une ubiquitine ligase E3 responsable de la poly ubiquitination de la Cycline B1 qui sera alors dégradée par le protéasome 26. L'activation de APC/C dépend de son état de phosphorylation et de son association avec des protéines activatrices telles que FZR1 (Fizzy-Related protein homolog, également appelé CDH1) ou CDC20. L'activité de FZR1 est positivement régulée par la phosphatase CDC14B (Cell Division Cycle 14B) et est inhibée par EMI (Early Mitotic Inhibitor) (Holt et al., 2013; Marangos, Verschuren, Chen, Jackson, & Carroll, 2007; Schindler & Schultz, 2009). En absence de FZR1 chez la souris, la Cycline B1 s'accumule dans les ovocytes, entraînant une reprise méiotique précoce (Holt et al., 2011).

### *1.c. Rôle de l'AMPc dans le contrôle de l'arrêt méiotique*

Comme indiqué précédemment, le contrôle de l'arrêt méiotique dépend de l'état de phosphorylation du MPF qui résulte d'un équilibre entre les protéines kinases WEE1B et MYT1 et les phosphatases CDC25. De même, l'activité de WEE1B et de CDC25 dépend de leur état de phosphorylation : la phosphorylation de WEE1B au niveau de la sérine 15 active WEE1B, la phosphorylation de CDC25 au niveau de la sérine 321 inactive CDC25 qui est alors séquestrée dans le cytoplasme. L'AMPc est un important régulateur de la maturation ovocytaire puisqu'elle permet d'activer PKA nécessaire à la phosphorylation de WEE1B et CDC25. Ainsi, lorsque la quantité d'AMPc dans l'ovocyte est élevée, WEE1B est actif et CDC25B est inactif. CDK1 est alors phosphorylée et l'ovocyte est maintenu en arrêt méiotique. La production d'AMPc se fait par l'intermédiaire des récepteurs couplés aux protéines G et notamment GPR3 et GPR12. Constitutivement actifs, ces récepteurs permettent l'activation de protéines Gs qui stimulent la production d'AMPc par l'AC (Adénylate Cyclase). La quantité d'AMPc dans l'ovocyte est négativement régulée par la phosphodiesterase PDE3 qui inactive l'AMPc en hydrolysant les liaisons phosphodiesteres (Holt et al., 2013). De plus, les cellules de la granulosa participent de façon indirecte à augmenter la quantité d'AMPc. Les cellules murales de la granulosa produisent NPPC (Natriuretic Peptide Precursor type C) qui, en interagissant avec son récepteur NPR2 (Natriuretic Peptide Receptor 2) permet la production de GMPc (Guanosine Monophosphate Cyclique) par les cellules du cumulus. Avant le pic de LH, le GMPc est transféré vers l'ovocyte via les jonctions communicantes et inhibe l'activité de PDE3 (Norris et al., 2009; M. Zhang, Su, Sugiura, Xia, & Eppig, 2010), (Figure 17). En maintenant l'expression de NPR2 dans les cellules du cumulus, l'estradiol et les facteurs ovocytaires GDF9 et participent au maintien de l'arrêt méiotique (Wigglesworth et al., 2013; M. Zhang et al., 2011).



**Figure 17 : Régulation des voies de signalisation impliquées dans le maintien de l'arrêt méiotique.**

A la surface de l'ovocyte, des récepteurs couplés aux protéines Gs stimulent la production d'AMPc par l'adénylate cyclase. En activant PKA, l'AMPc inhibe la phosphatase CDC25 et active la kinase WEE1B. Le complexe CDK1/Cycline B1, formant le MPF, est alors phosphorylé et ne permet pas la reprise de la méiose. Le taux d'AMPc ovocytaire est également régulé par le GMPc produit par les cellules de la granulosa suite à l'activation de NPR2 via son ligand NPPC. Transféré vers l'ovocyte via les jonctions communicantes, le GMPc inhibe la dégradation de l'AMPc et participe ainsi, de manière indirecte, au maintien de l'arrêt méiotique. L'action du MPF dépend aussi de APC-FZR1 qui cible la Cycline B1 en vue de sa dégradation par le protéasome. Figure d'après (Holt et al., 2013).

#### 1.d. La reprise de la méiose I

La reprise de la méiose, stimulée par la chute de l'AMPc comprend différents niveaux de régulation, tant à l'échelle de l'ovocyte qu'à l'échelle des cellules folliculaires. La LH, dont la quantité augmente fortement avant l'ovulation, contrôle la chute de GMPc via plusieurs procédés : elle inhibe l'activité de NPR2 (Robinson et al., 2012), elle diminue la quantité de NPPC et elle active les phosphodiésterases PDE1 et PDE5 qui hydrolysent GMPc dans les cellules de la granulosa (Das & Arur, 2022). La LH permet aussi l'expression de facteurs de croissance de type EGF qui inhibent la production de GMPc. De plus, la LH inhibe la traduction de Cx43 ce qui induit la fermeture des jonctions communicantes entre les cellules du cumulus et l'ovocyte et empêche la diffusion du GMPc (Sen & Caiazza, 2013a). Ensemble, ces mécanismes participent à la diminution de GMPc dans l'ovocyte levant ainsi l'inhibition de PDE3. La diminution de l'AMPc entraîne alors une diminution de l'activité de PKA, une activation de CDC25 et une inhibition de WEE1B/Myt. En conséquence, le complexe CDK1/Cycline B1 devient non phosphorylé et s'active.

Parallèlement à cela, d'autres facteurs favorisent la reprise méiotique. C'est le cas des protéines sérines/thréonines kinases ERK qui appartiennent à la famille des MAPK. Leur activation, en forte augmentation à partir de la GVBD est dépendante de MEK, elle-même activée par c-mos ou par la voie de signalisation impliquant EGFR. Dans les ovocytes, ERK limite la dégradation de la Cycline B1 en diminuant l'activité de APC/C. Dans les cellules folliculaires, ERK participe à la fermeture des jonctions communicantes en stimulant la phosphorylation de Cx43 et Cx37. Aussi, l'activation de la protéine kinase régulatrice du cycle cellulaire PLK1 (Polo-Like Kinase 1) inhibe EMI permettant alors l'activation de APC/C et la dégradation de la Cycline B1 (Das & Arur, 2022).

### *1.e. L'arrêt en métaphase II*

L'activation du MPF dans les ovocytes permet la reprise de la méiose et l'achèvement de la première division de méiose. Contrairement aux cellules somatiques, cette étape n'est pas suivie d'une réplication de l'ADN et l'ovocyte entre directement en méiose II puis reste bloqué en métaphase jusqu'à la fécondation. Ces étapes sont caractérisées par une activité oscillatoire du MPF : élevée après la GVBD, l'activité du MPF diminue à la fin de la 1<sup>ère</sup> méiose et augmente à nouveau lors de l'arrêt en métaphase II. Bien que les voies de signalisations responsables de ce nouvel arrêt méiotique ne soient pas entièrement comprises, l'implication du facteur cytotatique CSF est acceptée. Ce facteur n'est pas décrit comme étant une protéine, mais plutôt une activité responsable de l'inhibition de APC/C via la voie de signalisation c-mos/MEK/MAPK/P90rsk et EMI. L'inhibition du complexe APC/C par EMI protège la Cycline B1 contre la dégradation, ce qui maintient l'activité du MPF élevée. Les chromosomes sont alors condensés et le fuseau est stabilisé (Jones, 2005; Machaty et al., 2017; Sen & Caiazza, 2013b; Tripathi, Kumar, & Chaube, 2010).

## 2. La maturation nucléaire

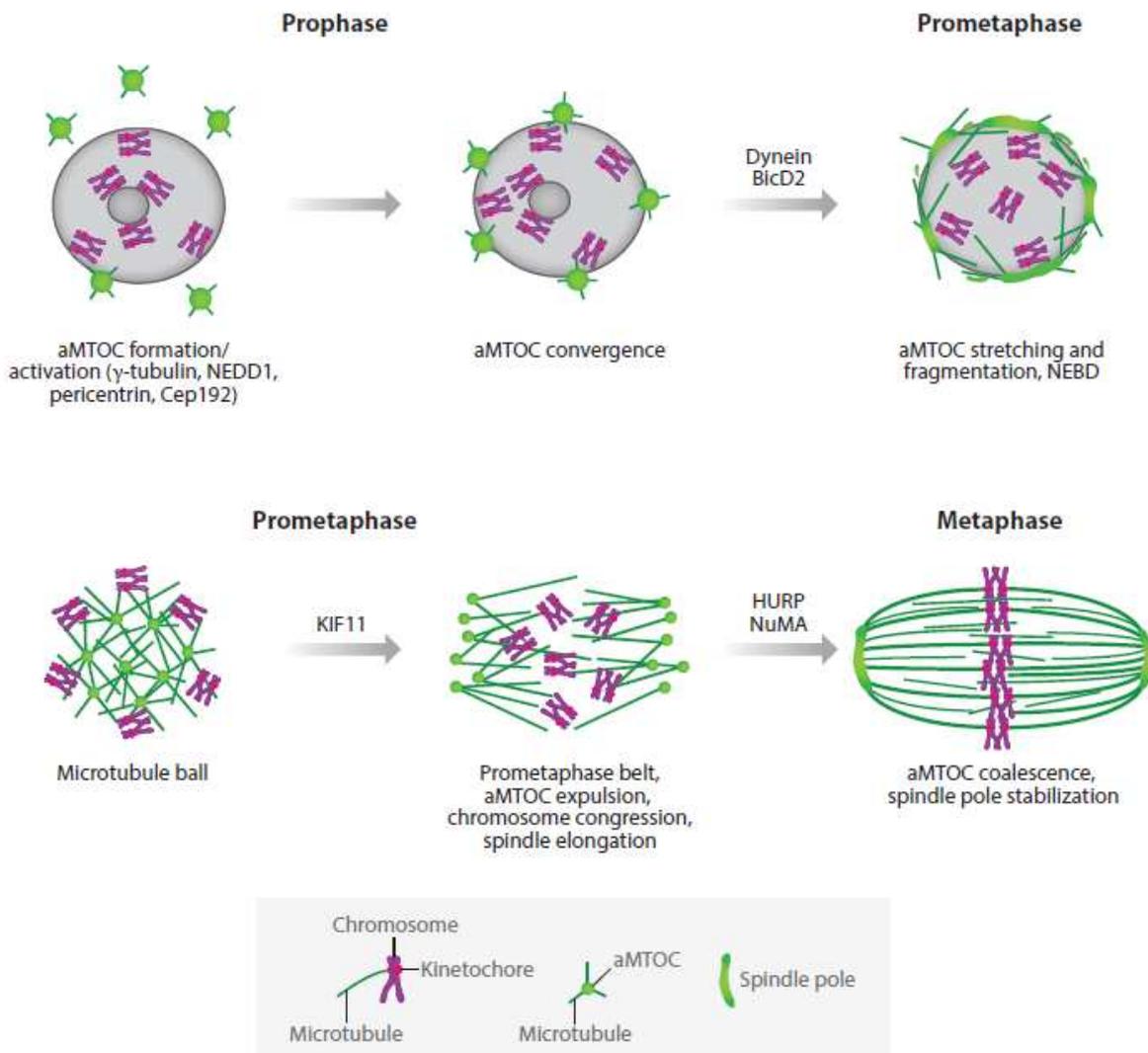
### *2.a. La rupture de la vésicule germinale ou GVBD*

La rupture de la vésicule germinale est le premier élément de la maturation nucléaire des ovocytes. Suite au pic de LH, les chromosomes se condensent et l'enveloppe nucléaire disparaît. Chez la souris hormonalement stimulée, la GVBD se produit une à trois heures après l'injection de hCG ou de LH. Chez la femme, les ovocytes maturés *in vitro* font leur GVBD en moyenne 6,3 h après le retrait des cellules du cumulus, mais la forte variabilité observée rend le résultat imprécis (Escrich et al., 2012).

### *2.b. Formation du fuseau*

La qualité de la condensation des chromosomes, de l'assemblage du fuseau et de la séparation des chromosomes est un paramètre indispensable à la formation d'ovules capables de se développer et de former un nouvel individu. Ces processus complexes ont fait l'objet d'études détaillées (Bennabi, Terret, & Verlhac, 2016; Mogessie, Scheffler, & Schuh, 2018; Severson, von Dassow, & Bowerman, 2016) et ne seront que brièvement décrits.

Le fuseau est une structure dynamique composée de microtubules, structures cylindriques formées de polymères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ . Dans les cellules somatiques, le centre organisateur des microtubules (MTOC ou MicroTubule Organizing Center) est le centrosome composé de deux centrioles entourés de matériel péricentriolaire. Cette structure permet la formation rapide du fuseau. Dans les ovocytes, la formation du fuseau est gérée par des MTOC particuliers car dépourvus de centrioles. Les MTOC acentriolaires se forment *de novo* dans le cytoplasme et servent de sites de nucléation des microtubules. A partir de la GVBD, ils migrent à proximité des chromosomes et forment une boule de microtubules entourée des chromosomes. Les MTOC sont ensuite repoussés à la surface de la boule en formant de multiples pôles. Cette étape est dépendante de la kinésine KIF11 (Kinesin Family Member 11) dont le rôle dans la dynamique du fuseau est prépondérant car elle permet le positionnement des chromosomes et la formation d'un fuseau bipolaire. Progressivement, deux des pôles vont dominer et se séparer permettant l'élongation du fuseau. Les deux pôles sont alors stabilisés par la protéine NuMA (Nuclear Mitotic Apparatus), le fuseau adopte sa forme caractéristique de tonneau et les chromosomes sont alignés au centre du fuseau : c'est la métaphase (**Figure 18**). Du fait de l'absence de centriole, la formation du fuseau est plus longue dans les ovocytes que dans les cellules somatiques (Holt et al., 2013; Mogessie et al., 2018).



**Figure 18 : Représentation schématique de la formation du fuseau dans les ovocytes.**

Dans les ovocytes au stade GV, des MTOC acentriolaires (aMTOC) se forment dans le cytoplasme puis migrent vers le noyau. Après la rupture de la vésicule germinale, au stade prométaphase, une boule de microtubules se forme avec les aMTOC vers l'intérieur et les chromosomes vers l'extérieur. Les aMTOC sont ensuite repoussés vers l'extérieur et la boule de microtubules devient bipolarisée. Les deux pôles se séparent permettant l'élongation du fuseau. En métaphase, les pôles sont stabilisés par NuMA, les chromosomes sont alignés sur la plaque métaphasique et le fuseau a adopté sa forme caractéristique de tonneau. Figure d'après (Mogessie et al., 2018).

### 2.c. Migration et séparation des chromosomes

Au cours de son développement, l'ovocyte va subir deux divisions méiotiques tout en gardant le maximum de cytoplasme, source d'énergie, d'ARN maternels et de protéines. Pour cela, il réalise des divisions extrêmement asymétriques à l'origine d'une très petite cellule (le globe polaire) contenant le surplus chromosomique et vouée à se dégrader, et une grosse cellule (l'ovocyte) destinée à poursuivre son développement. L'asymétrie de la division méiotique nécessite un positionnement du fuseau proche de la surface avant l'extrusion du premier globe

polaire. Le mécanisme en jeu dans la position du fuseau est controversé. Une première hypothèse indique que le fuseau se forme au centre de l'ovocyte puis migre en surface (Mogessie et al., 2018), alors qu'une seconde hypothèse indique que le fuseau se forme directement en périphérie de l'ovocyte (Coticchio et al., 2015).

Après la formation du fuseau en métaphase, les chromosomes homologues sont séparés en anaphase I puis la moitié des chromosomes est éliminée dans le 1<sup>er</sup> globule polaire en télophase I. L'inhibition de la séparation des chromatides sœurs en première méiose est nécessaire à la préservation de la ploïdie de l'ovule en formation et donc du futur embryon. Les chromatides sœurs sont maintenues entre elle par des complexes en forme d'anneau appelés cohésines et composés de quatre sous-unités : Scc1, Scc3, Smc1 et Smc3. La ségrégation des chromatides sœurs est dépendante de la séparase qui clive la sous-unité Scc1 des cohésines. En prométaphase, les cohésines sont protégées par la sécurine qui inhibe la séparase. A l'anaphase, le complexe APC/C à l'origine de la dégradation de la Cycline B1 dégrade également la sécurine, levant ainsi l'inhibition de la séparase qui peut alors dégrader les cohésines (Jones, 2005). Afin de prévenir la séparation des chromatides sœurs en méiose I, les cohésines centromériques sont protégées par SGO2 (Shugoshin 2) qui, en recrutant des phosphatases PP2A, empêche la phosphorylation et donc l'inhibition des cohésines (J. Lee et al., 2008).

### 3. La maturation cytoplasmique

La maturation nucléaire s'accompagne d'une importante réorganisation du cytoplasme ovocytaire où plusieurs organites subissent des changements de structure, de fonction ou de localisation.

#### 3.a. *Les mitochondries*

Véritables machines à produire de l'ATP, les mitochondries représentent le centre énergétique des cellules. Sachant que les ovocytes matures métabolisent mal le glucose, l'ATP nécessaire à la maturation ovocytaire provient principalement de la phosphorylation oxydative, processus permettant la phosphorylation de l'ADP en ATP grâce à une chaîne de transport d'électrons. Cette chaîne de transport d'électrons se trouve dans la membrane interne des mitochondries et est composée de cinq complexes protéiques. Le transport des électrons à travers ces différents complexes permet également le transport de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire et génère un gradient de protons également appelé potentiel de membrane. Ce gradient de protons est ensuite dissipé par le retour des protons vers la matrice mitochondriale via le complexe V appelé ATP synthase. C'est le passage des protons à travers ce complexe qui permet une production importante d'ATP (Nolfi-Donagan, Braganza, & Shiva, 2020).

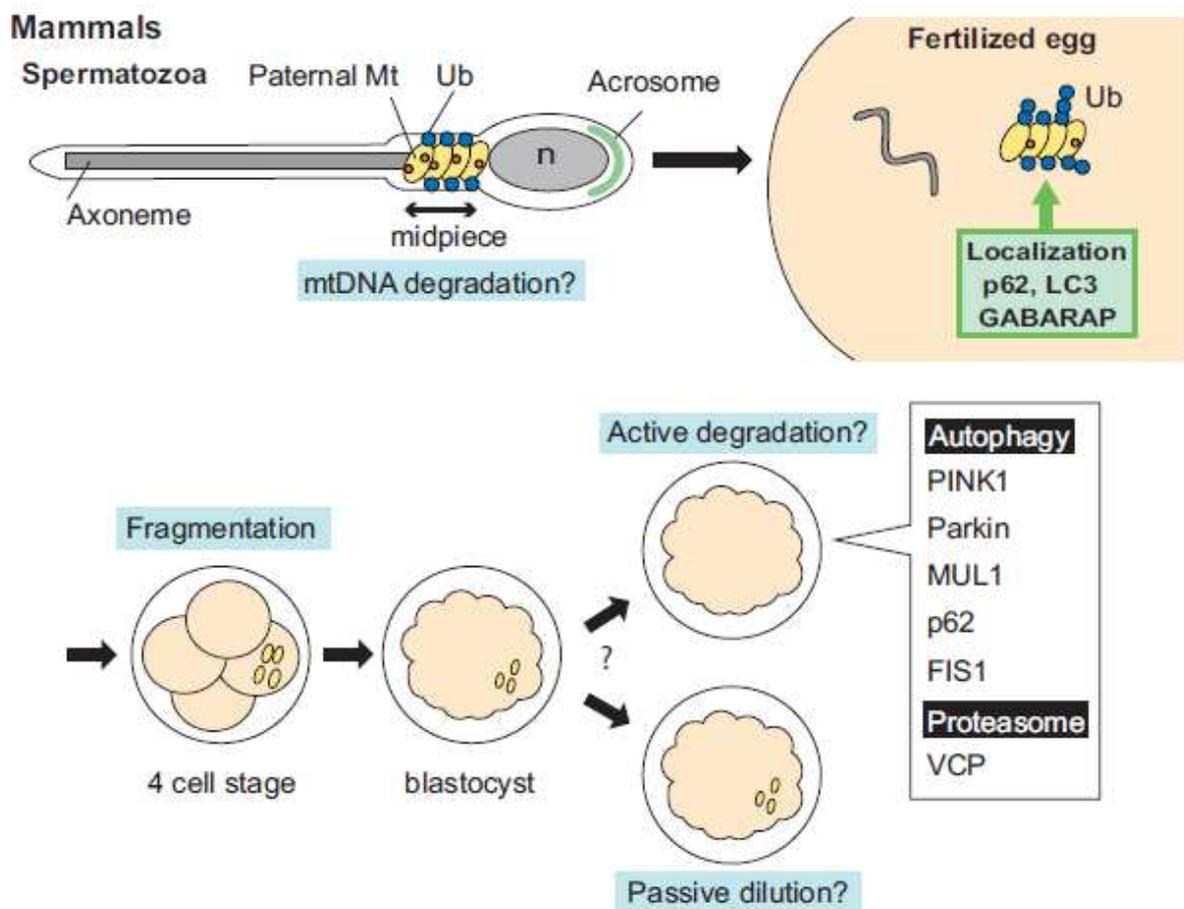
La maturation cytoplasmique s'accompagne d'une importante réorganisation des mitochondries dont le nombre augmente drastiquement. Dans les ovocytes au stade GV, la structure des mitochondries (forme sphérique, crêtes mitochondriales peu nombreuses et matrice claire) traduit leur état d'immaturité qui permet de protéger l'ovocyte du stress oxydant (Dumollard, Duchon, & Sardet, 2006; Motta, Nottola, Makabe, & Heyn, 2000). La production d'ATP est alors gérée par les cellules du cumulus qui communiquent avec l'ovocyte par les jonctions

communicantes (Collado-Fernandez, Picton, & Dumollard, 2012; Kirillova, Smitz, Sukhikh, & Mazunin, 2021). La rupture des jonctions communicantes au moment de la maturation ovocytaire implique une modification du métabolisme de l'ovocyte qui doit produire l'ATP dont il a besoin. Les mitochondries deviennent alors actives, les crêtes mitochondriales s'allongent et la matrice se densifie (Motta et al., 2000).

La maturation cytoplasmique est également caractérisée par une élévation du potentiel de membrane des mitochondries et une relocalisation de ces dernières (Al-Zubaidi et al., 2019). Malgré des variations inter espèces (Y. Takahashi et al., 2016), cette relocalisation mitochondriale se fait en fonction des besoins énergétiques de l'ovocyte en maturation et permet de fournir l'énergie essentielle à la GVBD, la condensation des chromosomes et à la formation du fuseau méiotique (Van Blerkom, 2011). Au stade GV, les mitochondries se répartissent de façon uniforme dans tout le cytoplasme. Juste avant la GVBD, les mitochondries commencent à se regrouper au centre de l'ovocyte et s'accumulent autour du noyau. Au cours de la formation du fuseau méiotique, les mitochondries se rassemblent autour de cette structure puis se dispersent à nouveau dans tout le cytoplasme lors de la formation du premier globule polaire qui ne contiendra pas ou peu de mitochondries. La séparation inégale des mitochondries dans l'ovocyte et le globule polaire permet de retenir les mitochondries dans l'ovocyte et satisfaire la demande d'ATP nécessaire à la formation d'un embryon (Babayev & Seli, 2015; Dalton & Carroll, 2013; Van Blerkom & Runner, 1984).

En dehors du noyau, les mitochondries sont les seuls organites à posséder leur propre génome. Chez l'Homme, mais également chez la plupart des organismes, l'ADN mitochondrial d'un individu est hérité uniquement de la mère. De ce fait, les mitochondries contenues dans l'ovule jouent un rôle primordial puisqu'elles seront responsables de la production d'ATP nécessaire à la fécondation et au développement embryonnaire précoce. Les mécanismes à l'origine de l'héritage mitochondrial uniparental sont multiples et espèce dépendante. Ainsi, l'absence de transmission de l'ADN mitochondrial paternel peut s'expliquer par la diminution drastique du nombre de mitochondries dans le spermatozoïde au cours de la spermatogenèse, le blocage de l'entrée des mitochondries dans l'ovocyte ou bien la dégradation des mitochondries ou de l'ADN mitochondrial paternel après la fécondation (May-Panloup, Bogueuet, Hachem, Bouet, & Reynier, 2021; K. Sato & Sato, 2017; M. Sato & Sato, 2013). Chez le hamster chinois, la pièce intermédiaire du spermatozoïde contenant les mitochondries ne rentre pas dans l'ovocyte au moment de la fécondation, mais cette situation est loin d'être la norme. Chez la plupart des Mammifères et notamment chez l'Homme et la souris, les mitochondries du spermatozoïde peuvent pénétrer à l'intérieur de l'ovocyte, mais leur devenir est controversé. Sachant que les mitochondries des spermatozoïdes sont ubiquitinylées, l'une des hypothèses indique que les mitochondries paternelles seraient dégradées au cours des premières divisions embryonnaires et que cette dégradation serait dépendante des lysosomes ou du système ubiquitine/protéasome puisque le processus est perturbé en présence d'inhibiteur des lysosomes ou du protéasome (P. Sutovsky, McCauley, Sutovsky, & Day, 2003; Peter Sutovsky et al., 2000). La prohibitine, protéine de la membrane mitochondriale indispensable au fonctionnement des mitochondries pourrait être une cible d'ubiquitination et de dégradation dans les mitochondries paternelles (Peter Sutovsky et al., 2000). De façon intéressante, la prohibitine est impliquée dans la mitophagie, processus

permettant l'élimination de mitochondries endommagées ou non désirées par autophagie (Wei, Chiang, Sumpster, Mishra, & Levine, 2017). Une autre hypothèse indique que les mitochondries paternelles sont dégradées au cours de la spermatogenèse, mais pas après la fécondation, et que l'ADN mitochondrial paternel devient largement minoritaire par dilution dans l'ovocyte (Figure 19). D'ailleurs, une étude publiée dans PNAS indique que, chez la souris, les mitochondries paternelles persistent dans les embryons jusqu'au stade morula et que l'ADN mitochondrial paternel est détecté chez les souriceaux (S. M. Luo et al., 2013).



**Figure 19 : Le devenir des mitochondries paternelles dans les embryons de Mammifères.**

Il est communément admis que la grande majorité des mitochondries d'un individu sont héritées de la mère. Plusieurs hypothèses sont mises en avant pour expliquer ce phénomène. Une première hypothèse met en avant la dégradation active des mitochondries paternels par la voie du protéasome ou par autophagie. Une autre hypothèse parle de dilution passive des mitochondries paternelles au cours du développement embryonnaire. Figure d'après (K. Sato & Sato, 2017).

### 3.b. Les gouttelettes lipidiques

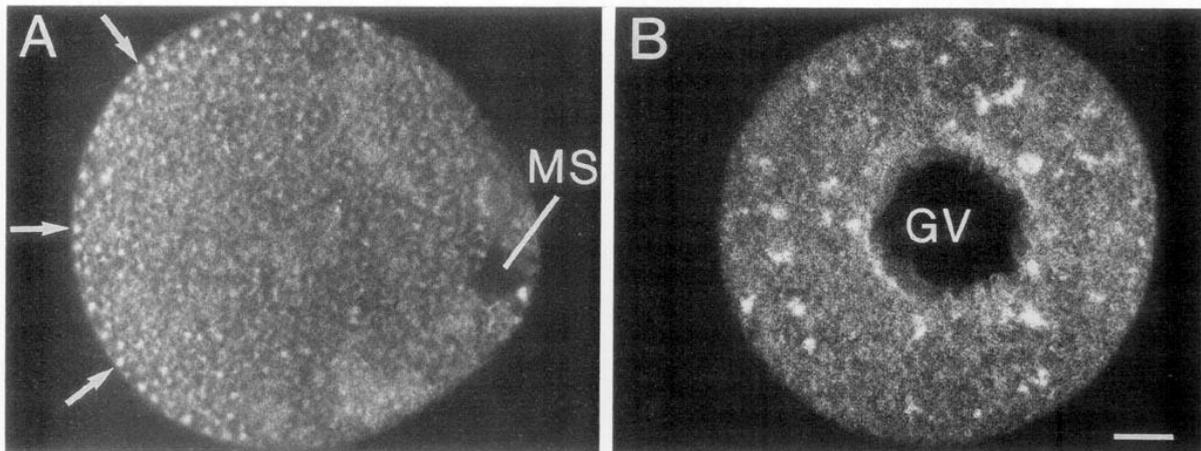
Les lipides sont des molécules hydrophobes entrant dans la composition des membranes biologiques et participant à la production des hormones stéroïdiennes. Source d'énergie, leur  $\beta$ -oxydation dans les mitochondries permet la production d'acétyl-CoA et de facteurs alimentant la chaîne respiratoire (NADH, FADH<sub>2</sub>). Le blocage de la maturation ovocytaire, induit par l'inhibition

de la  $\beta$ -oxydation des acides gras, mais aussi l'amélioration de la compétence développementale des ovules suite à l'activation de la  $\beta$ -oxydation des acides gras, démontre l'importance des lipides dans la qualité des gamètes femelles (Kylie R. Dunning et al., 2010; Sanchez-Lazo et al., 2014).

Dans les ovocytes et les cellules folliculaires, les lipides sont stockés sous forme de gouttelettes lipidiques et le profil lipidique des gamètes femelles dépend des espèces, mais aussi du niveau de maturation ovocytaire. Chez la truie, les gouttelettes lipidiques migrent en périphérie de l'ovocyte au cours de sa maturation. A l'inverse, la maturation des ovocytes de souris est associée à un regroupement en région centrale des gouttelettes lipidiques. Chez la vache, le nombre de ces gouttelettes augmente entre le stade GV et le stade MII. De façon générale, les gouttelettes lipidiques semblent localisées à proximité des mitochondries (K. R. Dunning, Russell, & Robker, 2014).

### 3.c. Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE), qualifié de rugueux lorsqu'il est associé à des ribosomes et lisses lorsqu'il ne l'est pas, est impliqué dans l'assemblage et le transport des protéines, la synthèse des lipides et le stockage du calcium. Cette dernière fonction est essentielle au cours de la fécondation puisqu'elle permet le relargage du calcium nécessaire à l'activation ovocytaire (voir le chapitre 2.II « *L'activation ovocytaire* »). Dans les ovocytes au stade GV, le RE forme des agrégats mal définis dans le cytoplasme. Au cours de la maturation ovocytaire, le RE se réorganise pour former un réseau dans tout le cytoplasme et des agrégats d'environ 1 à 2  $\mu\text{m}$  dans le cortex du côté opposé au fuseau méiotique (Coticchio et al., 2015; Mehlmann, Terasaki, Jaffe, & Kline, 1995), (**Figure 20**). De plus, la transition du stade GV au stade MII s'accompagne d'une augmentation du nombre et de la sensibilité des récepteurs à l'IP3 (IP3R) (Mehlmann, Mikoshiba, & Kline, 1996; Wakai et al., 2012). Ces récepteurs, localisés dans le RE, répondent à la fixation de l'IP3 en permettant la sortie du calcium du réticulum endoplasmique. Ainsi, la réorganisation du réticulum endoplasmique et des IP3R au cours de la maturation cytoplasmique permet d'augmenter la sensibilité de l'ovule mature pour l'IP3 ce qui permettra l'initiation des vagues calciques suite à l'entrée du spermatozoïde.



**Figure 20 : Réorganisation du réticulum endoplasmique au cours de la maturation ovocytaire chez la souris.**

Dans les ovocytes au stade GV (B), le réticulum endoplasmique forme des agrégats répartis dans tout le cytoplasme. Dans les ovules matures en attente de fécondation (A), le réticulum endoplasmique forme des granules d'environ 1 à 2  $\mu\text{m}$  en périphérie du gamète, ce qui permet d'accroître la sensibilité des mécanismes responsables du relargage du calcium suite à l'entrée du spermatozoïde. Images d'après (Mehlmann et al., 1995).

### 3.d. L'appareil de Golgi

Positionné entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique, l'appareil de Golgi permet la maturation, l'emballage et l'expédition de macromolécules vers d'autres compartiments cellulaires ou dans le milieu extracellulaire. Dans les ovocytes au stade GV, l'appareil de Golgi forme une multitude de « mini Golgis » fonctionnels, dispersés dans le cytoplasme, mais tout de même moins concentrés en périphérie. A partir de la GVBD, l'appareil de Golgi se fragmente et se positionne en région centrale. Au stade MII, les fragments de Golgi s'accumulent aux pôles du fuseau (Moreno, Schatten, & Ramalho-Santos, 2002). L'inhibition de la maturation induite par le blocage du trafic membranaire entre le RE et l'appareil de Golgi semble indiquer que l'appareil de Golgi supporte des fonctions essentielles à la maturation. Bien que les mécanismes en jeu soient mal compris, l'appareil de Golgi, et plus spécifiquement la protéine GM130 (Golgi Matrix protein), pourrait être nécessaire à la formation du fuseau en servant de centre de nucléation des microtubules (Coticchio et al., 2015; C. H. Zhang et al., 2011).

### 3.e. Les granules corticaux

Les granules corticaux sont des vésicules mesurant 0,2 à 0,6  $\mu\text{m}$ , issues de la fusion de vésicules produites par l'appareil de Golgi, et dispersées dans le cytoplasme des ovocytes au stade GV. Dès la reprise de la méiose, les granules corticaux migrent en périphérie de l'ovocyte en s'associant aux microfilaments (Q. Y. Sun et al., 2001), faisant de la localisation des granules corticaux un marqueur de maturité ovocytaire. Suite à la fécondation et à l'activation des voies de signalisation calciques, les granules corticales fusionnent avec la membrane plasmique de l'ovocyte et libèrent leur contenu dans l'espace périvitellin. Ce phénomène d'exocytose, appelé réaction corticale, induit une modification de la zone pellucide à l'origine du blocage de la polyspermie (voir chapitre 2.II.3b « *La réaction corticale* ») (Coticchio et al., 2015).

---

## Chapitre n°2 : la fécondation, l'activation ovocytaire et l'activation du génome embryonnaire

---

### I. L'interaction ovule/spermatozoïde

La fécondation est définie comme un ensemble de mécanismes permettant le rapprochement et la fusion des gamètes. Cela nécessite le passage du spermatozoïde à travers le cumulus, sa fixation à la zone pellucide puis son adhésion et sa fusion à la membrane plasmique de l'ovule. Dans le tractus génital femelle, le spermatozoïde subit d'importantes modifications (capacitation, réaction acrosomique) nécessaires au processus de fécondation. Ces réactions sont détaillées dans les revues suivantes : (Bailey, 2010; Delgado-Bermudez, Yeste, Bonet, & Pinart, 2022; Z. He, Xie, Li, Duan, & Lu, 2022; Ickowicz, Finkelstein, & Breitbart, 2012; Tamburrino, Marchiani, Muratori, Luconi, & Baldi, 2020). Lors de son ovulation, l'ovule est entouré de cellules du cumulus incrustées dans une matrice extracellulaire riche en acide hyaluronique. Ainsi, le passage des spermatozoïdes à travers cette matrice est permis par l'action de hyaluronidases présentes sur et dans les spermatozoïdes et assurant la dispersion des cellules du cumulus. La membrane plasmique du spermatozoïde peut alors se fixer sur la zone pellucide de l'ovule. L'interaction entre les gamètes au niveau de la zone pellucide et de la membrane plasmique de l'ovocyte est un processus complexe impliquant de nombreux partenaires et ayant fait l'objet de plusieurs revues (Evans, 2012; Gahlay & Rajput, 2020; Ikawa, Inoue, Benham, & Okabe, 2010; Jimenez-Movilla, Hamze, & Romar, 2021).

#### 1. Le passage de la zone pellucide

La zone pellucide est une matrice extracellulaire riche en protéines et composée de trois glycoprotéines majoritaires : ZP1, ZP2 et ZP3. Chez certaines espèces comprenant la femme, la zone pellucide contient également une quatrième protéine (ZP4) absente chez la souris. En plus de leur importance dans la structure de la zone pellucide, les protéines ZP participent à l'interaction entre la zone pellucide et les spermatozoïdes (Gupta et al., 2012).

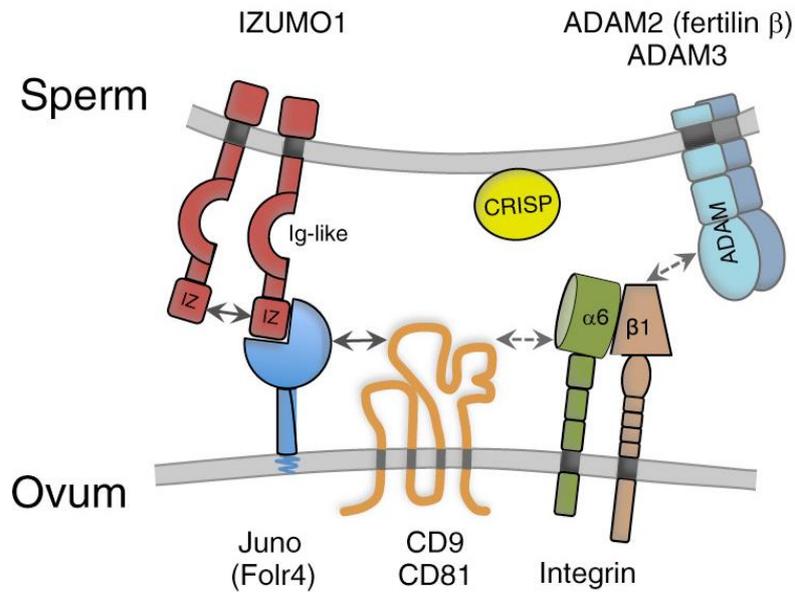
L'acrosome est une vésicule dérivée de l'appareil de Golgi positionnée sur la partie antérieure de la tête du spermatozoïde. La réaction acrosomique est une réaction d'exocytose permettant la libération des enzymes contenues dans l'acrosome. Parmi ces enzymes, la hyaluronidase contribue au passage du cumulus et l'acrosine hydrolyse certaines protéines de la zone pellucide permettant au spermatozoïde de pénétrer la matrice protéique. La réaction acrosomique s'accompagne d'une relocalisation protéique au niveau de la tête du spermatozoïde. Ainsi, la migration de Izumo vers le segment équatorial est une étape indispensable à l'interaction du spermatozoïde avec la membrane plasmique de l'ovule (Saint-Dizier, Chastant-Maillard, & Chemineau, 2014). Il a longtemps été accepté que la réaction acrosomique était déclenchée par la fixation des spermatozoïdes sur la zone pellucide. Cependant, une étude réalisée sur des souris transgéniques dont l'acrosome est marqué avec de la GFP a montré que la plupart des

spermatozoïdes initient leur réaction acrosomique avant d'atteindre la zone pellucide (Jin et al., 2011). D'ailleurs, des spermatozoïdes acrosome-réagit conservent leur capacité à pénétrer le cumulus et la zone pellucide puis féconder un ovule en engendrer une descendance viable (Inoue, Satouh, Ikawa, Okabe, & Yanagimachi, 2011).

## 2. L'adhésion et la fusion des gamètes

Après avoir traversé la zone pellucide, le spermatozoïde se retrouve dans l'espace périvitellin où il peut adhérer à la membrane plasmique de l'ovule. Seuls les spermatozoïdes ayant réalisé leur réaction acrosomique peuvent effectuer cette étape. De nombreuses protéines sont impliquées dans le processus d'adhésion, les plus connues étant certainement le couple Juno/Izumo où Juno, présent à la membrane plasmique de l'ovule, est le récepteur de Izumo, protéine transmembranaire située au niveau du segment équatorial des spermatozoïdes acrosome-réagit (Inoue, Ikawa, Isotani, & Okabe, 2005). Chez la souris, l'absence de Juno dans les ovules ou de Izumo dans les spermatozoïdes rend les individus infertiles du fait d'une absence de fusion gamétique. Les spermatozoïdes restent alors bloqués dans l'espace périvitellin. La dégradation rapide de Juno après la fécondation participe au blocage de la polyspermie (Bianchi, Doe, Goulding, & Wright, 2014). Une étude récente a identifié un nouvel acteur de cette interaction : la protéine FCRL3, nommée MAIA, présente à la surface des ovules et présentant une forte interaction avec JUNO (Vondrakova et al., 2022). De plus, de nouvelles protéines spermatiques impliquées dans le processus de fusion gamétique viennent d'être identifiées (SOF1, TMEM95, SPACA6, FIMP) mais leurs fonctions moléculaires restent à préciser (Fujihara et al., 2020; Lamas-Toranzo et al., 2020; Noda et al., 2020).

Plusieurs protéines membres de la famille des tétraspanines, dont CD9 (Cluster of Differentiation) et CD81 sont présentes à la membrane plasmique des ovules et participent à l'adhésion gamétique. Chez la souris, l'absence de ces deux protéines rend les femelles infertiles sans affecter la pénétration de la zone pellucide. En revanche, la fécondation est bloquée et les spermatozoïdes restent dans l'espace périvitellin (Rubinstein et al., 2006). Une partie de la surface des ovules est recouverte de microvillosités sur lesquelles s'accrochent les spermatozoïdes (Shalgi & Phillips, 1980). Or, chez les souris déficientes en CD9, la structure de ces microvillosités est altérée ce qui suggère que la structure de la membrane plasmique des ovules dépourvus de CD9 ne supporte pas la fécondation (Runge et al., 2007). Les tétraspanines ont la particularité de pouvoir interagir entre elles, mais aussi avec des intégrines. Ainsi, CD9 interagit avec CD81 et avec l'intégrine  $\alpha\beta 1$  et ce complexe serait impliqué dans l'interaction avec les spermatozoïdes via ADAM3 (Y. Takahashi, Bigler, Ito, & White, 2001). De plus, une étude publiée en 2014 suppose une interaction entre CD9 et Juno (Chalbi et al., 2014), (**Figure 21**).



**Figure 21 : Modèle simplifié de l'interaction ovule-spermatozoïde.**

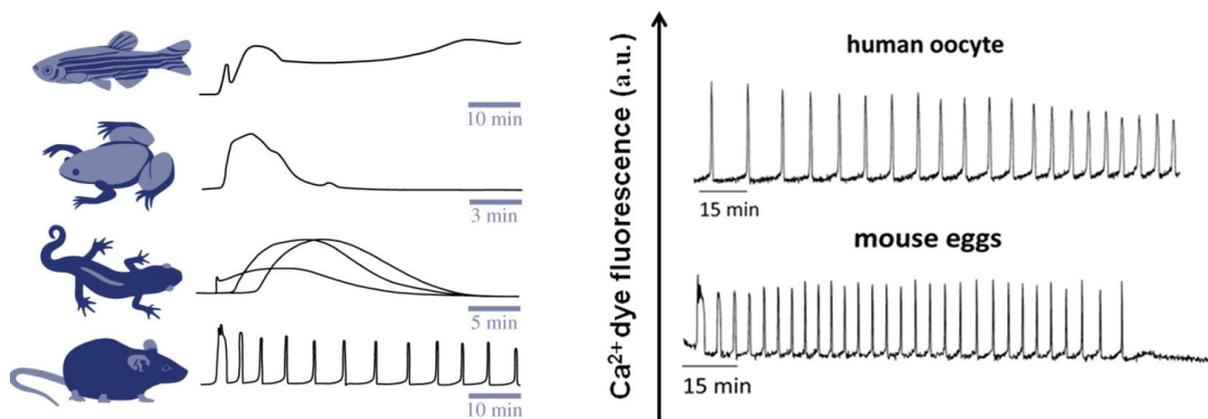
L'adhésion du spermatozoïde avec la membrane plasmique de l'ovule requiert la participation de plusieurs acteurs protéiques essentiels. Juno est une protéine ancrée à la membrane plasmique de l'ovule par une liaison covalente avec le glycolipide Glycosylphosphatidylinositol (GPI) (« GPI-anchored protein ») et interagit directement avec le segment équatorial du spermatozoïde via Izumo. CD9 interagit avec Juno et participe à l'adhésion des spermatozoïdes via les protéines ADAM et les intégrines  $\alpha 6 \beta 1$ . Figure d'après (Dresselhaus, Sprunck, & Wessel, 2016).

L'adhésion entre l'ovule et le spermatozoïde est suivie de la fusion des membranes plasmiques qui débute au niveau du segment équatorial du spermatozoïde. Selon les espèces, l'intégralité ou seulement une partie du spermatozoïde pénètre dans l'ovule. L'enveloppe nucléaire du spermatozoïde disparaît et la chromatine commence à se décondenser. L'entrée du spermatozoïde déclenche alors une série de réactions faisant référence à l'activation ovocytaire.

## II. L'activation ovocytaire

### 1. Les oscillations calciques

L'entrée du spermatozoïde dans l'ovule transforme le gamète femelle en zygote. L'élévation de la concentration calcique dans le cytoplasme du zygote, mécanisme très conservé dans l'évolution, est à la fois nécessaire et suffisant à l'activation ovocytaire, ce qui inclut l'exocytose des granules corticaux, la reprise de la seconde division méiotique, la formation des pronoyaux, le recrutement des ARNm maternels et l'initiation des divisions embryonnaires. Le profil de libération de calcium dans le cytoplasme est espèce dépendante. Chez la femme et la souris, la libération de calcium se fait par vagues successives dont la première est la plus intense, on parle alors de vagues ou d'oscillations calciques (Figure 22).



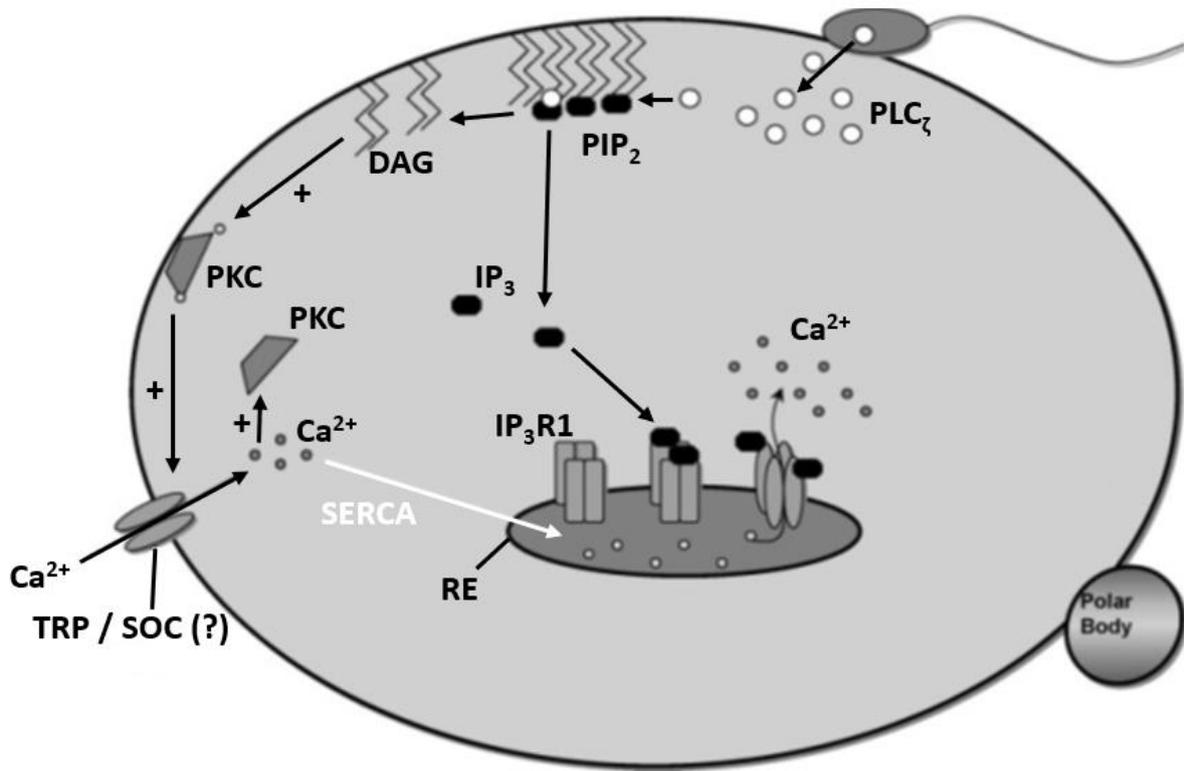
**Figure 22 : Le profil libération calcique est espèce-dépendante.**

La libération de calcium en réponse à la fécondation est un phénomène conservé au sein de l'évolution et nécessaire au développement de l'embryon. Il existe tout de même une forte variabilité inter espèces comme en témoignent les profils de libération de calcium chez le poisson zèbre, le xénope, le triton et la souris. Chez la femme et la souris, la libération de calcium se fait par vagues successives, la première étant la plus longue et la plus intense. Ces deux profils diffèrent en termes de fréquence puisque les oscillations calciques sont plus rapides chez la souris. Figure d'après (Stein, Savy, Williams, & Williams, 2020).

## 2. Les voies de signalisation à l'origine de l'élévation calcique

L'élévation de la concentration en calcium est contrôlée par un facteur spermatique identifié en 2002 : PLC $\zeta$  (PLC zêta). PLC $\zeta$  est une phospholipase, enzyme responsable de l'hydrolyse des liaisons esters des phospholipides, principaux constituant des membranes biologiques. Le mécanisme de libération de calcium médié par PLC $\zeta$  est schématisé sur la Figure 23. Localisée au niveau du segment équatorial du spermatozoïde, PLC $\zeta$  diffuse dans l'ovule lors de la fusion des gamètes puis hydrolyse le Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP $_2$ ) en Inositol 1,4,5-triphosphate (IP $_3$ ) et Diacylglycerol (DAG). IP $_3$ R1, localisé à la membrane du réticulum endoplasmique, est un récepteur contenant six domaines transmembranaires qui forment un canal calcique. La fixation de IP $_3$ , sur son récepteur IP $_3$ R1, permet l'ouverture du canal calcique et la libération du calcium contenu dans le réticulum endoplasmique (Malcuit, Kurokawa, & Fissore, 2006; S. Y. Yoon, 2019). La maintenance des oscillations calciques sur la durée nécessite le remplissage du réticulum endoplasmique. Le retour du calcium cytoplasmique vers le réticulum endoplasmique va à l'encontre de son gradient. Il est réalisé grâce à l'action des pompes ioniques SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca $^{2+}$ -ATPase) en utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse d'ATP (F. Wang et al., 2020). Le maintien des oscillations calciques au cours du temps pourrait également être régulé par la protéine kinase C, activée par le DAG et le calcium lui-même. Cette hypothèse, soutenue par Guillaume Halet et ses collègues, repose sur l'observation d'une translocation rapide de PKC vers la membrane plasmique de l'ovocyte à chaque vague calcique. De cette façon, PKC pourrait réguler l'ouverture de canaux calciques de types SOC (Store-Operated Channels) ou TRP (Transient Receptor Potential) activés en cas de diminution des stocks de calcium. Présents à la membrane plasmique, ces canaux permettent l'entrée de calcium provenant

du milieu extracellulaire (Halet, Tunwell, Parkinson, & Carroll, 2004; Malcuit et al., 2006). PKC participe également à la régulation de IP<sub>3</sub>R1 en contrôlant son état de phosphorylation (Vanderheyden et al., 2009).



**Figure 23 : Représentation simplifiée des voies de signalisation responsables de la libération de calcium et nécessaires à l'activation ovocytaire.**

Apportée par le spermatozoïde fécondant, la phospholipase PLC $\zeta$  hydrolyse PIP<sub>2</sub> en IP<sub>3</sub> et DAG. Suite à l'activation de IP<sub>3</sub>R par IP<sub>3</sub>, le calcium contenu dans le réticulum endoplasmique (RE) est relargué dans le cytoplasme. La maintenance des vagues calciques au cours du temps est permise par le retour du calcium vers le RE grâce aux pompes SERCA (flèche blanche). De plus, des canaux de types TRP ou SOC, présents à la membrane plasmique, pourraient être activés par PKC et permettraient l'entrée de calcium provenant du milieu extracellulaire. Figure modifiée à partir de (Malcuit et al., 2006).

### 3. L'activation ovocytaire : les événements contrôlés par le calcium

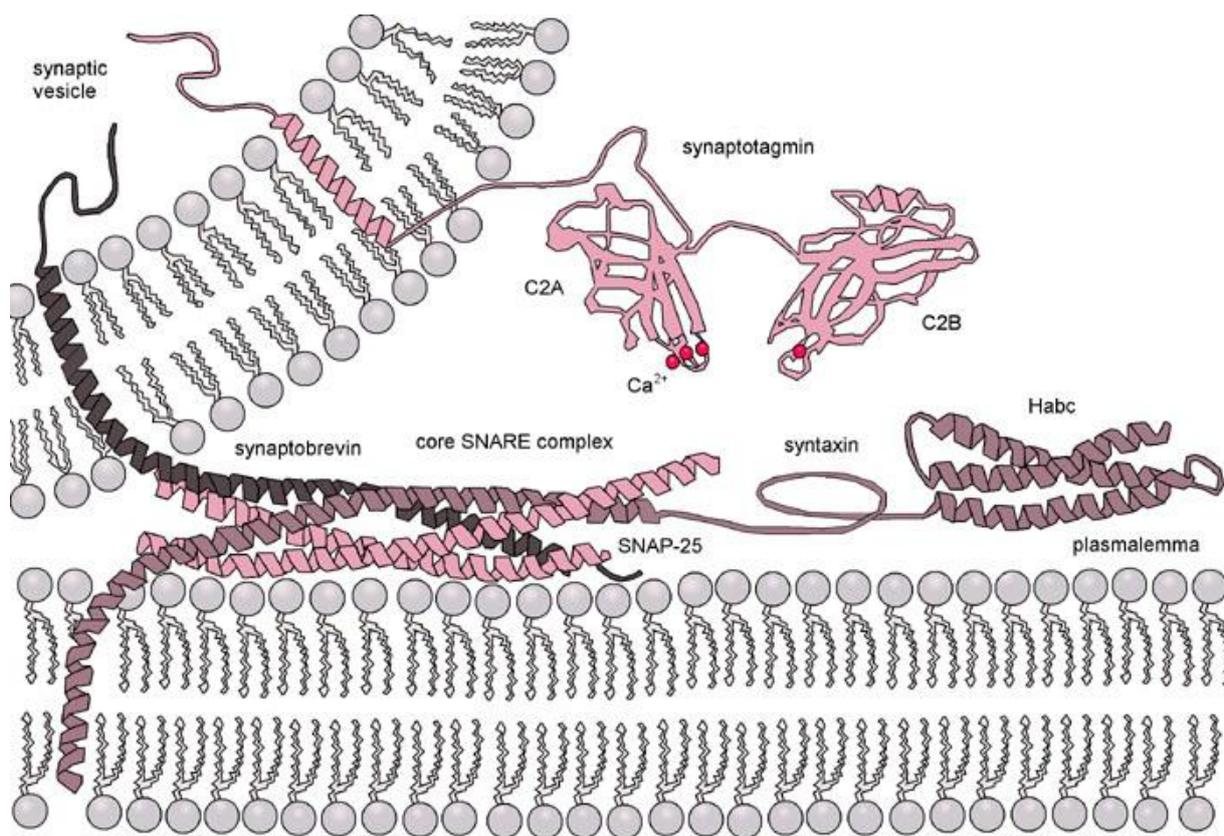
#### 3.a. La régulation de l'expression des gènes

Transcriptionnellement inactif jusqu'à l'activation du génome embryonnaire, le zygote dépend des ARNm maternels synthétisés et stockés au cours de la croissance ovocytaire. Ainsi, lors de l'activation ovocytaire, le recrutement des ARNm maternels est nécessaire à la poursuite du développement de l'embryon (Aoki, Hara, & Schultz, 2003) et ce recrutement est dépendant du calcium (Z. Xu, Kopf, & Schultz, 1994). En se fixant sur la calmoduline de CaMKII (Calcium/calmodulin dependent protein Kinase II), le calcium induit un changement de conformation de la protéine qui est alors activée. CaMKII peut ensuite réguler l'activité de protéines cibles par phosphorylation. De façon intéressante, CaMKII régule l'activité de CPEB

(Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein) dans les cellules nerveuses, modulant ainsi la polyadénylation et la traduction d'ARNm contenant une séquence CPE (Atkins, Nozaki, Shigeri, & Soderling, 2004; Malcuit et al., 2006). Sachant que CPEB est un acteur clé de la régulation de la traduction dans les ovules, un mécanisme similaire pourrait réguler l'expression des gènes au cours de l'activation ovocytaire.

### *3.b. La réaction corticale*

La réaction corticale correspond à l'exocytose des granules corticaux, permettant la libération de leur contenu dans l'espace périvitellin. Acteur majeur du blocage de la polyspermie, cette réaction est dépendante de l'augmentation de la concentration calcique observée suite à l'entrée du spermatozoïde dans l'ovule. L'exocytose des granules corticaux est réalisée grâce au complexe calcium dépendant SNARE, composé de protéines vSNARE (la synaptobrévine) à la membrane de la vésicule, et de protéines tSNARE (syntaxine et SNAP-25) à la membrane plasmique. Brièvement, l'interaction entre la synaptobrévine, la syntaxine et SNAP-25 constitue une structure en forme de fermeture éclair permettant le rapprochement des granules corticales et de la membrane plasmique. La fixation du calcium sur les complexes C2A et C2B de la synaptotagmine active la protéine et permet la fusion des membranes et la libération des protéases et glycoprotéines contenues dans les granules corticaux (Figure 24). Parmi les protéines déversées, l'ovastacine clive les protéines ZP2 de la zone pellucide ce qui provoque le durcissement de la matrice extracellulaire et prévient la fixation des spermatozoïdes (Burkart, Xiong, Baibakov, Jimenez-Movilla, & Dean, 2012; Rojas et al., 2021).



**Figure 24 : L'exocytose des granules corticaux est médiée par le complexe SNARE.**

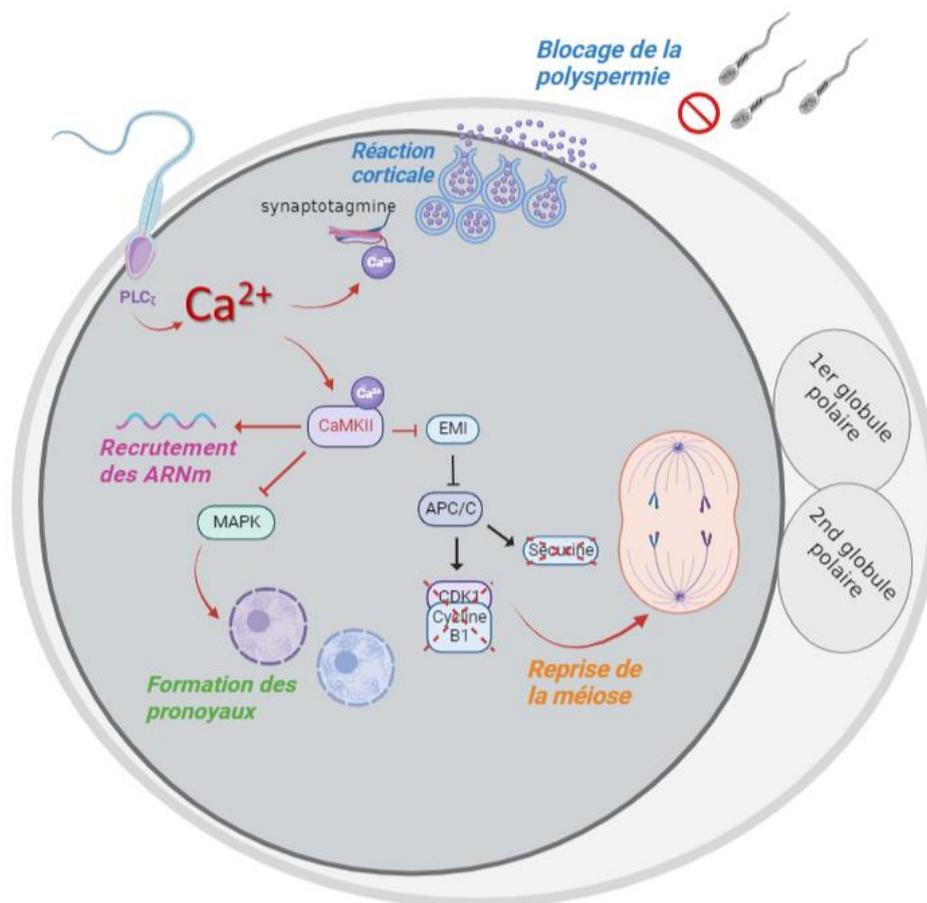
Composé des protéines vSNARE à la surface des vésicules et tSNARE à la surface de la membrane plasmique, ce complexe permet le rapprochement et la fusion des membranes de façon dépendante du calcium. Les enzymes contenues dans les granules corticaux sont alors libérées dans l'espace périvitellin et modifient la structure de la zone pellucide qui devient alors imperméable aux spermatozoïdes. En bloquant la polyspermie, cette réaction appelée réaction corticale est nécessaire au maintien de la ploïdie du futur embryon. Figure d'après (Georgiev & Glazebrook, 2007).

### 3.c. La reprise de la méiose II et la formation des pronoyaux

Comme mentionné précédemment, lors de l'ovulation, les ovules sont bloqués en métaphase II et cet arrêt méiotique est maintenu par une activité élevée du MPF, soutenue par le CSF. La voie de signalisation C-MOS/MEK/MAPK/p90rsk permet l'inhibition du complexe APC/C par EMI ce qui protège la Cycline B1 contre la dégradation (voir chapitre 1.III.1e « L'arrêt en métaphase II »). L'activité élevée du MPF maintient les chromosomes condensés et stabilise le fuseau (Machaty et al., 2017).

Activée sous l'effet du calcium, CaMKII active WEE1B qui, en phosphorylant CDK1, diminue l'activité du MPF. D'ailleurs, l'inhibition de WEE1B dans les ovocytes de souris inhibe la formation des pronoyaux (Oh, Susor, & Conti, 2011). Une autre voie de signalisation activée par le calcium implique la phosphorylation de EMI par CaMKII. EMI phosphorylée devient la cible d'une nouvelle phosphorylation par PLK1 et la double phosphorylation de EMI entraîne sa destruction et lève l'inhibition de APC/C (Hansen, Tung, & Jackson, 2006). En ciblant le motif de destruction (destruction-box motif) de la Cycline B1, APC/C induit la dégradation de la protéine, ce qui diminue

l'activité de MPF. APC/C est également responsable de la dégradation de la sécurine, induisant la libération de la séparase et le clivage de la cohésine. Les chromatides sœurs peuvent alors se séparer, le zygote progresse vers l'anaphase puis forme le second globule polaire (Jones, 2005; Machaty et al., 2017). La fin de la méiose est suivie par la formation des pronoyaux. Bien que le détail des voies de signalisation soit mal compris, la formation des pronoyaux est dépendante de la diminution de l'activité des MAPK puisque l'utilisation d'inhibiteurs de phosphatases maintient l'activité des MAPK et inhibe la formation des pronoyaux (Moos, Visconti, Moore, Schultz, & Kopf, 1995), (Figure 25).



**Figure 25 : L'activation ovocytaire, les évènements contrôlés par le calcium.**

Tout de suite après la fécondation, la PLC $\zeta$  apportée par le spermatozoïde permet le déclenchement des oscillations calciques nécessaires à l'activation ovocytaire. La fixation du calcium sur la synaptotagmine permet l'activation du complexe Snare et l'exocytose des granules corticales. Ce processus, appelé réaction corticale permet une modification de la zone pellucide qui prévient la polyspermie. Lors de l'arrêt méiotique en métaphase II, l'activité du MPF est maintenue élevée grâce à l'inhibition de APC/C par EMI (flèches et symboles noirs). L'activation de CaMKII par le calcium inhibe EMI ce qui permet l'activation de APC/C et la dégradation de la sécurine et de la Cycline B1 (flèches et symboles rouges). L'activité du MPF chute, la cohésine est clivée et le blocage de la méiose est levé. De plus, CaMKII permet le recrutement des ARNm maternels et inhibe la voie des MAPK induisant alors la formation des pronoyaux. Figure créée avec Biorender.

La formation de l'embryon se fait à partir de deux lots de chromatine très différents : une chromatine hyper-compactée par les protamines dans le spermatozoïde et des chromosomes bloqués en métaphase II dans les ovules. Les deux génomes, et particulièrement celui du spermatozoïde, sont très méthylés. Peu après la fécondation, la membrane nucléaire du spermatozoïde se rompt et les protamines sont remplacées par les histones. Au cours des premiers stades de développement, il existe une asymétrie des marques épigénétiques entre les génomes parentaux puisque le génome paternel est plus rapidement déméthylé que le génome maternel. Ce n'est qu'à partir du stade morula que les distinctions entre la chromatine d'origine maternelle et celle d'origine paternelle disparaissent (Beaujean, Mason, Bonnet-Garnier, Salvaing, & Debey, 2010).

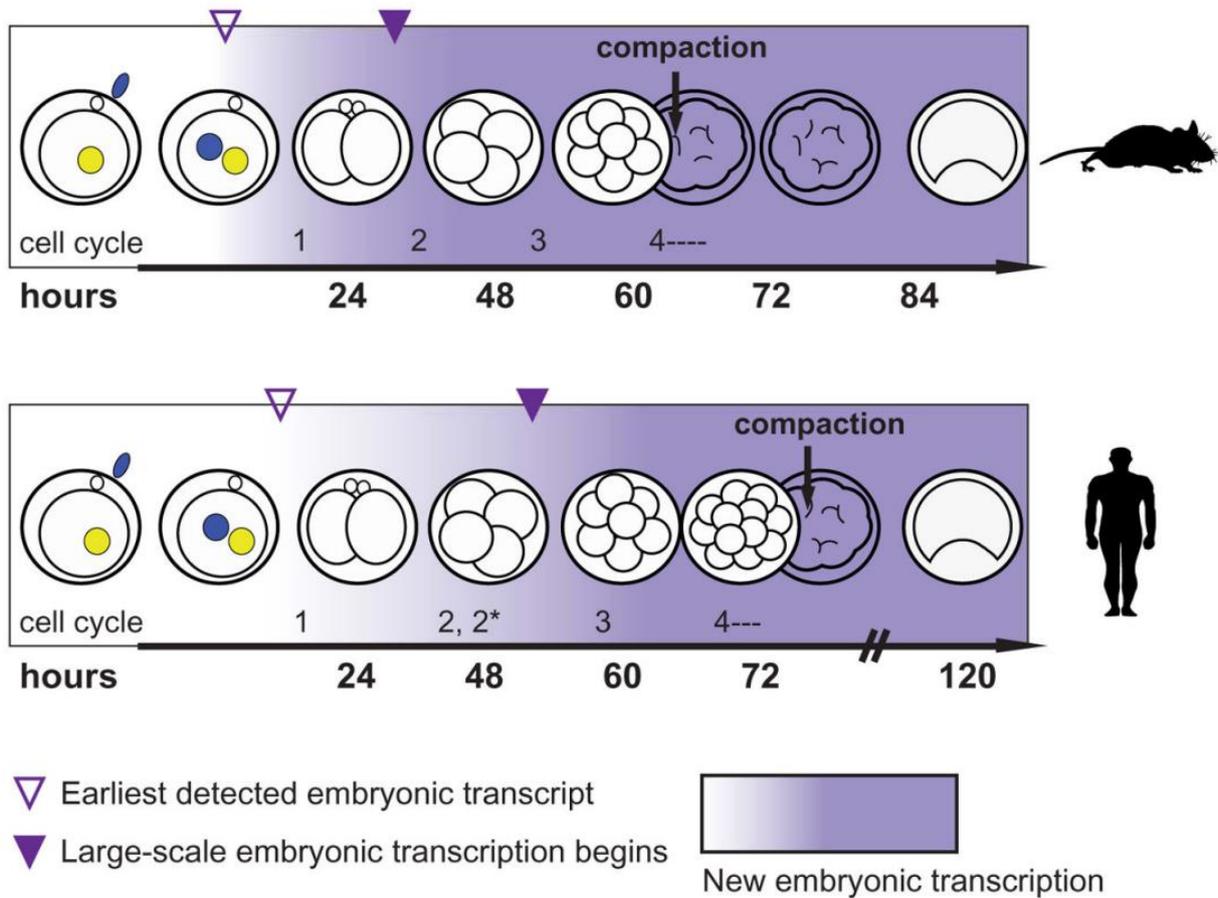
### *3.d. Une chronologie d'évènements finement contrôlée*

Comme indiqué précédemment, l'activation ovocytaire chez la femme et la souris se fait par des élévations transitoires et successives de la concentration en calcium intracytoplasmique. Un pic de calcium unique ne suffit pas à l'accomplissement d'une transition zygote-embryon correcte et chaque évènement nécessite un nombre d'oscillations calciques particulier. Ainsi, les premières oscillations sont responsables de l'exocytose des granules corticaux et du blocage de la polyspermie, les pics suivants induisent la reprise de la méiose, l'extrusion du globule polaire et le recrutement des ARNm maternels, les pics les plus tardifs permettent la formation des pronoyaux et l'induction des premières mitoses embryonnaires. De façon intéressante, lorsqu'un évènement est initié, il ne peut pas être achevé sans oscillation supplémentaire. Par exemple, chez la souris, 8 pics sont suffisants pour diminuer l'activité du MPF et sortir de la métaphase II, mais ne permettent pas la diminution de l'activité des MAPK ni la formation des pronoyaux. Ainsi, un arrêt prématuré des oscillations calciques affecte grandement la capacité de développement du futur embryon (Ducibella et al., 2002; Malcuit et al., 2006). Ceci est en accord avec les résultats de Jean-Pierre Ozil et ses collègues qui observent que le profil d'expression des gènes chez la souris dépend du nombre, mais aussi de la fréquence des vagues calciques (Ozil, Banrezes, Toth, Pan, & Schultz, 2006). Toujours chez la souris, les vagues calciques s'arrêtent normalement juste avant la formation des pronoyaux, probablement du fait de la séquestration de  $PLC\zeta$  dans ces derniers (Larman, Saunders, Carroll, Lai, & Swann, 2004).

## III. L'activation du génome embryonnaire (EGA)

Le transcriptome maternel correspond aux ARNm produits au cours de la croissance ovocytaire et stockés dans le cytoplasme de l'ovocyte. Sachant que la transcription est inhibée à partir de la maturation méiotique, ces ARNm seront utilisés pour produire les protéines nécessaires à la maturation ovocytaire, à la fécondation et à l'initiation du développement embryonnaire préimplantatoire. L'activation du génome embryonnaire correspond au moment où l'embryon devient transcriptionnellement actif, il ne dépend donc plus des transcrits maternels qui sont alors dégradés (Tora & Vincent, 2021). L'activation du génome embryonnaire se fait en deux vagues successives. La première, qui correspond à l'initiation du processus, est définie comme mineure et a lieu à la fin du stade zygote. La seconde, définie comme majeure, a lieu au stade deux-cellules tardif chez la souris et entre le stade quatre et huit-cellules chez l'Homme (Figure 26) mais

également chez le lapin, la vache, le mouton et le macaque (Jukam, Shariati, & Skotheim, 2017; Perry, Asami, Lam, & Yeo, 2022).



**Figure 26 : Chronologie du développement embryonnaire préimplantatoire et de l'activation du génome embryonnaire chez l'Homme et la souris.**

La durée du développement embryonnaire préimplantatoire est espèce dépendante. Le stade blastocyste est atteint environ 90 h après la fécondation chez la souris et nécessite 120 h de développement chez l'Homme. De plus, chez la souris, les premiers transcrits sont détectés dès le stade zygote et l'embryon devient transcriptionnellement autonome entre le stade deux et quatre-cellules, soit environ 30 h après la fécondation. Chez l'Homme, l'activation du génome embryonnaire est un peu plus tardive puisque les premiers transcrits sont détectés entre le stade zygote et le stade deux-cellules. L'activation du génome embryonnaire à proprement parler se déroule entre les stades quatre et huit-cellules, soit environ 55 h après la fécondation. Le dégradé de violet correspond à l'intensité de la transcription embryonnaire, le signe « 2\* » fait référence aux divisions asynchrones du deuxième cycle de division chez l'Homme. Figure d'après (Jukam et al., 2017).

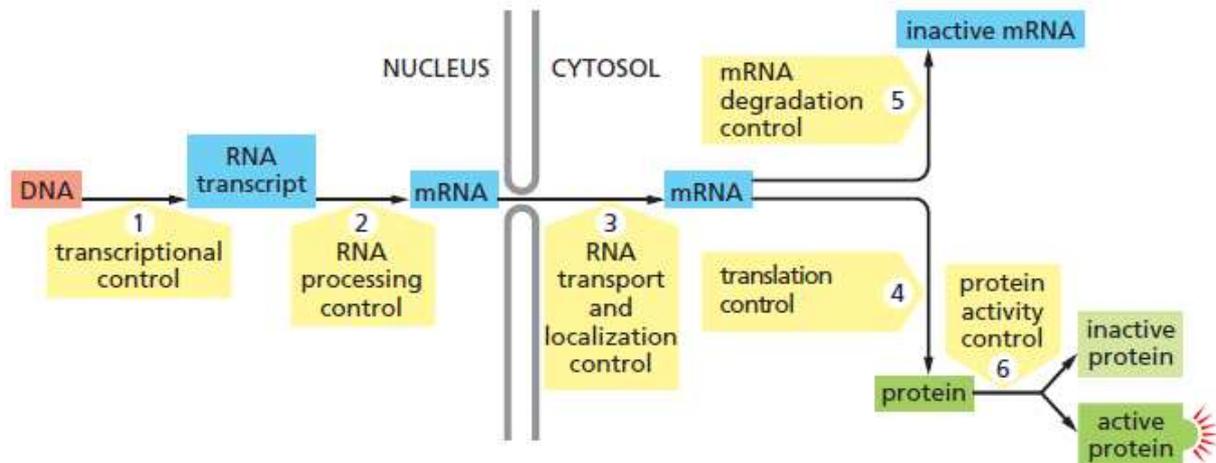
---

## Chapitre n°3 : la régulation de l'expression des gènes dans l'ovocyte

---

La base du fonctionnement d'un organisme dépend de la capacité de ses cellules à décoder l'information génétique qu'elles contiennent sous forme d'ADN afin de produire les protéines nécessaires à leur fonctionnement. La régulation de l'expression des gènes est le processus permettant de réguler la production de protéines spécifiques au moment où la cellule en a besoin et en quantité adéquate. Ainsi, la régulation de l'expression des gènes peut se faire à différents niveaux (Bustin, 2015), (Figure 27) :

- Au niveau de la transcription (quand les gènes sont-ils transcrits ?) qui dépend de facteur de transcription et de l'accessibilité de la chromatine.
- Au niveau de l'ARN qui subit des modifications dans le noyau (ajout d'une coiffe en 5' et d'une queue poly(A) en 3', retrait des introns par épissage).
- Au niveau du transport de l'ARN du noyau vers le cytoplasme.
- Au niveau du stockage et de la dégradation des ARN.
- Au niveau de la traduction des ARN.
- Au niveau des protéines par des mécanismes de modifications post-traductionnelle ou de dégradation.



**Figure 27 : La régulation de l'expression des gènes dans les cellules eucaryotes.**

Il existe différents niveaux de régulation de l'expression des gènes dans les cellules eucaryotes : au niveau de l'ADN (régulation de la transcription par des facteurs de transcription et par l'accessibilité de la chromatine), au niveau de l'ARN (modifications, transport, stockage, dégradation, traduction) et au niveau des protéines (modifications post-traductionnelles, dégradation). Figure d'après (Bustin, 2015)

## I. Le transcriptome maternel

### 1. Importance du transcriptome maternel

Le transcriptome maternel correspond aux ARNm produits et stockés dans les ovocytes. Ces ARNm sont synthétisés dans les ovocytes en croissance, période marquée par l'intensité de l'activité transcriptionnelle. A partir de la maturation méiotique, la transcription est arrêtée et le restera jusqu'à l'activation du génome embryonnaire. De ce fait, la maturation ovocytaire, incluant la régulation de l'arrêt méiotique, la maturation nucléaire et cytoplasmique, mais aussi la fécondation et le développement de l'embryon jusqu'à l'EGA, dépend entièrement du transcriptome maternel. D'ailleurs, l'ovocyte a la particularité de contenir des ARNm particulièrement stables et abondants. Chez la souris, les ovocytes contiennent environ dix fois plus d'ARNm que les cellules somatiques (Piko & Clegg, 1982) et ces ARNm ont une demi-vie très longue (environ 2.5 semaines, contre quelques heures dans les cellules somatiques) (Tora & Vincent, 2021). Le stockage des ARNm, leur traduction au moment opportun et la dégradation des transcrits qui ne sont plus utiles sont donc des processus essentiels à la formation d'ovules et d'embryons de qualité (Luong & Conti, 2019; Tora & Vincent, 2021).

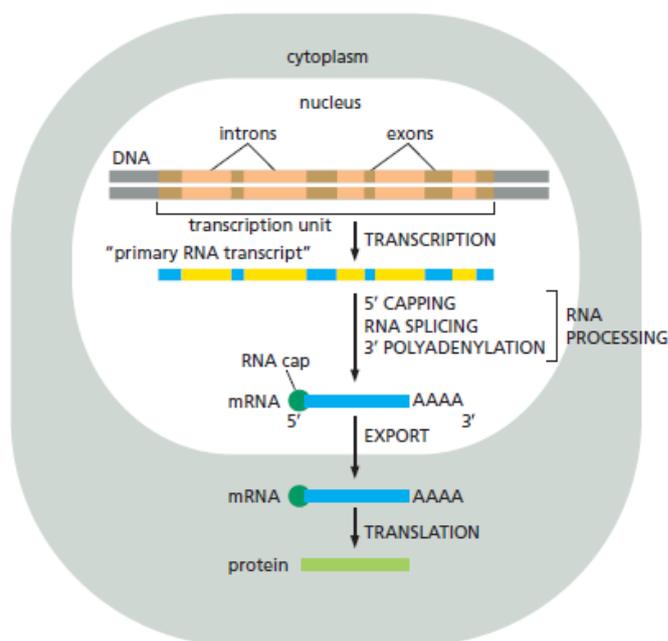
Les ARNm contiennent des éléments régulateurs appelés élément *cis* et souvent positionnés en région 3'UTR. Ces éléments peuvent être reconnus par des facteurs dits *trans* et incluant des RBP (RNA-Binding Proteins) ou des micro-ARN. La fixation de RBP à action *trans* sur les séquences *cis* des ARN forme les complexes ribonucléoprotéiques (RNP) qui participent à réguler une variété de mécanismes tels que le transport des ARNm ciblés, leur stabilité, leur dégradation ou leur traduction (Vejnar et al., 2019). Ces interactions sont permises par la présence, sur les protéines à action *trans*, de domaines de type RRM (RNA Recognition Motif), KH (K homology), Znf (zinc finger) ou RBD (RNA-Binding Domain) (Luong & Conti, 2019). Parmi les éléments *cis* présents sur les ARNm, les motifs U-rich participent à stabiliser les ARNm tandis que les éléments AU-Rich (ARE) et les éléments CCUC ou CCUG favorisent la dégradation des ARNm (Vejnar et al., 2019).

### 2. Synthèse et maturation des ARNm

La croissance ovocytaire est marquée par une forte augmentation du volume de l'ovocyte, conséquence de la synthèse et de l'accumulation des ARN et des protéines nécessaires à l'acquisition de la compétence développementale de l'ovule. Les protéines responsables de la synthèse d'ARN à partir d'ADN sont les ARN polymérase. En progressant le long de l'ADN, elles fabriquent un ARN pré-messager composé de ribonucléotides liés par des liaisons phosphodiester. La synthèse de cet ARN se fait dans le sens 5'-3'. L'initiation de la transcription nécessite l'assemblage d'un complexe protéique PIC (Pre-Initiation Complex) au niveau du promoteur. Dans les cellules somatiques, ce complexe est composé d'une protéine TBP (TATA-box Binding Protein) qui reconnaît la séquence d'ADN initiant la transcription (la boîte TATA) associée à 13 facteurs TAFs (TBP-Associated Factors). Dans les ovocytes de Vertébrés, TBP est exprimée jusqu'au stade de follicule primordial puis disparaît et est remplacée par son paralogue TBPL2 (TBP-Like 2). TBPL2 disparaît à son tour au moment de la maturation méiotique, lorsque la

transcription est inactivée (Tora & Vincent, 2021; C. Yu et al., 2020), (Figure 29). Cette protéine est essentielle à la croissance ovocytaire et son absence chez la souris induit un arrêt de la folliculogénèse avant la formation des follicules secondaires (Gazdag et al., 2009).

Au cours de leur élongation, les ARN pré-messagers sont modifiés par l'ajout, en 5', d'une coiffe 7-méthyl guanosine rapidement recouverte d'un complexe CBC (Cap-Binding Complex). La coiffe et le CBC protègent les ARN de la dégradation par les ribonucléases et seront nécessaires à leur export vers le cytoplasme et à leur traduction. La formation d'un ARNm mature nécessite des modifications supplémentaires ayant lieu dans le noyau et comprenant le retrait des introns par épissage et l'ajout d'une queue poly(A) à l'extrémité 3' (Bustin, 2015), (Figure 28). Chez les Mammifères, l'ajout de la queue poly(A) dans le noyau nécessite la fixation de CPSF (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor) sur la séquence AAUAAA en région 3'UTR, 10 à 30 nucléotides avant le site de clivage. Par son interaction avec CSTF (Cleavage-Stimulatory Factor), CPSF permet la coupure de l'ARNm. CPSF interagit alors avec PAP (Poly(A) Polymerase) qui catalyse l'ajout d'environ 200 résidus adénosine à l'extrémité 3' (J. Zhao, Hyman, & Moore, 1999). La queue poly(A) est ensuite protégée de la déadénylation par PABP (Poly(A)-Binding Protein) qui inhibe ainsi la dégradation de l'ARNm et assure sa stabilité (Luong & Conti, 2019).



**Figure 28 : Ensemble des mécanismes permettant la formation des protéines dans les cellules eucaryotes.**

Dans les cellules eucaryotes, l'ADN stocké dans le noyau est utilisé par l'ARN polymérase pour fabriquer un ARN simple brin au cours de la transcription. Cet ARN, alors qualifié d'ARN pré-messager, subit plusieurs modifications co et post-traductionnelles, incluant l'ajout d'une coiffe à l'extrémité 5', le retrait des introns par épissage et la polyadénylation de l'extrémité 3'. L'ARN devient alors un ARNm qui sera exporté vers le cytoplasme et utilisé pour la fabrication des protéines au cours de la traduction. Figure d'après (Bustin, 2015).

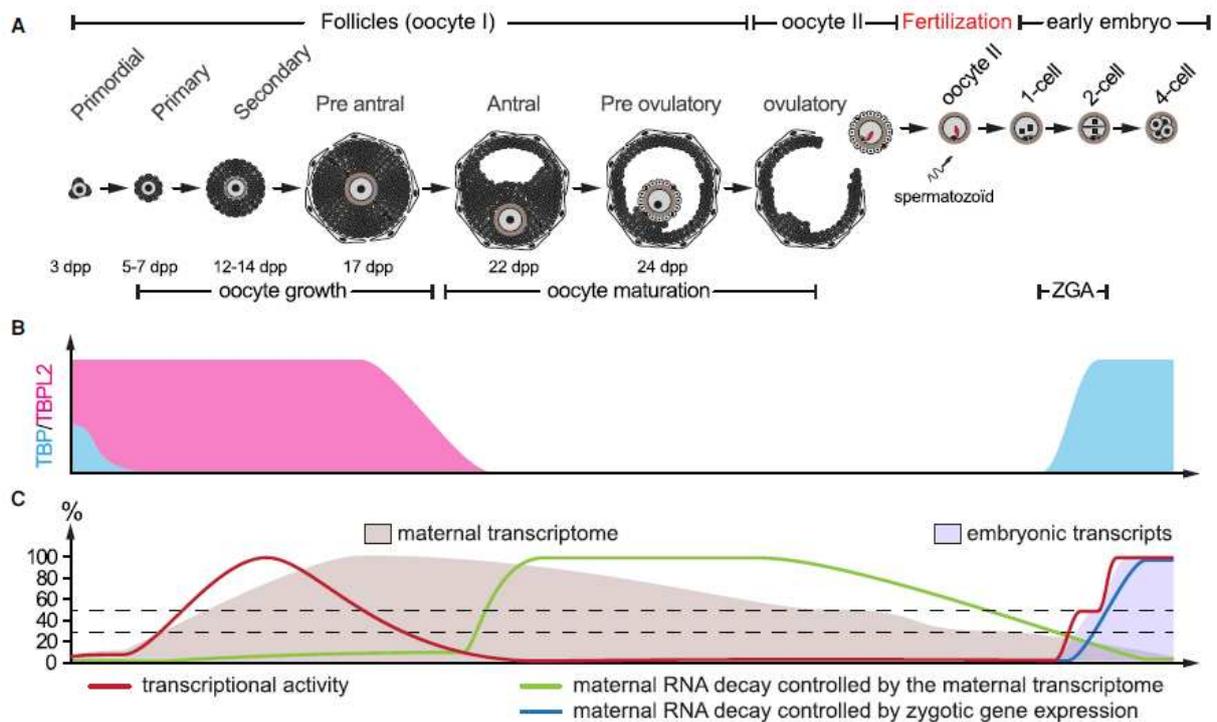
### 3. Le stockage des ARNm

Dans les cellules eucaryotes, les ARNm non traduits sont stockés dans des granules cytoplasmiques composés de complexes ribonucléoprotéiques. D'un diamètre d'environ 500 nm et dépourvus de membrane, ces granules forment des agrégats denses dans le cytoplasme. Parmi les différents types de granules cytoplasmiques existants, les p-bodies ou « processing bodies » sont les plus connus (Winata & Korzh, 2018). Ils se forment lorsque la concentration en ARNm augmente, par un phénomène appelé LLPT (Liquid-Liquid Phase Transition) au cours duquel les ARN et les protéines se condensent et forment des gouttelettes visqueuses (Standart & Weil,

2018). Présents dans les cellules somatiques et germinales, les p-bodies participent au stockage, à la dégradation et à l'inhibition de la traduction des ARNm. Chez la souris, ils sont présents dans les ovocytes en croissance puis disparaissent au moment de la maturation ovocytaire, ce qui coïncide avec l'arrêt de la transcription et l'utilisation des ARN maternels stockés (Flemr, Ma, Schultz, & Svoboda, 2010). La présence de protéines impliquées dans l'inhibition de la traduction (DDX6, EIF4E, CPEB1) est en accord avec le fait que les p-bodies soient en charge de stocker les ARNm en vue d'une traduction ultérieure. De plus, l'implication de ces granules cytoplasmiques dans la dégradation des ARN se traduit par la présence de protéines responsables du clivage de la coiffe et de la dégradation de l'ARNm (DCP1 et 2, XRN1, EDC3, LSM1-7) ou encore de facteurs de déadénylation (CCR4, PAN3). Les p-bodies contiennent également des facteurs impliqués dans des mécanismes d'extinction de gène par interférence à l'ARN (AGO1-4, GW182) (Standart & Weil, 2018; Winata & Korzh, 2018). Chez les Mammifères, l'assemblage des p-bodies nécessite DDX6, EIF4A et LSM14A (Ayache et al., 2015). L'absence de DDX6 chez la souris perturbe l'assemblage des p-bodies et rend les femelles infertiles avec un arrêt de la folliculogenèse au stade de follicule primordial (Kato et al., 2019).

#### 4. La dégradation des ARNm

Entre le début de la croissance ovocytaire et l'activation du génome embryonnaire, le transcriptome maternel connaît plusieurs vagues de dégradations intenses. La première vague concorde avec la maturation méiotique où environ 50 % des transcrits sont dégradés ; elle est régulée par des facteurs maternels. Une deuxième vague de dégradation des ARN maternels est induite par la fécondation, puis, l'intégralité des ARN maternels restant sera dégradée au cours de l'EGA et remplacée par les transcrits embryonnaires. Cette dernière vague de dégradation dépend cette fois de facteurs embryonnaires (Svoboda, Fulka, & Malik, 2017; Tora & Vincent, 2021). Ainsi, certains transcrits sont dégradés exclusivement par une machinerie maternelle ou exclusivement par une machinerie embryonnaire, d'autres sont dégradés par une action conjointe de l'activité maternelle et de l'activité zygotique (Walser & Lipshitz, 2011). Ces vagues de dégradation permettent de dégrader les transcrits qui ne sont plus nécessaires et qui pourraient être délétères. Elles sont associées à l'activation de la traduction d'autres ARNm, processus détaillé dans le chapitre « *Régulation de la traduction dans les ovocytes* ».



**Figure 29 : Etablissement et remodelage du transcriptome maternel chez la souris.**

La croissance ovocytaire (A) est caractérisée par une activité transcriptionnelle intense (C, ligne rouge) permise par l'abondance de TBP puis de TBPL2 (B), facteurs nécessaires à la formation d'ARN par l'ARN polymérase. Cette période est caractérisée par l'accumulation de transcrits qui forment le transcriptome maternel (C, zone beige). L'arrêt de la transcription au moment de la maturation ovocytaire est associé à une vague de dégradation des ARN maternel (C, ligne verte) et à la disparition de TBPL2, induisant une diminution du transcriptome maternel, phénomène amplifié par l'utilisation des transcrits stockés pour produire les protéines nécessaires au développement de l'ovocyte. Les ARN maternels restants seront dégradés au cours de la fécondation et de l'activation du génome embryonnaire (C, ligne bleue). L'embryon réalise alors sa propre transcription, ce qui se caractérise par l'accumulation des transcrits embryonnaires (C, zone violette). Figure d'après (Tora & Vincent, 2021).

La présence de la coiffe à l'extrémité 5' des ARNm et de la queue poly(A) à l'extrémité 3' participe à réguler la traduction des ARNm mais aussi leur stabilité. Ainsi, le clivage de la coiffe par le complexe DCP1/DCP2 et la déadénylation de l'extrémité 3' par le complexe PAN2/3 puis par CCR4-NOT rendent les ARN accessibles aux exoribonucléases telles que XRN1 (Svoboda et al., 2017; Tora & Vincent, 2021). Le rôle des RBP est primordial dans la régulation de la dégradation des ARNm car c'est par leur fixation sur des ARN cibles que certains complexes cités ci-dessus sont recrutés. Par exemple, la fixation de Smaug sur les ARN maternels contenant une séquence SRE (Smaug Recognition Element) permet de recruter le complexe de déadénylation CCR4-NOT. De plus, la reconnaissance des ARE par des protéines ARE-BP (ARE-Binding Protein) stimule le recrutement de différentes machineries responsables du clivage de la coiffe, de la déadénylation, ou de la dégradation des ARN par l'exosome ou des exoribonucléases (Walser & Lipshitz, 2011).

De plus, une voie de dégradation conduite par des facteurs maternels au cours de la maturation méiotique met en jeu la protéine MSY2 (Mouse Specific Y-box protein 2), une RBP avec

une action *trans*, qui, en se fixant en *cis* sur les ARNm, favorise leur stabilisation. Au cours de la maturation ovocytaire, l'activation de CDK1 induit, de façon directe ou indirecte, la phosphorylation de MSY2. La solubilité de MSY2 phosphorylée est alors modifiée ce qui déstabilise son interaction avec les ARNm qui perdent leur protection (Medvedev, Yang, Hecht, & Schultz, 2008; Svoboda et al., 2017).

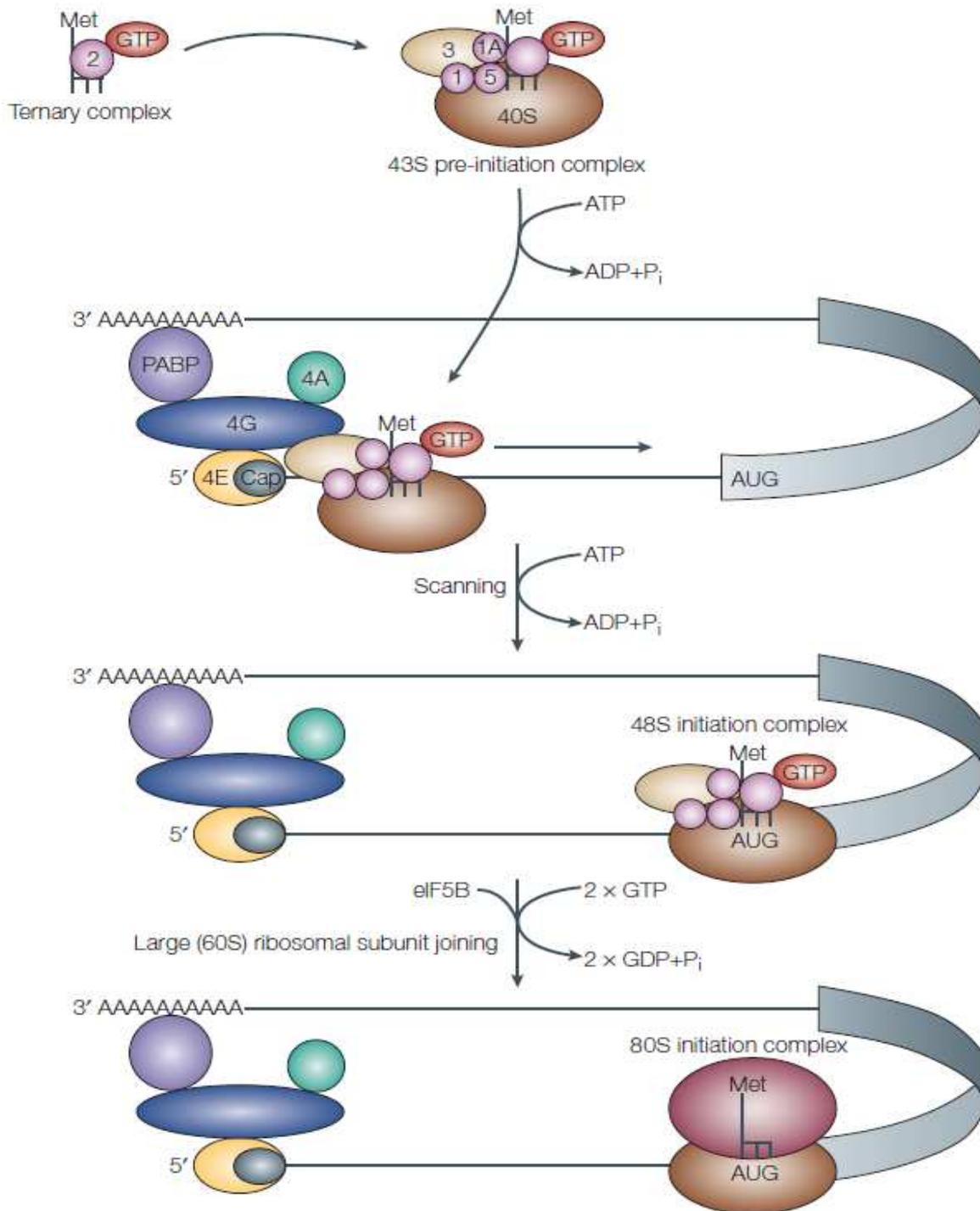
Lors de l'EGA, la dégradation des ARNm maternels par la voie des micro-ARN représente une voie de dégradation importante notamment chez le poisson zèbre via miR-430 et chez le xénope via miR-427, orthologue de miR-430 (Giraldez et al., 2006; Lund, Liu, Hartley, Sheets, & Dahlberg, 2009; Svoboda et al., 2017).

## II. Régulation de la traduction dans les ovocytes

### 1. L'initiation de la traduction dans les cellules eucaryotes

Une fois dans le cytoplasme des cellules eucaryotes, le CBC des ARNm est remplacé par le complexe EIF4F (Eukaryotic Initiation Factor 4F), trimère composé des facteurs EIF4E, EIF4G et EIF4A. La traduction des ARNm nécessite la formation du complexe d'initiation 43S composé du complexe EIF4F, du complexe ARNt initiateur (EIF2, ARNt-Met, GTP), du facteur d'initiation de la traduction eucaryote EIF3 et de la sous-unité 40S du ribosome. EIF4G est une protéine dite échafaudage (*scaffold protein*) car elle participe à l'assemblage d'autres protéines ce qui lui confère un rôle essentiel de régulation de la traduction. En plus de sa participation dans l'assemblage du complexe d'initiation 43S, EIF4G interagit avec PABP (ou ePAB (embryonic PABP) dans les ovocytes) positionnée sur la queue poly(A), ce qui permet de replier l'ARN et ainsi de rapprocher la région 3'UTR et ses éléments régulateurs de l'extrémité 5'. De cette façon, l'interaction entre PABP et EIF4G augmente l'efficacité de la traduction (Clarke, 2012) (Figure 30). L'initiation de la traduction est composée des étapes suivantes (Gebauer & Hentze, 2004; Mendez & Richter, 2001):

- Assemblage du complexe ARNt initiateur sur la sous-unité 40S du ribosome.
- Fixation du complexe EIF4F sur la région 5'UTR de l'ARNm par une interaction entre EIF4E et la coiffe.
- Recrutement de la sous-unité 40S du ribosome sur l'ARNm et formation du complexe d'initiation 43S sur l'ARN. L'interaction entre EIF4G et PABP permet de circulariser l'ARNm rapprochant ainsi les extrémités 3' et 5'. De plus, l'interaction entre EIF4G et EIF3 induit la formation d'un pont entre le complexe EIF4F et la sous-unité 40S du ribosome, elle-même en interaction avec EIF2-GTP.
- Le complexe 43S scanne l'ARNm dans la direction 5' → 3' jusqu'au codon d'initiation AUG.
- Hydrolyse du GTP, catalysée par EIF5B et libération de EIF3.
- Fixation de la sous-unité 60S du ribosome et formation du complexe 80S. Début de l'étape d'élongation.

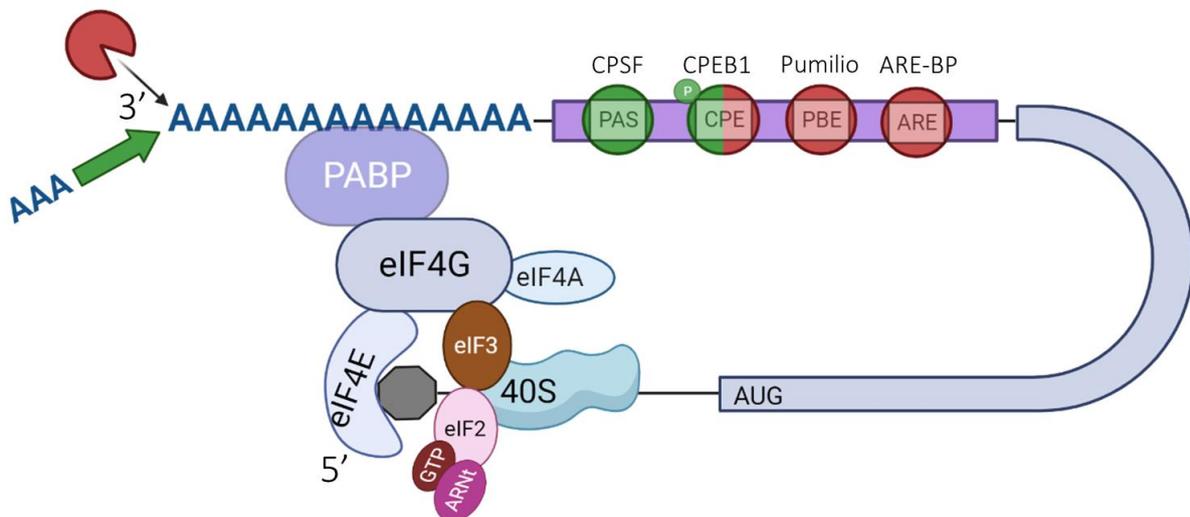


**Figure 30 : Représentation simplifiée de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes.**

L'assemblage du complexe ARNt initiateur et de EIF3 sur la sous-unité 40S du ribosome permet la formation du complexe de pré-initiation 43S, qui, une fois assemblé au complexe EIF4F (composé du trimère EIF4E-EIF4G-EIF4A) et lié à l'ARNm, formera le complexe d'initiation 43S. En interagissant avec EIF4E fixé à la coiffe de l'ARNm, et PABP fixé à la queue poly(A), EIF4G permet le rapprochement des extrémités 3' et 5' de l'ARNm. Le complexe d'initiation 43S scanne alors l'ARNm en direction de l'extrémité 3' et trouve le codon d'initiation AUG au niveau duquel EIF3 est libéré. L'assemblage de la sous-unité 60S à la sous-unité 40S forme le complexe 80S capable de procéder à l'élongation de la traduction. Figure d'après (Gebauer & Hentze, 2004).

## 2. Polyadénylation et traduction

Au cours de leur maturation dans le noyau, les ARNm des eucaryotes reçoivent une queue poly(A) ajoutée par une poly(A) polymérase nucléaire (PAP $\alpha$  et PAP $\gamma$  chez les Mammifères). Ils sont ensuite exportés vers le cytoplasme et la queue poly(A) est raccourcie par des enzymes dites déadénylases. Dans certaines cellules, et notamment dans les cellules nerveuses, les ovocytes et les embryons, la queue poly(A) peut être rallongée dans le cytoplasme par des poly(A) polymérases cytoplasmiques (GLD2 et GLD4 chez les Mammifères) (Clarke, 2012). Cette ré-expansion de la queue poly(A) est un élément de régulation de la traduction car la longueur de la queue poly(A) des ARNm détermine leur taux de traduction. Des expériences réalisées sur des embryons de poissons zèbres ont montré que l'activité traductionnelle est multipliée par 6 lorsque que la longueur de la queue poly(A) est doublée (Subtelny, Eichhorn, Chen, Sive, & Bartel, 2014). D'ailleurs, dans les ovocytes de Mammifères, les ARNm stockés ont une queue poly(A) courte et leur traduction est inhibée (Luong & Conti, 2019).



**Figure 31 : Régulation de l'initiation de la traduction dans les cellules eucaryotes.**

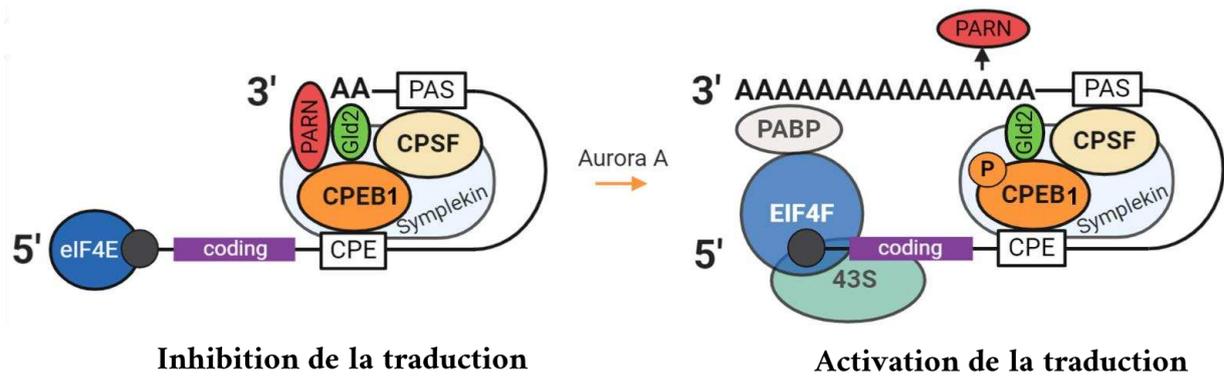
En se fixant sur la queue poly(A) des ARNm, PABP protège les ARNm contre la dégradation. De plus, en favorisant le recrutement de eIF3 et donc de la sous-unité 40S du ribosome, et en interagissant avec eIF4G, PABP favorise l'activation de la traduction. L'élongation de la queue poly(A), permettant la fixation de PABP, est donc un signal d'activation de la traduction. À l'inverse, le raccourcissement de la queue poly(A) est un signal de répression de la traduction. De plus, l'interaction entre PABP et eIF4G permet le repliement de l'ARNm, qui forme alors une structure en épingle à cheveux, rapprochant ainsi les extrémités 3' et 5'. Dans la région 3'UTR des ARNm, se trouvent des séquences sur lesquelles se fixent des protéines RBP qui participent à l'activation (vert : CPSF, CPEB1 phosphorylé) ou à la répression (rouge : CPEB1 non phosphorylé, Pumilio, ARE-BP) de la traduction. Figure inspirée de (M. Christou-Kent, Dhellemmes, Lambert, Ray, & Arnoult, 2020) et créée avec Biorender.

### 3. Protéines clés de la régulation de la traduction ovocytaire

#### 3.a. CPEB

Les protéines de la famille CPEB, composée de 4 membres (CPEB1-4) chez les Vertébrés, sont des RBP dont la région C-ter contient deux domaines RRM et un domaine Znf. CPEB1 et CPEB4 sont nécessaires à la maturation ovocytaire chez le xénope et CPEB1 est un acteur fondamental de la régulation de la traduction (Igea & Mendez, 2010). Chez le xénope, CPEB1 est abondant dans les ovocytes au stade GV et disparaît au cours de la GVBD (Marnef et al., 2010). En se fixant sur les séquences CPE (UUUUA(A)U) dans la région 3'UTR des ARNm, CPEB1 s'assemble avec d'autres protéines pour former des complexes et participe ainsi à réguler la polyadénylation et donc traduction de ces ARNm. Selon son état de phosphorylation, CPEB1 est responsable de l'activation ou bien de l'inhibition de la traduction des ARNm ciblés. Dans les ovocytes, CPEB1 contrôle la traduction de protéines clés de la maturation ovocytaire dont la Cycline B1 et C-MOS (Han et al., 2017; Stebbins-Boaz, Hake, & Richter, 1996). CPEB1 régule également la traduction de DAZL (Deleted-in Azoospermia Like), un autre régulateur de la traduction agissant à partir de la maturation méiotique, lorsque CPEB1 disparaît (J. Chen et al., 2011). De plus, chez le xénope, avant de disparaître, CPEB1 active CPEB4 qui participera également à prendre le relais dans la régulation de la traduction (Igea & Mendez, 2010). Chez la souris, l'absence de CPEB1 est responsable d'infertilité, les femelles ont des ovaires quasiment indétectables et dépourvus d'ovocyte, ce qui suggère que CPEB1 est nécessaire aux stades précoces de l'ovogenèse (Tay & Richter, 2001).

Le contrôle de la traduction par CPEB1 est décrit dans plusieurs revues : (M. Christou-Kent et al., 2020; Clarke, 2012; Reyes & Ross, 2016; Richter, 2007). CPEB1 se fixe sur la séquence CPE dans la région 3'UTR des ARNm et forme un complexe avec CPSF présent au niveau du site de polyadénylation AAUAAA (PAS). Initialement impliqué dans la coupure et la polyadénylation des pré-ARNm dans le noyau, CPSF est également impliqué dans la polyadénylation cytoplasmique et son interaction avec CPEB1 est stabilisée par la sympléchine. De plus, CPEB1 interagit avec la poly(A)-polymérase cytoplasmique GLD2 et la déadénylase PARN. L'activité de PARN étant supérieure à celle de GLD2, la queue poly(A) de l'ARNm ciblé est maintenue courte (20 à 40 résidus). Lors de la maturation ovocytaire, la phosphorylation de CPEB1, par la kinase Aurora A chez le xénope, et au niveau de la sérine 174, induit l'expulsion PARN du complexe ribonucléoprotéique. La polyadénylation médiée par GLD2 est alors maintenue et la queue poly(A) est allongée pour atteindre 200 à 250 résidus. L'élongation de la queue poly(A) permet la fixation de EPAB et son interaction avec EIF4G induit l'initiation de la traduction (**Figure 32**).



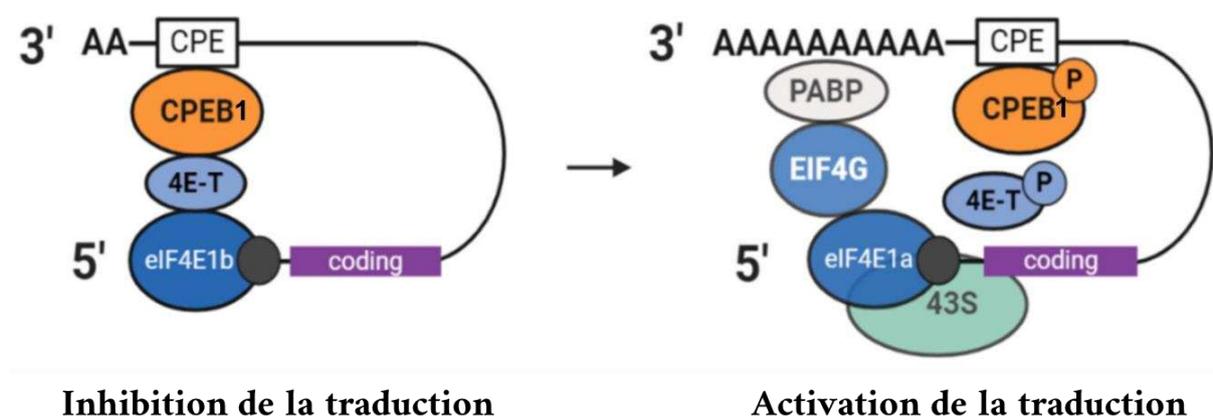
**Figure 32: Représentation simplifiée de la régulation de l'élongation de la queue poly(A) par CPEB1 chez le xénope.**

Dans son état non phosphorylé, la fixation de CPEB1 sur la séquence CPE des ARNm participe à l'inhibition de la traduction des ARN ciblés. Dans cette configuration, CPEB1 interagit avec PARN dont l'activité déadénylase, surpassant l'activité de GLD2, permet le maintien d'une queue poly(A) courte. Suite à la phosphorylation de CPEB1 par la protéine kinase Aurora A, PARN est expulsée du complexe et l'activité de GLD2 permet l'élongation de la queue poly(A). La fixation de PABP sur la queue poly(A) induit la formation du trimère EIF4F dans lequel EIF4E et EIF4G interagissent et permettent l'initiation de la traduction par le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome. Figure d'après (M. Christou-Kent et al., 2020).

Un autre mécanisme de régulation de la traduction par CPEB1 chez le xénope est basé sur la présence d'un facteur lié à CPEB1 et interagissant avec EIF4E de manière à bloquer l'interaction entre EIF4E et EIF4G. Ce facteur a d'abord été décrit comme étant la protéine Maskin (Stebbins-Boaz, Cao, de Moor, Mendez, & Richter, 1999) et agissant de la manière suivante (Mendez & Richter, 2001): lorsque la queue poly(A) est courte, Maskin, protéine associée à CPEB1, se fixe sur EIF4E en bloquant son interaction avec EIF4G, ce qui inhibe le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome et donc la traduction. Lorsque CPEB1 est phosphorylé, il recrute CPSF et la poly(A) polymérase ce qui permet l'élongation de la queue poly(A) et la fixation de PABP. L'interaction entre complexe PABP-EIF4G et EIF4E étant plus forte que l'interaction entre Maskin et EIF4E, le complexe PABP-EIF4G interagit avec EIF4E en prenant la place de Maskin et la traduction est initiée.

L'implication de Maskin dans ce mécanisme a été remise en question par Marilyn Kozak pour deux raisons majeures (Kozak, 2006). Premièrement, l'affinité entre Maskin et EIF4E est faible (Stebbins-Boaz et al., 1999). Secondement, les protéines TACCs (Transforming Acidic Coiled Coil domain), orthologues de Maskin chez les Mammifères, le nématode et la drosophile, n'ont pas de motif de fixation à EIF4E (de Moor, Meijer, & Lissenden, 2005). De ce fait, il semblerait que l'interaction entre CPEB1 et EIF4E passe par un autre intermédiaire, possiblement 4E-T (EIF4E transporter) chez le xénope et son homologue Clast4 chez la souris (Kang & Han, 2011; Villaescusa et al., 2006). EIF4E et Clast4 sont tous deux exprimés dans les ovocytes et phosphorylés lors de la maturation méiotique (Minshall, Reiter, Weil, & Standart, 2007; Villaescusa et al., 2006). De plus, 4E-T interagit avec CPEB1 et EIF4E (Minshall et al., 2007) et participe à la formation des p-bodies via son interaction avec DDX6 (Standart & Weil, 2018). Ces résultats vont dans le sens que 4E-T

participe à l'inhibition de la traduction en bloquant l'interaction entre EIF4E et EIF4G. Lors de la maturation méiotique, la phosphorylation de CPEB1 et 4E-T, par des kinases dont l'identité est controversée, permet de libérer EIF4E qui peut alors interagir avec EIF4G (M. Christou-Kent et al., 2020; Kang & Han, 2011), (Figure 33).



**Figure 33 : Représentation simplifiée de la régulation de la traduction par CPEB1 chez le xénope, proposition d'un modèle impliquant 4E-T.**

En interagissant avec CPEB1 et EIF4E, 4E-T bloque l'interaction entre EIF4E et EIF4G ce qui inhibe la traduction. Lors de la maturation méiotique, la phosphorylation de CPEB1 et 4E-T libère l'accès à EIF4E qui peut alors interagir avec EIF4G pour initier la traduction. Figure d'après (M. Christou-Kent et al., 2020).

### 3.b. *DAZL, Pumilio et EPAB*

DAZL (Deleted-in Azoospermia Like) est également une RBP exprimée dans les ovocytes et dans les embryons jusqu'au stade zygote. Au cours de la maturation ovocytaire, l'expression de DAZL est augmentée, à l'inverse de CPEB1 qui diminue (J. Chen et al., 2011). Chez la souris, DAZL est essentielle à la différenciation des cellules germinales primordiales et son absence est responsable d'infertilité chez les mâles et les femelles (Y. Lin & Page, 2005). De plus, l'inhibition de DAZL dans les ovocytes à partir du stade GV perturbe la maturation ovocytaire et notamment la formation du fuseau méiotique (J. Chen et al., 2011). Chez l'Humain, des mutations du gène *DAZL* peuvent perturber son interaction avec les autres protéines et affecter la fertilité des hommes et des femmes, avec notamment une insuffisance ovarienne précoce chez les femmes (Luong & Conti, 2019; Tung et al., 2006). En se fixant sur les séquences UUU[C/G]UUU mais aussi sur d'autres séquences riches en U, DAZL participe à réguler la traduction de nombreux ARNm (Luong & Conti, 2019). La clé de la régulation de la traduction par DAZL passe par son interaction avec PABP ou EPAB (Brook, Smith, & Gray, 2009).

Les protéines PUF (Pumilio-Family), regroupant PUM1 et PUM2 chez les Mammifères, sont des RBP qui reconnaissent les séquences PBE (Pumilio-Binding Element) dans la région 3'UTR des ARNm. Chez la souris, PUM1 est faiblement exprimée dans les ovocytes, à l'inverse de PUM2 dont la traduction est augmentée au cours de la maturation ovocytaire (J. Chen et al., 2011). La fixation des protéines PUF sur le PBE (UGUANAUA où « N » représente n'importe quelle base) induit le

recrutement du complexe CCR4-POP2-NOT responsable de la déadénylation de l'ARNm. La queue poly(A) est ainsi raccourcie ce qui inhibe la traduction de l'ARNm ciblé (Susor & Kubelka, 2017).

Un autre mécanisme de régulation de la traduction par PUM2 dans les ovocytes de Vertébrés passe par la formation d'un complexe PUM2-DAZL-EPAB et permet de réguler la traduction de l'ARN *Ringo* (Rapid Inducer of G2-M in Oocytes), homologue de *Spy* chez la levure. Au stade GV, PUM2 est fixé sur le PBE en 3' de l'ARNm ce qui forme un complexe PUM2-DAZL-EPAB à l'origine de l'inhibition de la traduction. Lors de la maturation ovocytaire et sous l'effet d'hormones (progestérone ou LH selon les espèces), PUM2 se dissocie et le complexe DAZL-EPAB restant active la traduction de *Ringo/Spy* (Brook et al., 2009; Esencan, Kallen, Zhang, & Seli, 2019), (Figure 34). RINGO/Spy participe alors à l'activation de CDK1 (membre du MPF) et à la phosphorylation et donc à l'activation de CPEB1 (Padmanabhan & Richter, 2006).

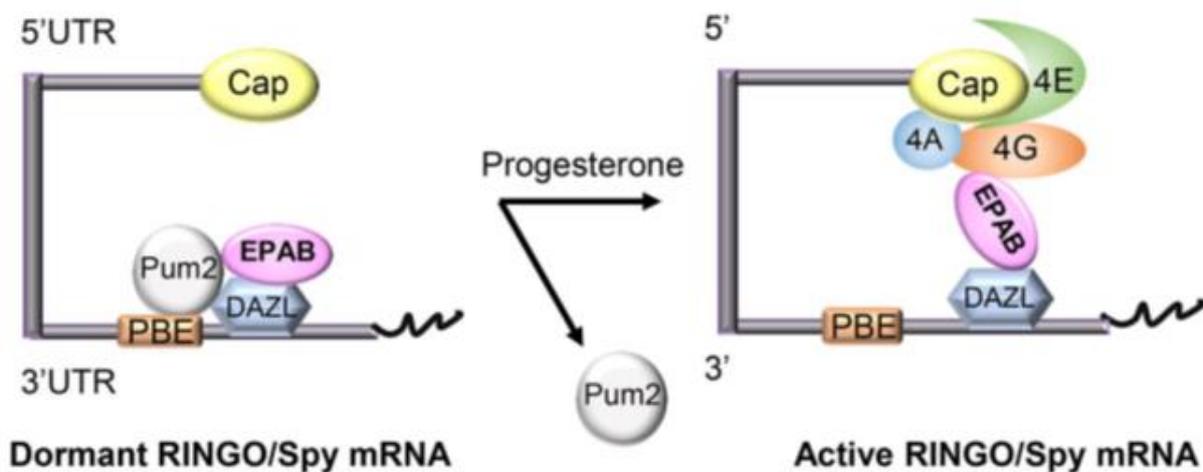


Figure 34 : Régulation de la traduction de *Ringo/Spy* par le complexe PUM2-DAZL-EPAB au cours de la maturation ovocytaire.

Dans les ovocytes en prophase I, la fixation, sur le site PBE en région 3'UTR de l'ARNm *Ringo/Spy*, de PUM2 associée à DAZL et EPAB, inhibe la traduction de l'ARNm. Lors de la maturation ovocytaire et sous l'effet de la LH ou de la progestérone, PUM2 se dissocie et le complexe DAZL-EPAB participe à l'activation de la traduction de *Ringo/Spy*. Figure d'après (Esencan et al., 2019).

### 3.c. Musashi

Les protéines Musashi (MSI), existant sous la forme de deux homologues chez les Vertébrés (Musashi-1 et Musashi-2) sont des RBP avec deux domaines RRM en région N-ter. Musashi-1 contient également un domaine d'interaction avec PABP en région C-ter et interagit avec PABP dans les cellules somatiques et EPAB dans les ovocytes. Musashi-1 a d'abord été identifiée comme étant un répresseur de la traduction dans les cellules nerveuses, par un mécanisme de compétition avec EIF4G pour sa fixation au niveau du 1<sup>er</sup> RRM de PABP (Kawahara et al., 2008). Ainsi, l'interaction Musashi1-PABP bloque l'interaction EIF4G-PABP, ce qui empêche le recrutement des ribosomes.

Bien que le mécanisme d'action ne soit pas caractérisé, Musashi participe également à l'activation de la traduction (Charlesworth, Wilczynska, Thampi, Cox, & MacNicol, 2006). L'activation de Musashi via sa phosphorylation est dépendante de RINGO et de la kinase CDK1. Une fois activée, Musashi permet la régulation de la traduction d'ARNm clés de la maturation ovocytaire dont *c-Mos* et active la voie de signalisation des MAP kinase kinase kinase qui participe à la phosphorylation de Musashi elle-même, formant alors une boucle de rétro-contrôle positif (Cragle et al., 2019).

### 3.d. DDX6 (*DHH1/xP54/RCK*)

DDX6 (DEAD-Box Helicase 6) appartient à la famille des hélicases, enzymes clés du métabolisme des ARN, impliquées dans l'épissage des ARN pré-messagers, dans le transport des ARNm, mais aussi dans leur traduction, leur stockage ou leur dégradation. DDX6 est fortement exprimée dans les ovocytes de souris et persiste dans les embryons jusqu'au stade blastocyste (K. Matsumoto, Kwon, Kim, & Akao, 2005). Comme indiqué précédemment, l'absence de DDX6 chez la souris perturbe l'assemblage des p-bodies et rend les femelles infertiles avec un arrêt de la folliculogénèse au stade de follicule primordial (Kato et al., 2019).

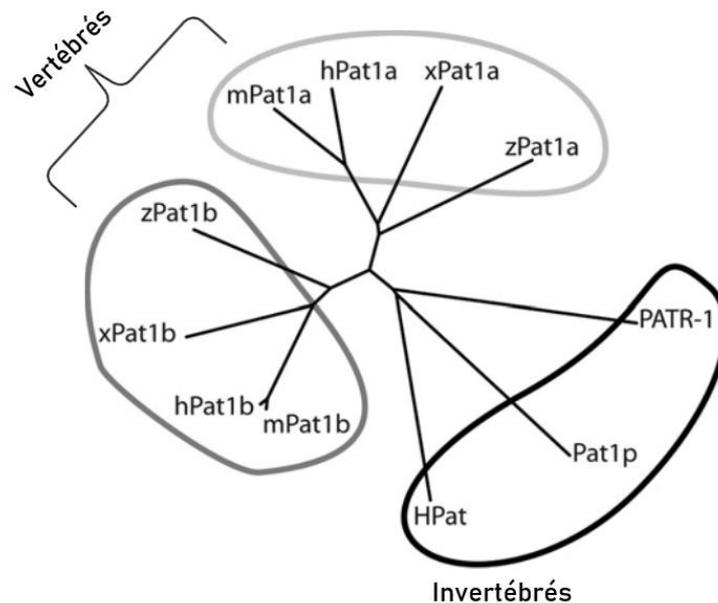
Dans les ovocytes transcriptionnellement actifs, DDX6 est présent dans le cytoplasme et dans le noyau, localisations validées par la présence d'une séquence NLS (Nuclear Localization Signal) et d'une séquence NES (Nuclear Export Signal) dans sa région N-ter. Dans le noyau, DDX6 se fixe sur les ARNm nouvellement fabriqués et participe à leur export. Dans le cytoplasme, DDX6 se fixe sur les ARNm non traduits, en compagnie d'autres protéines, dont MSY2 (Weston & Sommerville, 2006). De plus, chez le xénope, DDX6 interagit avec d'autres acteurs de régulation de la traduction, dont CPEB, RAP55 (LSM14), EIF4E et 4E-T et PATL2 (Minshall et al., 2007). Enfin, DDX6 participe à la dégradation des ARNm via son interaction avec le complexe de déadénylation CCR4-NOT (Ozgun et al., 2015).

### 3.e. MSY2/*FRGY2/YBX2*

MSY2 (Y-box binding protein 2), appelée FRGY2 chez le xénope, est une protéine ovocytaire particulièrement abondante dans les ovocytes en croissance, et dont la quantité diminue à partir de la fécondation. Son absence chez la souris est responsable d'infertilité des mâles et des femelles, ces dernières produisent des ovocytes qui se développent plus lentement et qui présentent des défauts de maturation avec notamment la formation de fuseaux méiotiques anormaux, une réduction des modifications de la chromatine caractéristiques du passage de NSN à SN et une absence ou un retard du blocage de la transcription. De plus, l'abondance des transcrits, leur stabilité et leur polyadénylation sont fortement altérés (Medvedev, Pan, & Schultz, 2011; J. Yang, Morales, Medvedev, Schultz, & Hecht, 2007). Comme indiqué précédemment, dans son état non phosphorylé, MSY2 se fixe sur les ARNm et inhibe leur dégradation. Chez le xénope FRGY2/MSY2 contribue à inhiber la traduction des ARNm sur lesquels elle se fixe et interagit, par l'intermédiaire de l'ARNm ciblé, avec le complexe formé par CPEB1, DDX6 (XP54), PAT1A, RAP55 (LSM14), EIF4E et 4E-T (K. Matsumoto, Meric, & Wolffe, 1996; Minshall et al., 2007).

#### 4. Les protéines de la famille PAT1

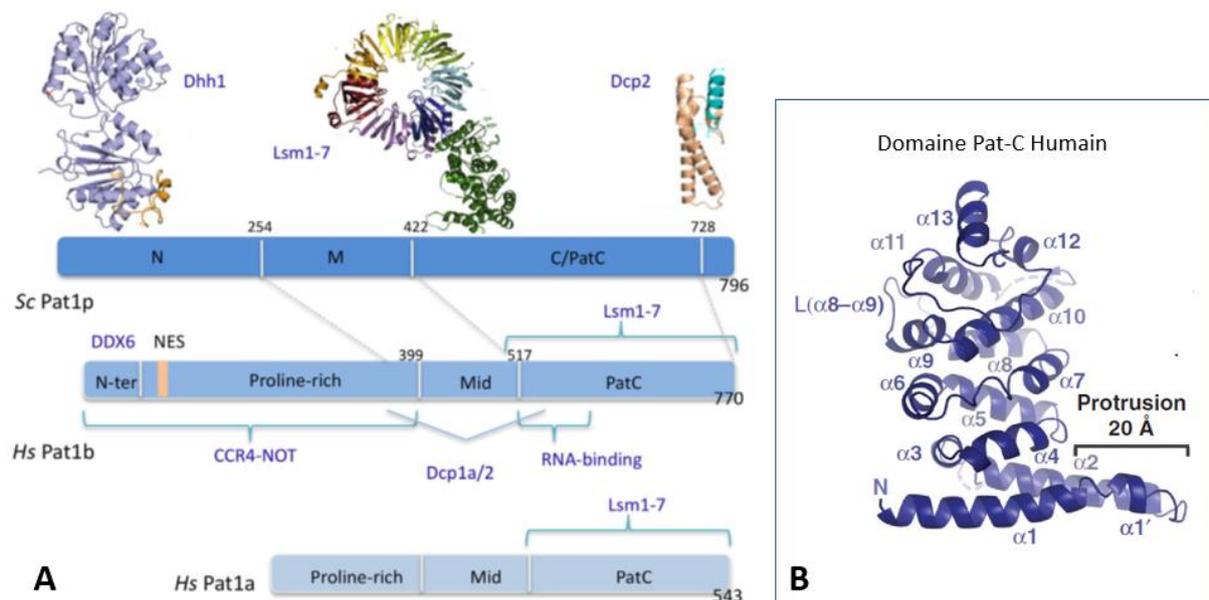
Les protéines PAT1 (Protein Associated with Topoisomerase II) sont des RBP impliquées dans la régulation post-traductionnelle de l'expression de gènes, et retrouvées uniquement chez les eucaryotes (Standart & Marnef, 2012). Chez les Invertébrés et notamment chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les protéines PAT1 existent sous une forme unique appelée PAT1P. Chez les Vertébrés, PAT1 existe sous forme de deux paralogues : PAT1A (ou PATL2) et PAT1B (ou PATL1) (Figure 35).



**Figure 35 : Evolution des protéines de la famille PAT1.**

Les Invertébrés contiennent une protéine PAT1 unique, appelée PAT1P chez *Saccharomyces cerevisiae*, HPAT chez *Drosophila melanogaster* et PATR-1 chez *C. elegans*. Chez les Vertébrés, les protéines PAT1 ont évolué pour former deux familles : PAT1A et PAT1B. Les préfixes z, x, h, m permettent de différencier les différents orthologues, respectivement chez les espèces *Danio rerio* (poisson-zèbre), *Xenopus laevis*, *Homo sapiens* et *Mus musculus*. Figure d'après (Marnef & Standart, 2010).

Les protéines de la famille PAT1 interagissent avec la topoisomérase II, enzyme capable de réaliser des coupures double-brins de l'ADN, nécessaires, entre autres, au passage des ADN et ARN polymérase. Ces protéines PAT1 sont dites « scaffold » car elles interagissent à la fois avec les ARNm et avec d'autres protéines et participent à réguler la dégradation et la traduction de ces ARNm. Elles contiennent une région N-ter riche en prolines et une région C-ter séparée en deux régions, une région dite « Mid » et une région « Pat-C ». La région N-ter s'associe à DDX6/Xp54/DHH1 et participe à la déadénylation des ARNm en recrutant CCR4-NOT. La région C-ter, quant à elle, participe à l'interaction avec LSM1-7 et DCP2 qui catalysent la dégradation de la coiffe. Elle contient également 13 hélices alpha enroulées sur elles-mêmes, formant ainsi une super hélice qui participe à la fixation de PAT1 aux ARNm (Figure 36). En revanche, le site de fixation des protéines PAT1 sur les ARNm n'a pas été identifié (Braun et al., 2010; Vindry, Weil, & Standart, 2019).



**Figure 36 : Structure des protéines de la famille PAT1.**

A : représentation des domaines d'interaction des protéines PAT1 avec les protéines partenaires.

B : représentation de la structure de la région « Pat-C » localisée en C-ter de PAT1B chez l'humain. Cette région est composée de 13 hélices alpha responsables de l'interaction de PAT1B avec les ARNm. Figures d'après (Braun et al., 2010; Vindry et al., 2019).

#### 4.a. Les protéines PAT1 chez les Invertébrés

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'absence de PAT1P résulte en une altération de la croissance des levures et à une mauvaise ségrégation des chromosomes au cours de la mitose et de la méiose (X. Wang, Watt, Louis, Borts, & Hickson, 1996). De plus, l'absence de cette protéine altère la formation des p-bodies et le retrait de la coiffe des ARNm (Coller & Parker, 2005). Cela reflète le rôle de PAT1P qui reconnaît les transcrits polyadénylés ou non, et participe à la formation des p-bodies, au retrait de la coiffe des ARNm et à l'inhibition de la traduction. La régulation de ces fonctions est médiée par des interactions protéiques impliquant PAT1P et des acteurs clés du retrait de la coiffe (DCP1-2, DHH1 et LSM1-7) (Coller & Parker, 2004, 2005). De plus, des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que PAT1P interagit avec des ARNm ciblés par EIF4E, EIF4G et PAB1P (équivalent de PABP chez la levure), signifiant que PAT1P s'associe à des ARNm traductionnellement actifs (Tharun & Parker, 2001).

#### 4.b. Les protéines PAT1 chez les Vertébrés

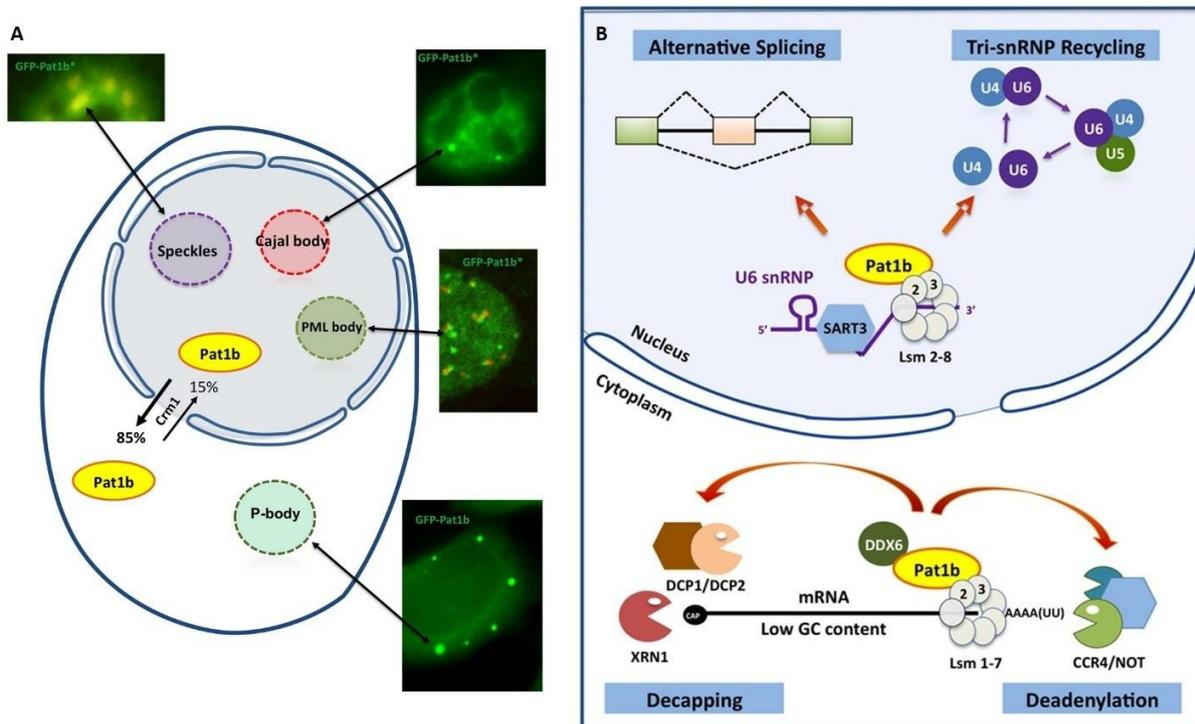
Chez les Vertébrés, il existe deux familles de protéines PAT1 : les protéines PAT1A (également appelées PATL2 chez l'Humain et P100 chez le xénope) et PAT1B (également appelées PATL1 chez l'Homme). Chez le xénope, xPAT1A et xPAT1B ont toutes les deux une localisation cytoplasmique, mais diffèrent en termes de profil d'expression. Alors que xPAT1A est exprimée dans les stades précoces de l'ovogenèse et disparaît en même temps que CPEB1 au cours de la GVBD, xPAT1B apparaît au cours de la GVBD et persiste dans les embryons (Marnef et al., 2010). De plus, chez l'Humain, hPAT1B est exprimée dans les tissus somatiques, dans lesquels hPAT1A est souvent

absente (Scheller et al., 2007). Ainsi, chez les Vertébrés, les protéines de la famille PAT1 ont évolué en une forme somatique (PAT1B/PATL1) et une forme germinale (PAT1A/PATL2) ayant des fonctions différentes. En effet, PAT1B participe principalement à la dégradation des ARNm alors que PATL2 est tout d'abord un répresseur de la traduction (Marnef et al., 2010; Standart & Marnef, 2012).

#### *4.c. Rôle de PAT1B/PATL1 dans la dégradation des ARNm*

Des études réalisées sur des lignées cellulaires de Mammifères ont montré que PATL1 participe à la formation des p-bodies et est fortement enrichie dans ces structures, ce qui n'est pas le cas de PATL2 (Marnef et al., 2010; Scheller et al., 2007). D'ailleurs, PATL1 interagit avec DDX6, protéine essentielle à la formation des p-bodies (Ozgur & Stoecklin, 2013). De plus, le rôle de PATL1 dans la dégradation des ARNm, et notamment ceux enrichis en bases A/U, est médié par ses interactions avec des protéines partenaires responsables de la déadénylation des ARNm (CCR4-CAF1-NOT) et du retrait de la coiffe (DCP1-DCP2, LSM1) (Ozgur, Chekulaeva, & Stoecklin, 2010).

En 2012, Aline Marnef et ses collègues ont observé la présence d'une séquence d'exportation nucléaire (NES) sur PATL1. Aussi, dans les cellules HeLa, l'inhibition de CRM1, récepteur impliqué dans le transport de protéines du noyau vers le cytoplasme, induit une rétention de PATL1 dans le noyau. Dans le noyau, PATL1 est localisée dans des granules riches en composants nécessaires à l'épissage et notamment le facteur d'épissage SC-35 (Marnef, Weil, & Standart, 2012). De plus, PAT1B interagit avec tri-snRNP, des petites particules ribonucléoprotéiques nucléaires qui s'associent aux pré-ARNm, eux-mêmes associés avec d'autres protéines, dont les protéines LSM et SART3 qui participent à la formation du spliceosome (Vindry et al., 2019). Ces résultats, associés aux altérations d'épissage observées après délétion de PATL1 dans les cellules HeLa et à l'identification d'un complexe nucléaire PATL1-LSM2-8, vont dans le sens d'une implication de PATL1 dans les mécanismes d'épissage (Vindry et al., 2017).



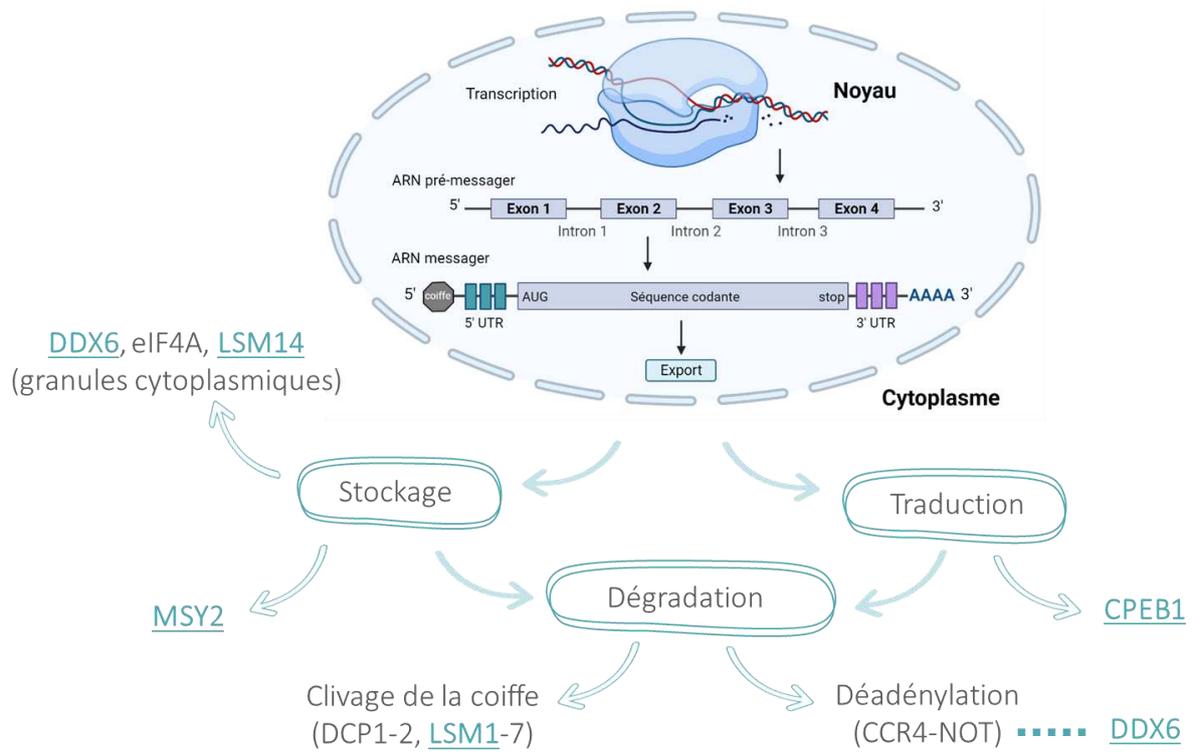
**Figure 37 : Dualité de fonction de PAT1B dans le cytoplasme et le noyau.**

A : PAT1B est une protéine majoritairement cytoplasmique qui participe à la formation des p-bodies dans lesquels elle est fortement enrichie. Dans les cellules HeLa, l'inactivation du transport des protéines du noyau vers le cytoplasme restreint PAT1B dans le noyau où elle participe à la formation de granules, dont les granules d'épissage (Speckles), les corps de Cajal et les corps nucléaires (PML bodies). B : implication de PAT1B dans l'épissage des pré-ARNm dans le noyau et dans la dégradation des ARNm dans le cytoplasme. Figure d'après (Vindry et al., 2019).

#### 4.d. Rôle de PAT1A/PATL2 dans la répression de la traduction

Contrairement à PATL1, PATL2 ne semble pas impliquée dans la dégradation des ARNm, n'est pas enrichie dans les p-bodies et n'a pas de localisation nucléaire (Marnef et al., 2010; Marnef et al., 2012; Ozgur et al., 2010; Scheller et al., 2007). Chez le xénope, PATL2 est localisée dans le cytoplasme et est exprimée spécifiquement dans les ovocytes. Tout comme CPEB1, PATL2 est rapidement dégradée à partir de la GVBD induite par la progestérone. En 2010, la publication d'un article dans le journal *developmental biology* a permis de mieux comprendre le fonctionnement de PATL2 dans les ovocytes de xénopes. Dans cet article, les auteurs ont montré que la surexpression de PATL2 dans les ovocytes ne perturbe pas le taux de traduction globale mais diminue la traduction de certains ARNm rapporteurs, précédemment injectés dans les ovocytes. De plus, des expériences de co-immunoprécipitation suivies de Western Blot, ont permis d'identifier des interactions entre les protéines PATL2 et CPEB1, Xp54 (DDX6), xRAP55 (LSM14), 4E-T et FRGY2 (MSY2). Ces protéines sont des acteurs clés de la régulation des ARNm (Figure 38). Aussi, les ARNm de la *Cycline B1*, *c-Mos* et *Ringo* co-précipitent avec PATL2, levant ainsi l'hypothèse que PATL2 participe à réguler leur traduction. D'ailleurs, l'injection d'ARNm de *Patl2* dans les ovocytes altère leur capacité de maturation et induit une diminution de la quantité des protéines C-MOS et de la Cycline B1 (Y. Nakamura et al., 2010). Sachant que, chez le xénope, la

traduction de *Cycline B1* et de *c-Mos* dépend de CPEB1 (Stebbins-Boaz et al., 1996), on peut penser que PATL2 collabore avec CPEB1 dans la régulation d'ARNm importants pour la maturation ovocytaire.



**Figure 38 : Les partenaires de PATL2 chez le xénope : des acteurs de la régulation des ARNm.**

Produits dans le noyau des cellules eucaryotes, les ARN pré-messagers subissent plusieurs modifications (retrait des introns par épissage, ajout d'une coiffe en 5' et d'une queue poly(A) en 3') avant de former des ARN messagers. Les ARNm sont alors exportés dans le cytoplasme où ils seront stockés ou traduits. Le stockage des ARNm se fait dans des granules cytoplasmiques, notamment les p-bodies dont la formation dépend de DDX6, eIF4A et LSM14. De plus, les ARNm stockés sont stabilisés et protégés par MSY2. La traduction des ARNm est finement régulée et l'un des acteurs de cette régulation est CPEB1. Lorsqu'ils ne sont plus nécessaires, les ARNm sont dégradés, ce qui nécessite le clivage de la coiffe par les complexes DCP1-2 et LSM1-7, et le raccourcissement de la queue poly(A) par le complexe CCR4-NOT, lui-même en interaction avec DDX6. Les protéines DDX6, LSM14, MSY2, LSM1 et CPEB1 (en bleu), acteurs clés de la régulation des ARNm, sont des partenaires de PATL2 chez le xénope. Figure créée avec Biorender.

Chez la souris, la protéine PATL2 est présente dans les follicules à partir du stade primaire et est maximale dans les follicules secondaires. Contrairement à son orthologue chez le xénope qui disparaît lors de la GVBD, PATL2 persiste dans les ovules MII de souris, suggérant une fonction plus tardive chez cette espèce. Des expériences d'immunofluorescence analysées en microscopie confocale, ont montré que, dans les follicules secondaires de souris, PATL2 ne colocalise pas avec CPEB1, DDX6 ni MSY2 (M. Christou-Kent et al., 2018).

---

## Chapitre n°4 : La qualité ovocytaire

---

### I. Importance de l'ovocyte dans le développement embryonnaire

La spermatogenèse et l'ovogenèse sont des processus complexes hautement régulés. De nombreux facteurs peuvent perturber ces mécanismes et conduire à la formation de gamètes anormaux dont la compétence développementale est réduite. Dans un parcours d'assistance médicale à la procréation, la sélection des ovules et des spermatozoïdes de meilleure qualité permet d'augmenter les chances d'obtenir un embryon capable de se développer et de former un nouvel individu en bonne santé. L'objectif de ce chapitre est de définir les paramètres et les méthodes utilisés pour évaluer la qualité des ovules, la qualité des spermatozoïdes ne sera pas traitée.

### I. Qu'est-ce qu'un ovule de qualité ?

#### 1. Le complexe cumulo-ovocytaire

Le Complexe Cumulo-Ovocytaire (CCO) correspond à l'ovocyte entouré de ces cellules folliculaires. Au cours de la folliculogenèse, les nombreuses interactions présentes entre l'ovocyte et ses cellules folliculaires environnantes sont indispensables au développement du follicule et à la maturation de l'ovocyte. En effet, la présence des cellules du cumulus est essentielle au maintien de l'arrêt méiotique en prophase I et la fermeture des jonctions communicantes en réponse au pic de LH est une étape indispensable à l'ovulation. Les interactions au sein du complexe cumulo-ovocytaire sont bi-directionnelles : les cellules du cumulus apportent des facteurs nécessaires au développement de l'ovocyte (par exemple le ligand kit) et l'ovocyte sécrète des substances permettant la prolifération, la différenciation (GDF9, BMP15) ou la mucification (CEEFs, Cumulus-Expansion Enabling Factors) des cellules du cumulus (Gilchrist et al., 2008).

##### *1.a. Morphologie du complexe cumulo-ovocytaire*

Sachant que les cellules du cumulus sont retirées avant toute ICSI, l'étude du complexe cumulo-ovocytaire dans l'évaluation de la qualité ovocytaire est sans risque pour le développement du futur embryon. L'observation du complexe cumulo-ovocytaire au moment de son prélèvement est un outil intéressant puisqu'il semblerait y avoir une corrélation entre la taille du follicule et la qualité de l'ovocyte associé. Plusieurs équipes ont observé une augmentation du taux d'ovules immatures dans les plus petits follicules (volume d'aspiration < 2 ml ou diamètre du follicule < 12.5 mm) et donc une diminution du taux de fécondation de ces ovules (T.-F. Lee et al., 2010; Mehri et al., 2014; Mohr-Sasson et al., 2020; Rosen et al., 2008; Shapiro et al., 2022). Cependant, la qualité des embryons obtenus n'est pas significativement différente (T.-F. Lee et al.,

2010; Mehri et al., 2014) suggérant que lorsque la maturité de l'ovule est atteinte, la taille du follicule n'impacte pas la compétence développementale du gamète (Mohr-Sasson et al., 2020).

#### 1.b. Apoptose des cellules folliculaires

Chez la femme, l'augmentation du taux d'apoptose des cellules du cumulus est associée à une mauvaise maturation ovocytaire, une altération de la qualité des embryons obtenus après fécondation *in vitro* et a une diminution du taux de grossesse (Bencomo et al., 2006; Høst, Gabrielsen, Lindenberg, & Smidt-Jensen, 2002; K. S. Lee et al., 2001; Suh et al., 2002).

#### 1.c. Expression des gènes du complexe cumulo-ovocytaire

L'expression des gènes du complexe cumulo-ovocytaire semble être un autre marqueur de qualité ovocytaire et a été l'objet d'une étude comparative réalisée en 2022 (Sayutti, Abu, & Ahmad, 2022). Plusieurs gènes impliqués dans la régulation de l'expansion des cellules du cumulus (*HAS2*, *GREM1*, *VCAN*, *PTGS2*, *GDF9*, *BMP15*, *TNFAIP6*, *BCL2*) sont régulièrement utilisés en tant que marqueurs de qualité ovocytaire (Assou et al., 2008; Gebhardt, Feil, Dunning, Lane, & Russell, 2011; Kahraman et al., 2018; McKenzie et al., 2004; Q. Shen et al., 2020).

GDF9 et BMP15 sont des régulateurs importants de la folliculogénèse et l'augmentation de leur expression dans les cellules de la granulosa ou dans le fluide folliculaire est associée à un bon pronostic chez la femme. De la même façon, l'augmentation de l'expression de *PTGS2*, *HAS2* et *GREM1* a été observée dans les cellules du cumulus entourant des ovules ayant permis la formation d'embryons de bonne qualité après fécondation *in vitro* (McKenzie et al., 2004). L'augmentation de *HAS2* comme marqueur de bonne qualité ovocytaire a été confirmée par Semra Kahraman en 2018 (Kahraman et al., 2018), mais n'avait pas été confirmée sept ans plus tôt (Gebhardt et al., 2011). En 2011, Kathryn Michelle Gebhardt et son équipe ont mis en évidence qu'une augmentation de l'expression de *VCAN* et *PTGS2* dans les cellules du cumulus était associée à une augmentation du taux de naissance après FIV ou ICSI (Gebhardt et al., 2011). Neuf ans plus tard, Qiuzi Shen et son équipe ont obtenu des résultats controversés concernant *VCAN*. En effet, ils ont remarqué une augmentation de l'expression de *VCAN* dans les cellules du cumulus associées à des ovules donnant des embryons qualifiés de bonne qualité sur des critères morphologiques. Néanmoins, ils ont également observé une augmentation de l'expression de *VCAN* dans des cellules du cumulus entourant des ovules pouvant être qualifiés de moins bonne qualité (ovules immatures, ovules issus de femmes de plus de 35 ans ou encore ovules à l'origine d'embryons ne s'étant pas implantés) (Q. Shen et al., 2020). D'ailleurs, une augmentation de l'expression de *VCAN* a également été mise en évidence par RNAseq dans les cellules du cumulus entourant des ovules de mauvaise qualité (Q. Liu et al., 2018).

La régulation du stress oxydant dans les cellules du cumulus peut être un autre biomarqueur de qualité puisqu'une augmentation de l'expression de *iNOS* et de *HO-1* a été associée comme mauvais pronostic (Bergandi et al., 2014).

### 1.d. Métabolisme du complexe cumulo-ovocytaire

L'étude du métabolisme énergétique du complexe cumulo-ovocytaire représente un autre axe d'évaluation de la qualité ovocytaire. Au cours de la maturation ovocytaire, l'ovocyte, dont la capacité d'utilisation du glucose est faible, utilise le pyruvate et le lactate métabolisés par les cellules du cumulus comme source d'énergie (Sutton-McDowall, Gilchrist, & Thompson, 2010). Les ovocytes ayant une consommation de pyruvate accrue au cours de la maturation ovocytaire, le métabolisme du pyruvate dans les cellules du cumulus est positivement corrélé à la maturité de l'ovocyte associé (Downs, Humpherson, & Leese, 2002). En 2018, Anderson et son équipe ont montré une diminution de la capacité respiratoire des cellules du cumulus entourant des ovules immatures, mettant en évidence une dysfonction des mitochondries dans ces ovules. En revanche, aucune corrélation n'a pu être établie entre la capacité respiratoire des cellules du cumulus et la qualité des embryons obtenus après fécondation *in vitro* (Anderson, Glassner, Melnikov, Friedman, & Orynbayeva, 2018).

En conclusion, l'influence des cellules du cumulus sur l'ovocyte associé n'est plus à démontrer et l'utilisation du complexe cumulo-ovocytaire est un outil intéressant dans l'évaluation de la qualité ovocytaire. Cependant, une mauvaise reproductibilité des résultats est parfois observée et s'explique notamment par la forte variabilité entre les individus et l'influence de nombreux paramètres (âge de la femme, indice de masse corporel, stimulation ovarienne...). Toutefois, cette méthode étant non-invasive, elle mérite des investigations supplémentaires afin d'identifier de meilleurs marqueurs de qualité ovocytaire.

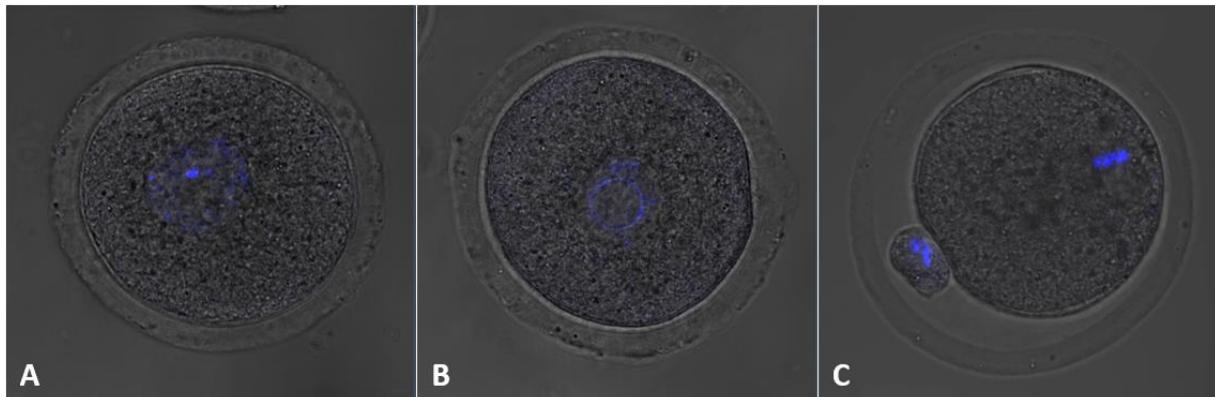
## 2. La morphologie de l'ovule

Rapide et non-invasive, l'évaluation de la qualité ovocytaire sur la base de sa morphologie est la principale méthode utilisée en clinique et dans les laboratoires de recherche en biologie de la reproduction. Elle repose sur l'observation de différents paramètres tels que la taille de l'ovule, sa structure ou encore sa texture. L'étude de la morphologie des ovules dans l'évaluation de leur compétence développementale en AMP a fait l'objet de plusieurs revues (Ebner, Moser, & Tews, 2006; Ozturk, 2020; Rienzi, Vajta, & Ubaldi, 2011).

### 2.a. La maturité nucléaire

Au stade GV, l'ovocyte est diploïde et arrêté en prophase de première méiose. La maturation nucléaire correspond à la capacité de l'ovocyte à reprendre et terminer la première division de méiose pour aller jusqu'en métaphase de seconde division de méiose. Ce processus est indispensable à la formation d'un ovule haploïde. L'observation de la morphologie de l'ovocyte permet d'évaluer l'état de maturation nucléaire de l'ovocyte. Au stade GV, l'ovocyte a un gros noyau et un nucléole très compact, visible en microscopie à transmission. Au cours de leur maturation, les ovocytes GV de souris passent d'une forme NSN (Non-Surrounded Nucleolus), où la chromatine n'est pas très condensée autour du nucléole, à une forme SN (Surrounded Nucleolus), où la chromatine est condensée autour du nucléole (**Figure 39.A,B**). Le passage du stade NSN au stade SN se fait au moment de la formation de l'antrum (Tan et al., 2009). La reprise de la méiose s'accompagne de la désintégration de la membrane nucléaire, phénomène appelé

« rupture de la vésicule germinale » puis l'accomplissement de la première division de méiose est caractérisé par la présence du premier globule polaire. Ainsi, l'ovule nucléairement mature se reconnaît par l'absence de vésicule germinale et la présence du premier globule polaire (Figure 39.C).



**Figure 39: La maturité nucléaire.**

Au stade GV, les ovocytes caractérisés par la présence de la vésicule germinale sont bloqués en prophase I et sont immatures. La chromatine, peu condensée au stade NSN (A) se condense autour du nucléole dans les ovocytes SN (B). Au cours de la maturation nucléaire, la vésicule germinale se rompt, l'ovocyte achève sa première méiose, forme le premier globule polaire et s'arrête en métaphase II pour former un ovule pouvant être fécondé (C). Ces gamètes ont été obtenus avec (C) ou sans (A,B) stimulation ovarienne chez la souris. Le marquage bleu correspond à la coloration de l'ADN par le colorant Hoechst.

Une étude de 2016, réalisée chez la souris, a montré une corrélation entre la cinétique de maturation nucléaire *in vitro* et la qualité ovocytaire. Dans cette étude, les ovocytes ayant fait leur GVBD dans les quatre heures suivant l'initiation de la maturation ont un meilleur taux de fécondation et forment davantage de blastocystes (Higaki et al., 2017).

### 2.b. Le fuseau méiotique

Le fuseau méiotique étant une structure biréfringente, il peut être observé avec un microscope à polarisation. Peu résolutive, cette méthode a cependant l'avantage d'être rapide, non-invasive et compatible avec le développement embryonnaire. Elle permet d'étudier l'intégrité du fuseau, sa position, sa taille et sa biréfringence. Un objet biréfringent a deux indices de réfraction et divise un rayon incident en deux rayons réfractés. Les deux rayons réfractés sortent alors de l'objet avec un décalage appelé biréfringence qui dépend de la différence entre les deux indices de réfraction. La biréfringence renseigne sur la structure cristalline d'un objet, sa densité et son épaisseur (Pelletier, Keefe, & Trimarchi, 2004; Y. Shen, Stalf, Mehnert, Eichenlaub-Ritter, & Tinneberg, 2005).

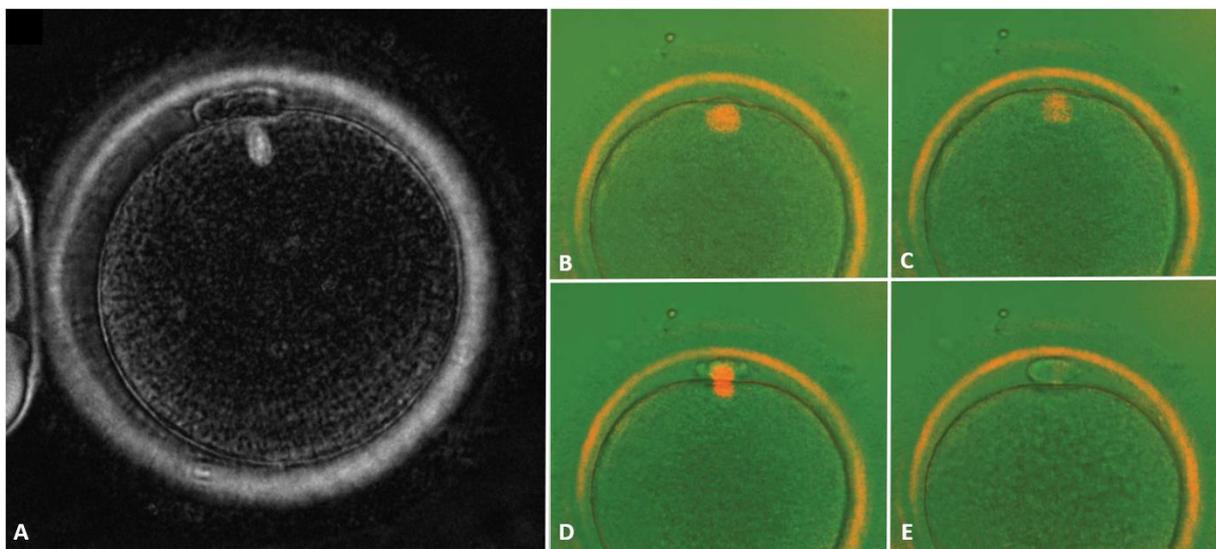
Plusieurs études ont montré un lien entre la biréfringence du fuseau méiotique et la compétence des ovules associés. En effet, une augmentation de la biréfringence du fuseau méiotique a été corrélée à une augmentation du taux de blastocystes (Raju, Prakash, Krishna, &

Madan, 2007), du taux d'implantation (Garcia-Oro et al., 2017) et du taux de gestation (Suha Kilani, Cooke, Kan, & Chapman, 2009). De plus, l'augmentation de l'âge maternel est corrélée à une diminution de la biréfringence du fuseau (De Santis et al., 2005; Raju et al., 2007). Il est cependant nécessaire de garder un œil critique sur ces résultats qui ne sont pas toujours retrouvés (Korkmaz, Sakinci, Bayoglu Tekin, & Ercan, 2014). Le fuseau méiotique étant une structure dynamique, sa biréfringence est susceptible de varier au cours du temps et en fonction de l'orientation du fuseau (Montag, Koster, van der Ven, & van der Ven, 2011).

La longueur du fuseau méiotique et la position de ce dernier par rapport au globule polaire sont régulièrement associées à la compétence développementale des ovules, mais la reproductibilité des résultats est très incertaine. Alors que Hiroyuki Tomari et son équipe obtiennent, avec des ovules ayant un fuseau de taille moyenne (entre 90 et 120  $\mu\text{m}^2$ ), de meilleurs taux de fécondation, des blastocystes de meilleure qualité et un meilleur taux de gestation, GA Rama Raju observe une légère augmentation du taux de blastocystes avec les ovules ayant les plus longs fuseaux méiotiques (Raju et al., 2007; Tomari et al., 2018). En revanche, le lien entre la taille du fuseau et le taux de gestation n'a pas été confirmé par les équipes de Suha Kilani et Cem Korkmaz (Suha Kilani et al., 2009; Korkmaz et al., 2014). D'après une étude réalisée par l'équipe du professeur Albertini, la maturation ovocytaire *in vitro* est associée à une augmentation de la taille du fuseau (Ibanez, Sanfins, Combelles, Overstrom, & Albertini, 2005). Il se pourrait que l'augmentation de la taille du fuseau soit associée à une augmentation de la taille du globule polaire formé. De ce fait, davantage d'ATP, d'ARNm et de protéines partiraient dans le globule polaire, privant l'ovule de facteurs essentiels à son développement. L'augmentation de la taille du fuseau méiotique serait donc associée à une diminution de la compétence développementale (présentation du professeur Albertini à la conférence de Gordon de 2019). Aussi, la présence du fuseau méiotique à proximité du globule polaire est parfois associée à une augmentation du taux de fécondation (C. Fang et al., 2007; Rienzi et al., 2003) mais ce résultat n'est pas toujours retrouvé (Moon et al., 2003). Enfin, la position du fuseau méiotique ne semble pas influencer le développement embryonnaire ni l'implantation (Suha Kilani et al., 2009; Raju et al., 2007).

Au-delà de la biréfringence, de la taille et de la position du fuseau méiotique, la structure de ce dernier est un critère essentiel dans l'évaluation de la qualité ovocytaire. Un fuseau morphologiquement normal a une forme de tonneau, des bordures bien délimitées et une biréfringence homogène (S. Kilani & Chapman, 2014), (**Figure 40.A**). Les chromosomes d'un ovocyte en métaphase II sont alignés au centre du fuseau. Ces paramètres sont de bons marqueurs de qualité ovocytaire puisque la présence d'un fuseau morphologiquement normal permet d'améliorer le taux de fécondation, d'obtenir des embryons de meilleure qualité, d'augmenter les taux d'implantation et de gestation et d'obtenir plus de naissances vivantes (S. Kilani, Cooke, Tilia, & Chapman, 2011; Tilia, Chapman, Kilani, Cooke, & Venetis, 2020). Un fuseau dysmorphique est caractérisé par des bordures irrégulières ou mal définies et une biréfringence non-homogène. Les ovules avec un fuseau méiotique dysmorphique ont une compétence développementale très altérée puisqu'après fécondation et réimplantation, seulement 6 % de ces ovocytes permettront une grossesse et 1 % aboutiront à une naissance vivante (S. Kilani & Chapman, 2014). Bien que la présence de globule polaire soit généralement associée à une maturation nucléaire correcte, il arrive que certains ovocytes avec globule polaire soient encore en télophase I ou prométaphase

II. Des études de time lapse sur des ovocytes humains maturés *in vitro* ont montré que juste après l'extrusion du premier globule polaire, le fuseau reste connecté au globule polaire pendant 75 à 90 minutes (**Figure 40.D**). Cette étape est suivie par un désassemblage du fuseau qui disparaît pendant 40 à 60 minutes. Le fuseau méiotique typique des ovocytes au stade métaphase II apparaît donc 115 à 150 minutes après l'extrusion du globule polaire (Montag et al., 2011). L'absence de fuseau ou la présence d'un fuseau connecté au globule polaire sont des signes de retard de maturation et les ovocytes concernés ont plus de risques d'avoir des anomalies chromosomiques. D'ailleurs, après fécondation par ICSI, ces ovocytes ont tendance à former des embryons avec trois pronoyaux. Afin de maximiser les chances d'obtention d'un embryon capable de se développer, il est recommandé d'attendre quelques heures avant de féconder ces ovocytes (Cristina Magli et al., 2011).



**Figure 40 : Observation du fuseau méiotique en microscopie à polarisation.**

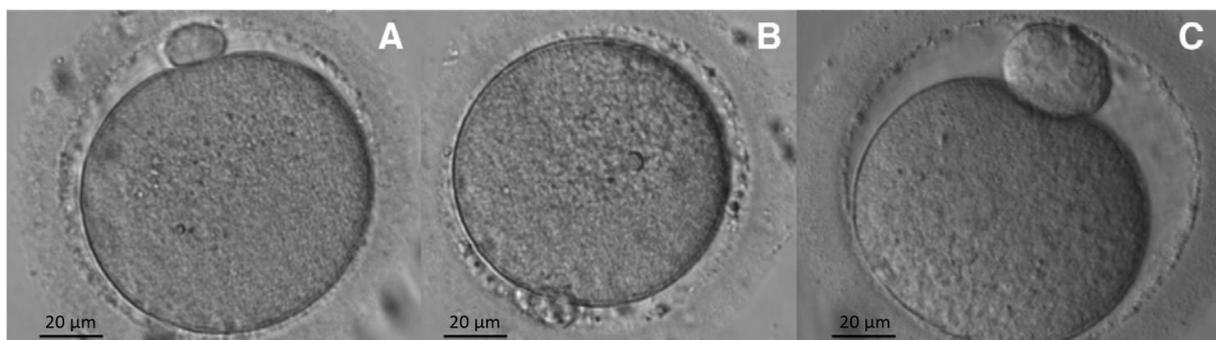
A : Ovule de qualité optimale, le fuseau méiotique en forme de tonneau et aux contours réguliers est clairement visible sous le globule polaire. B et C : Ovocytes en métaphase I dont l'intensité de la biréfringence varie. D : Ovocyte en télophase I, le fuseau et le globule polaire semblent connectés. E : fuseau méiotique absent. Ces ovules sont obtenus par ponction folliculaire après stimulation ovarienne chez la femme. Images d'après (Montag & van der Ven, 2008; Tilia et al., 2020).

### 2.c. Le globule polaire

Le globule polaire est la cellule formée au cours de la première méiose. Haploïde, il contient la moitié des chromosomes de l'ovocyte GV et très peu de cytoplasme. Le globule polaire peut être de forme ronde ou ovale, d'aspect lisse ou rugueux, mais aussi fragmenté ou particulièrement gros et donc associé à un large espace périvitellin (**Figure 41**). Parmi ces critères, la présence d'un globule polaire de grande taille est le critère le plus souvent associé à un mauvais pronostic car cela implique une perte plus importante de cytoplasme et donc de facteurs maternels nécessaires à la maturation ovocytaire et au développement embryonnaire (Ebner et al., 2000; Navarro et al., 2009). D'ailleurs, certaines mutations étudiées chez la femme (Z. Liu et al., 2021) ou chez la souris

(Camlin, McLaughlin, & Holt, 2017) sont responsables de la formation de globules polaires anormalement gros.

Le lien entre la qualité ovocytaire et la fragmentation du globule polaire ou son aspect rugueux a fait l'objet de plusieurs études et les résultats sont controversés. Alors que certaines équipes n'observent pas de lien entre la morphologie du globule polaire et la compétence développementale de l'ovule (Ciotti et al., 2004; Halvaei, Khalili, Soleimani, & Razi, 2011) ou la présence d'anomalies chromosomiques (Verlinsky et al., 2003), Thomas Ebner et son équipe ont observé une diminution du nombre d'embryons de qualité dans les groupes d'ovules ayant un globule polaire d'aspect rugueux ou fragmenté (Ebner et al., 2000). D'autres équipes obtiennent des résultats plus mitigés. L'étude réalisée par Paula Andrea Navarro en 2009 montre que la fragmentation du globule polaire n'impacte ni le taux de fécondation, ni le taux de clivage, ni la proportion d'embryons de bonne qualité (Navarro et al., 2009). Enfin, les équipes de Johnny S. Younis et de Wenhui Zhou obtiennent des résultats contradictoires puisque Johnny S. Younis associe la présence d'un globule polaire intact à une augmentation du taux de grossesse sans voir de différence en termes de fécondation ou de développement embryonnaire préimplantatoire (Younis, Radin, Izhaki, & Ben-Ami, 2009). En revanche, Wenhui Zhou observe un meilleur développement préimplantatoire dans le groupe des ovules avec un globule polaire intact, mais n'observe pas de différence dans le taux d'implantation ou de grossesse (W. Zhou, Fu, Sha, Chu, & Li, 2016). Les différences de résultats pourraient s'expliquer par des différences de méthodes de classification des ovules et notamment la prise en compte ou non, des autres anomalies morphologiques de l'ovule. De plus, le globule polaire se dégrade rapidement après la ponction des ovules, le délai entre la mise en culture des ovules et l'analyse morphologique des globules polaires est un paramètre à prendre en compte. Il en ressort que l'observation de la morphologie du globule polaire seul ne permette pas de faire un lien avec la qualité de l'ovule. D'autres analyses utilisant le globule polaire peuvent être envisagées et notamment l'étude du transcriptome du globule polaire qui reflète le transcriptome de l'ovule associé (Reich, Klatsky, Carson, & Wessel, 2011).



**Figure 41 : Les anomalies morphologiques du premier globule polaire.**

Le globule polaire ovoïde, d'aspect lisse et de taille normale est représentatif d'un ovule de bonne qualité (A). Les globules polaires fragmentés (B) ou de taille anormalement élevée (C) indiquent que le potentiel de développement des ovules associés est altéré. Ces ovules sont obtenus par ponction folliculaire après stimulation ovarienne chez la femme. Images d'après (Navarro et al., 2009).

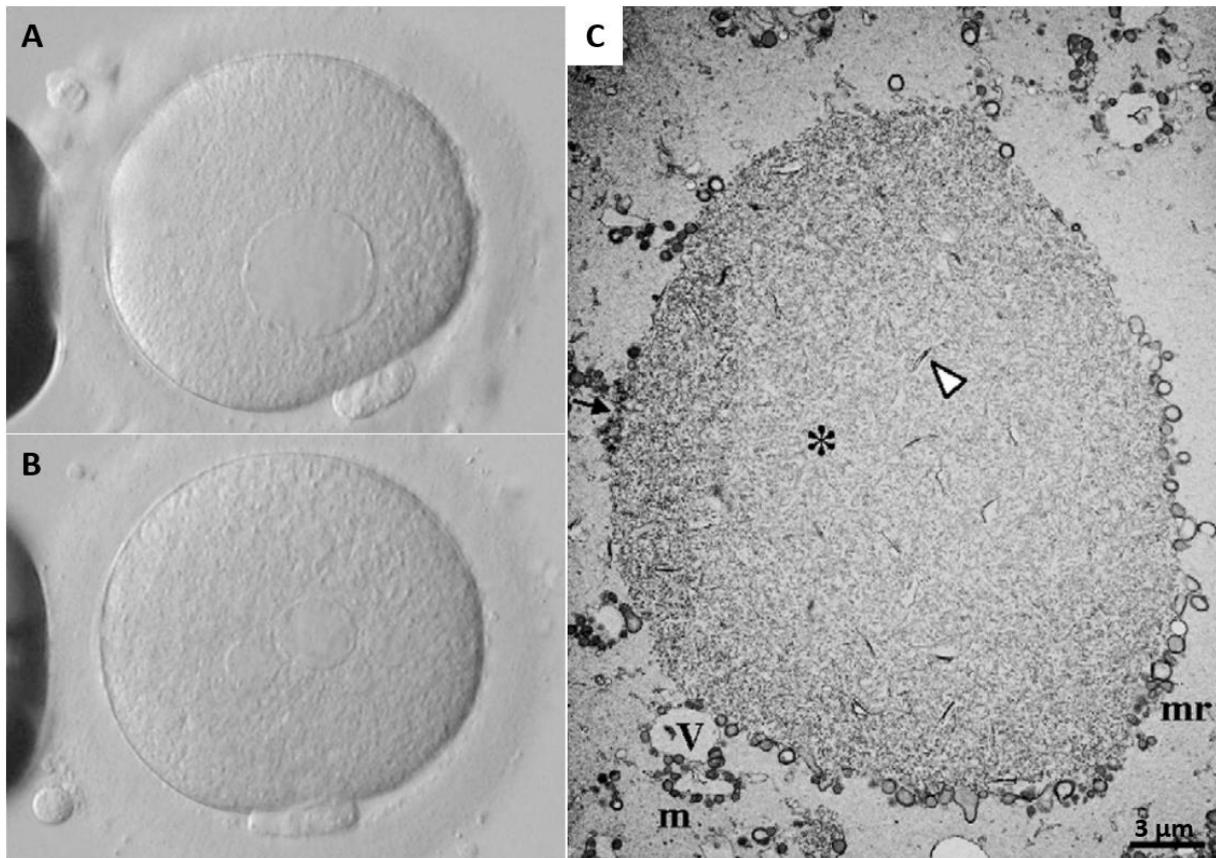
## 2.d. Le cytoplasme

Par définition, un ovocyte de bonne qualité contient un cytoplasme clair, homogène et non granuleux (Ebner et al., 2006). Plusieurs types de modifications cytoplasmiques ont été étudiés afin de comprendre leur impact sur la compétence de développement de l'ovocyte.

En microscopie optique, les agrégats de réticulum endoplasmique lisse ou SERC (Smooth Endoplasmic Reticulum Cluster) apparaissent comme des vacuoles lisses et translucides dans le cytoplasme. Ils se distinguent d'autres types de vacuoles car ils ne sont pas entourés par une membrane. Leur observation en microscopie électronique montre qu'ils sont entourés de nombreuses mitochondries et de petits agrégats de granules denses contenant de très petites vésicules (Sa et al., 2011). Ces vacuoles peuvent être uniques ou multiples et de tailles très différentes (entre 2 et 40  $\mu\text{m}$ ) (Ebner, Moser, Shebl, Sommerguber, & Tews, 2008; Otsuki, Okada, Morimoto, Nagai, & Kubo, 2004), (Figure 42). La durée de la stimulation ovarienne et la quantité d'hormones utilisée pourraient être des facteurs prédisposants à la formation des SERC (Ebner et al., 2008; Sa et al., 2011; Setti et al., 2016). La présence de ce type de vacuoles dans le cytoplasme de l'ovule est associée à une diminution de la compétence de développement de l'ovule. Les résultats concernant l'impact des SERC sur le taux de fécondation et le développement jusqu'au stade blastocyste sont relativement hétérogènes mais les différentes études réalisées s'accordent sur le fait que ces anomalies cytoplasmiques sont associées à une diminution du taux de gestation (Ebner et al., 2008; Otsuki et al., 2004; Sa et al., 2011; Setti et al., 2016). De plus, plusieurs équipes ont montré que la présence d'au moins un ovule concerné par les SERC dans un cycle de stimulation impacte la compétence de développement des autres ovules (Otsuki et al., 2004; Sa et al., 2011; Setti et al., 2016). En 2018, Sara Stigliani et son équipe ont observé une modification du transcriptome de ce type d'ovules. De façon intéressante, certains gènes dont l'expression est modifiée sont impliqués dans des fonctions biologiques essentielles telles que la régulation du cycle cellulaire, l'assemblage du fuseau méiotique, l'organisation du cytosquelette et des microtubules ou encore la structure et l'activité des mitochondries (Stigliani et al., 2018). Ces résultats sont interpellant puisqu'en plus de l'augmentation du taux de fausses couches observé (Ebner et al., 2008), les ovules SERC pourraient être à l'origine de malformations fœtales ou de décès prématurés (Akarsu, Caglar, Vicdan, Sozen, & Biberoglu, 2009; Otsuki et al., 2004; Sa et al., 2011; Shaw-Jackson, Van Beirs, Thomas, Rozenberg, & Autin, 2014).

Responsable du stockage et du relargage du calcium, le réticulum endoplasmique est un acteur clé de l'activation ovocytaire ayant lieu juste après la fécondation. En effet, le relargage du calcium sous forme de vagues est indispensable à la formation de l'embryon car il permet, entre autres, l'exocytose des granules corticaux, la reprise et l'accomplissement de la seconde division de méiose et la formation des pronoyaux (Jones, 2005). La présence d'agrégats de réticulum endoplasmique dans le cytoplasme des ovules pourrait perturber le relargage du calcium et l'activation ovocytaire, expliquant les effets néfastes sur le développement de l'embryon (Otsuki et al., 2004; Sa et al., 2011; Setti et al., 2016). En 2011, les membres d'un jury d'experts en embryologie prennent le risque au sérieux et recommandent de ne pas féconder ces ovules (Alpha Scientists in Reproductive & Embryology, 2011). Six ans plus tard, la naissance de bébés en bonne santé suite à la fécondation d'ovules SERC (Mateizel, Van Landuyt, Tournaye, & Verheyen, 2013) pousse les scientifiques à revoir les recommandations à la baisse. L'utilisation des ovules SERC doit

être étudiée au cas par cas, les embryons, les grossesses, les naissances et les enfants issus de ces ovules doivent bénéficier d'un suivi rapproché (Embryology & Alpha Scientists in Reproductive Medicine. Electronic address, 2017).



**Figure 42 : Les anomalies cytoplasmiques des ovules : agrégats de réticulum endoplasmique lisse.**

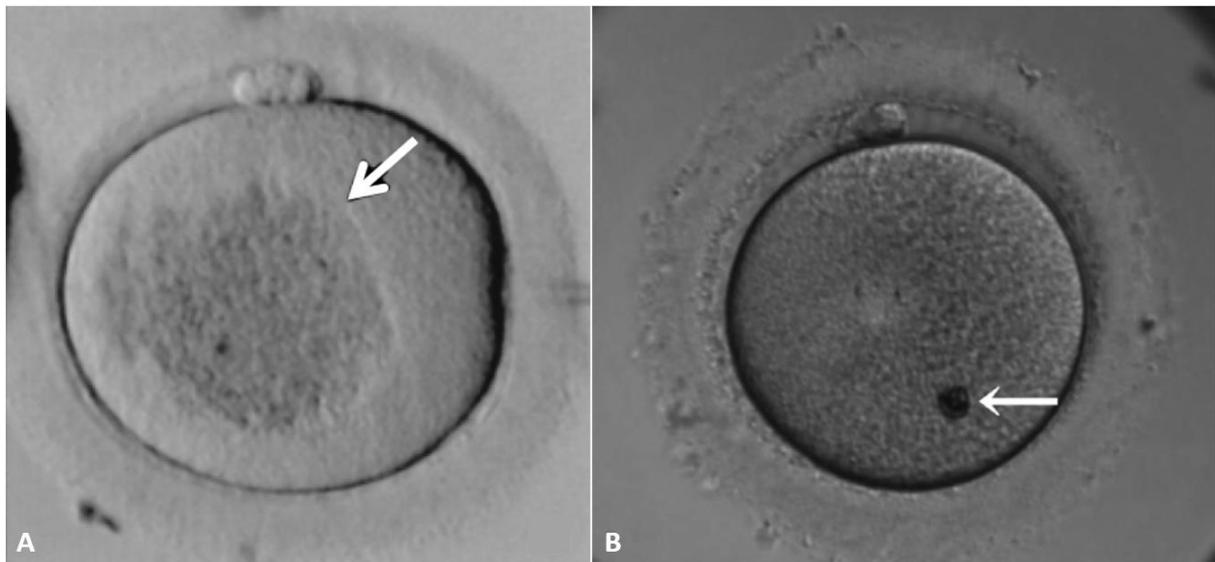
Les agrégats de réticulum endoplasmique lisse prennent la forme de vacuoles lisses et translucides pouvant être uniques (A) ou multiples (B) et de taille variable (A : 38.9  $\mu\text{m}$ , B : 11.1 et 25.0  $\mu\text{m}$ ). Leur observation en microscopie électronique révèle la présence de mitochondries autour des SERC (C). Leur présence est signe d'altération de la compétence développementale des ovules. Sur ces images, les gamètes sont obtenus par ponction folliculaire après stimulation ovarienne chez la femme. Images d'après (Ebner et al., 2008; Sa et al., 2011).

D'autres anomalies cytoplasmiques telles que la présence de granulation, de corps réfractiles (Figure 43) ou un changement de couleur ont été décrites et associées à une altération de la qualité ovocytaire.

La granulation du cytoplasme, qui peut s'étendre sur l'intégralité de l'ovule ou bien se localiser en son centre, ne semble pas impacter la fécondation ni le développement embryonnaire préimplantatoire, mais entraîne une diminution du taux de gestation (Serhal et al., 1997; Tulay, Arslan, Buran, & Koprulu, 2019). De plus, cette granulation a été associée à une diminution de la résistance de l'ovule à la cryoconservation (Balaban, Ata, Isiklar, Yakin, & Urman, 2008).

Les corps réfractiles, pouvant atteindre 10  $\mu\text{m}$  de diamètre, sont composés de lipides et de matériel granulaire dense. Très sombres en microscopie optique, les corps réfractiles ont la particularité d'être auto-fluorescents, propriété liée à la présence de lipofuscine, substance issue de l'oxydation de résidus protéiques et lipidiques (Otsuki, Nagai, & Chiba, 2007). Bien que la présence de ces corps réfractiles n'impacte pas ou peu la fécondation (De Sutter, Dozortsev, Qian, & Dhont, 1996; Otsuki et al., 2007; H. Takahashi et al., 2020), le taux de blastocystes et le taux d'implantation sont significativement réduits lorsque les ovules fécondés ont ce type d'anomalie. De plus, la diminution du taux de blastocystes est proportionnelle à la taille du corps réfractile (Otsuki et al., 2007; H. Takahashi et al., 2020). De façon intéressante, la présence de corps réfractiles dans les ovules est significativement augmentée chez les femmes souffrant d'endométriose (Shebl et al., 2017).

L'impact de la modification de la couleur des ovules n'est pas manifeste. Certains auteurs n'observent pas d'altération de la compétence développementale des ovules bruns ou foncés (Esfandiari, Burjaq, Gotlieb, & Casper, 2006; E. J. Yu, Ahn, Lee, Jee, & Kim, 2015), d'autres constatent une diminution de la qualité embryonnaire (Loutradis et al., 1999; Ten, Mendiola, Vioque, de Juan, & Bernabeu, 2007). La réalisation d'études statistiques sur ce type d'anomalie est difficile car le nombre d'ovules bruns ou foncés étudié est réduit. De plus, cette anomalie est régulièrement associée à d'autres anomalies telles que la granulation cytoplasmique ou la présence de vacuoles (E. J. Yu et al., 2015).



**Figure 43 : Les anomalies cytoplasmiques des ovules : la granulation et les corps réfractiles.**

Ovules de femmes au stade MII présentant une forte granulation cytoplasmique (A) et un corps réfractile (B). Ces ovules sont obtenus par ponction folliculaire après stimulation ovarienne. Images d'après (Kahraman et al., 2000; H. Takahashi et al., 2020).

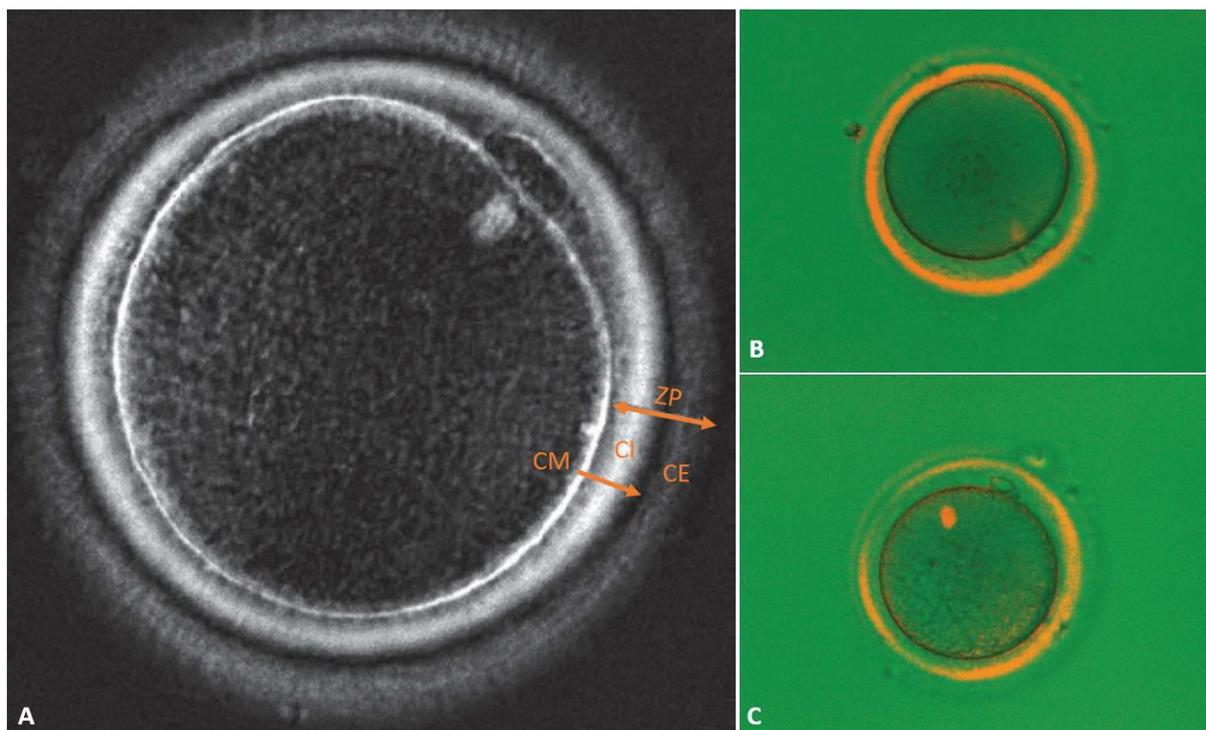
### *2.e. La zone pellucide*

La zone pellucide est une matrice extracellulaire entourant tous les ovocytes de Mammifères. Absente dans les ovocytes quiescents, elle se met en place dans les ovocytes en croissance et

s'épaissit au cours de la folliculogénèse. Elle est traversée par les projections transzonales provenant des cellules folliculaires et allant jusqu'à la surface de l'ovocyte (Baena & Terasaki, 2019). La zone pellucide reste autour de l'embryon jusqu'au moment où le blastocyste éclo pour s'implanter dans la muqueuse utérine. Acteur important de l'ovogénèse, de la fécondation et du développement embryonnaire préimplantatoire, des anomalies de la zone pellucide sont responsables d'infertilité (Loeuillet et al., 2022; T. Rankin et al., 1996; T. L. Rankin et al., 2001). Au cours de l'ovogénèse, elle permet le passage, de manière passive, d'éléments nutritifs, puis, au moment de la fécondation, elle contribue à la reconnaissance espèce-spécifique entre l'ovule et le spermatozoïde (Avella, Xiong, & Dean, 2013). De plus, elle participe à prévenir la polyspermie et protège l'embryon au cours de son trajet vers l'utérus (Litscher & Wassarman, 2020).

Différentes études ont été menées afin de corréliser l'épaisseur de la zone pellucide à la compétence développementale de l'ovocyte. Pour cela, plusieurs paramètres ont été étudiés : la fécondation, le développement embryonnaire, le taux d'implantation et le taux de naissances. Il semble assez clair que le taux de fécondation est augmenté dans les ovules ayant une zone pellucide plus fine, probablement du fait d'une meilleure pénétration des spermatozoïdes (Bertrand, Van den Bergh, & Englert, 1995). Cependant, ce paramètre n'est pas un gage de qualité, d'autres études ont montré une corrélation positive entre augmentation de l'épaisseur de la zone pellucide et développement embryonnaire (Raju et al., 2007; Y. Shen et al., 2005). Ainsi, d'autres paramètres de la zone pellucide semblent plus pertinents à étudier. Par exemple, la présence de cassure de la zone pellucide (Y. Shen et al., 2005), une zone pellucide foncée ou de forme ovale (Sauerbrun-Cutler et al., 2015) sont des facteurs influençant négativement le potentiel de développement des ovules.

La microscopie à polarisation de plus en plus utilisée pour observer le fuseau méiotique de manière non-invasive est également utilisée pour étudier la zone pellucide. L'observation de la zone pellucide avec un microscope polarisé permet de visualiser trois couches : une couche interne (vers l'ovocyte) plus lumineuse, plus épaisse et plus biréfringente, une couche intermédiaire plus fine et très sombre et une couche externe apparaissant en gris (Pelletier et al., 2004; Y. Shen et al., 2005), (**Figure 44**). Une étude rétrospective sur des ovules utilisés en ICSI a montré une augmentation significative de la biréfringence de la couche interne de la zone pellucide des ovules ayant permis la conception d'un bébé (Y. Shen et al., 2005). Plusieurs autres études ont confirmé le lien entre l'augmentation de la biréfringence de la zone pellucide et la compétence développementale des ovules (Madaschi et al., 2009; Montag et al., 2008).



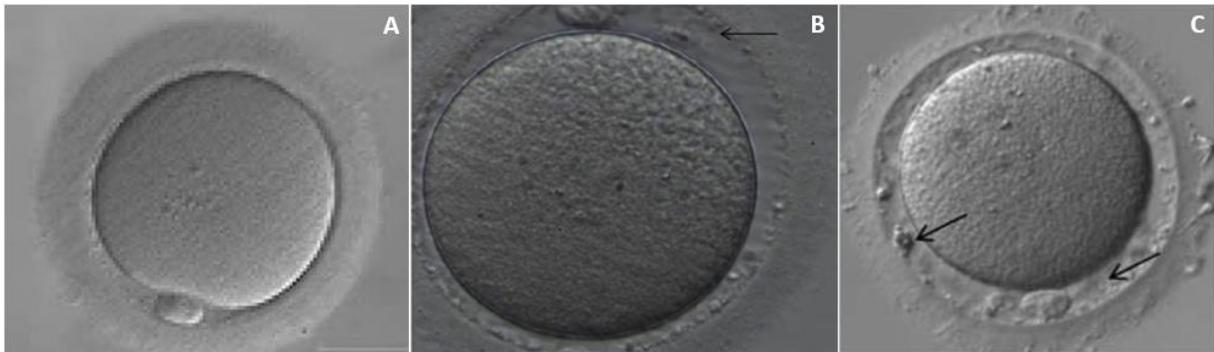
**Figure 44 : Observation de la zone pellucide en microscopie à polarisation.**

A : La zone pellucide (ZP) observée en microscopie à polarisation révèle une couche interne (CI) épaisse et lumineuse, une couche externe (CE) épaisse et grise. Entre les deux, une couche intermédiaire (CM) apparaît plus fine et très sombre. B : La biréfringence de la zone pellucide, intense et régulière est caractéristique d'un ovule de bonne qualité. C : L'épaisseur irrégulière de la zone pellucide et les variations d'intensité de biréfringence sont représentatives d'un ovule ayant une compétence développementale limitée. Images d'après (Montag & van der Ven, 2008; Raju et al., 2007).

### 2.f. L'espace périvitellin

L'espace périvitellin correspond à l'espace entre l'ovocyte et la zone pellucide. Il est communément accepté que l'augmentation de la taille de cet espace et la présence de granules à l'intérieur de cet espace sont associés à une diminution de la qualité ovocytaire et embryonnaire (Ozturk, 2020), (Figure 45). Plusieurs équipes ont montré que le taux de fécondation et le développement embryonnaire préimplantatoire ne sont pas perturbés en présence de ces granules, mais que le taux d'implantation des embryons est significativement diminué. La nature de ces granules et le processus impliqué dans la perturbation du taux d'implantation embryonnaire restent cependant controversés. En 1997, P.Xia indique que ces granules pourraient être des granules corticaux dont l'exocytose a été faite de façon précoce (Xia, 1997). Un an plus tard, H.Hassan-Ali et son équipe pensent que la présence de granules dans l'espace périvitellin est liée à la maturation ovocytaire et augmente avec la dose d'HMG (Human Menopausal Gonadotrophin) utilisée au cours de la stimulation ovarienne (Hassan-Ali et al., 1998). D'après Jacob Farhi et son équipe, cette théorie pourrait expliquer les cas sporadiques, cependant, en cas de phénomène répété, il s'agirait plutôt d'un problème inhérent à l'ovocyte, par exemple l'accumulation de cellules de la granulosa dans l'espace périvitellin suite à la formation d'une zone

pellucide anormale (Farhi et al., 2002). Cette explication s'appuie sur l'observation de granules dans l'espace périvitellin de souris déficientes en ZP1 (T. Rankin, Talbot, Lee, & Dean, 1999).

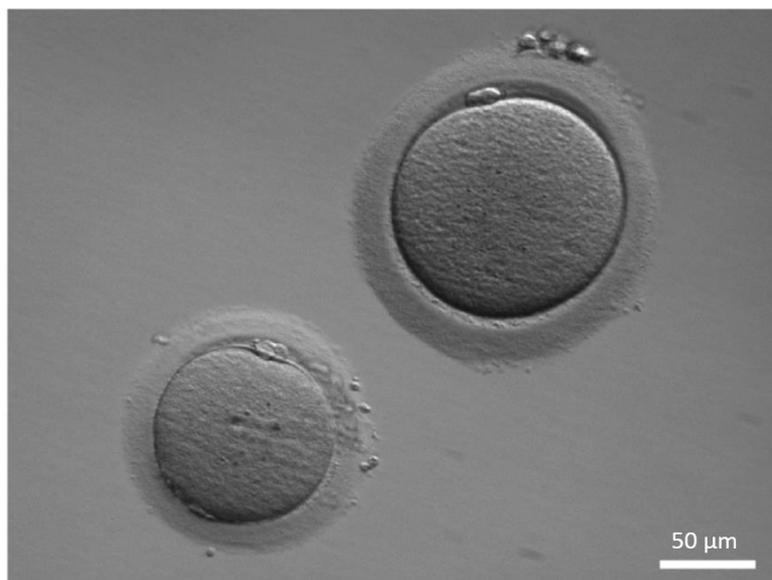


**Figure 45 : Les anomalies de l'espace périvitellin.**

Dans un ovule de qualité, l'espace périvitellin est réduit et homogène (A). Un espace périvitellin large (B) ou granuleux (C) peut être le signe d'une altération de la qualité ovocytaire.

### *2.g. Les ovules géants*

Au moment de l'ovulation, un ovule de femme de taille normale mesure environ 150  $\mu\text{m}$  de diamètre et est occupé par un cytoplasme d'environ 110  $\mu\text{m}$ . Un ovule est qualifié de géant lorsque la taille du cytoplasme dépasse 130  $\mu\text{m}$  pour un diamètre total d'environ 200  $\mu\text{m}$  (Figure 46).

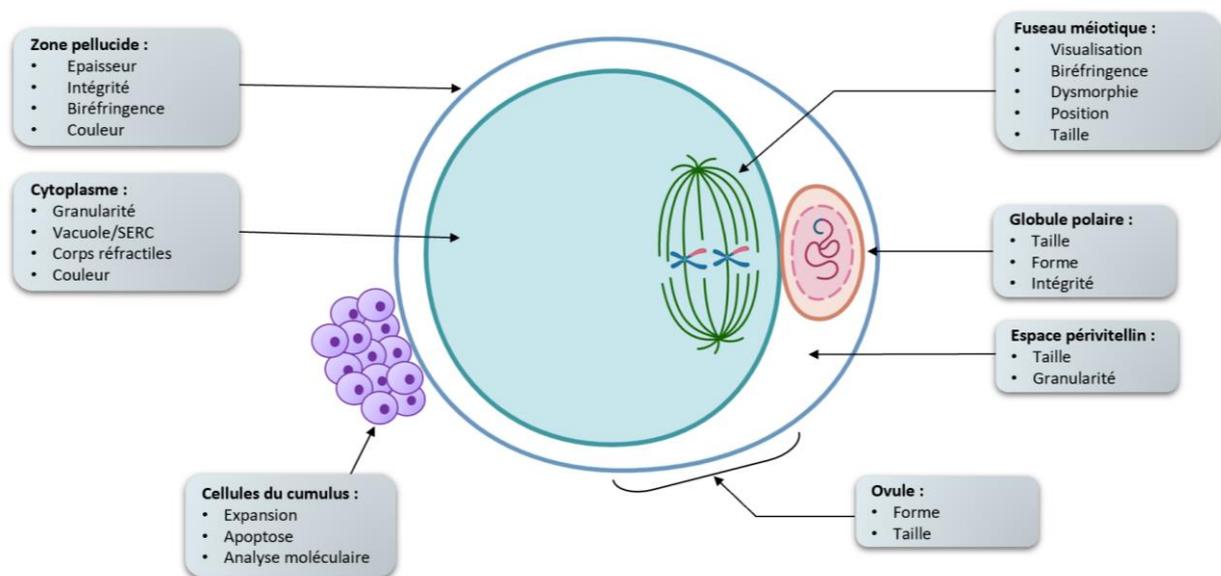


**Figure 46 : Observation d'un ovule de taille normale et d'un ovule géant chez la femme.**

Ovules de femmes prélevés après stimulation ovarienne. A gauche, un ovule de taille normale. A droite, un ovule anormalement gros qualifié de géant. Image d'après (Kitasaka, Konuma, Tokoro, Fukunaga, & Asada, 2022).

Dans les centres d'assistance médicale à la procréation, les ovules géants représentent 0,2 à 0,3 % des ovules collectés (Balakier, Bouman, Sojecki, Librach, & Squire, 2002; Kitasaka et al., 2022;

Rosenbusch, Schneider, Glaser, & Brucker, 2002). Ces ovules sont caractérisés par des anomalies chromosomiques pouvant prendre différentes formes. Dans leur article publié en 2022, Bernd Rosenbusch et son équipe expliquent qu'un ovocyte géant au stade GV présentant deux noyaux peut avoir deux modèles de maturation. Dans la première situation, les deux groupes de chromosomes haploïdes fusionnent au moment de la formation du fuseau et forment un groupe diploïde. L'ovule qui en résulte a un noyau et un globule polaire tout deux diploïdes. Dans la deuxième situation, les deux groupes de chromosomes haploïdes ne fusionnent pas, il en résulte un ovule avec deux globules polaires haploïdes et deux groupes de chromosomes également haploïdes (Rosenbusch et al., 2002). La même année, Hanna Balakier et son équipe ont montré que certains ovules géants peuvent former des blastocystes, mais des expériences de FISH (Fluorescent *In-Situ* Hybridization) réalisées sur ces embryons montrent la présence de cellules triploïdes (Balakier et al., 2002). Vingt ans plus tard, deux équipes différentes ont observé la présence de deux fuseaux méiotiques dans certains ovocytes géants (Kawano, Yamashita, Ito, & Kashiwazaki, 2021; Kitasaka et al., 2022). En 2022, Hiroya Kitasaka et son équipe ont montré que les ovocytes géants avec fuseau unique étaient caractérisés par une augmentation de la taille de ce fuseau et du nombre de centromères (Kitasaka et al., 2022). Dans le cas d'un recours à l'assistance médicale à la procréation, il est nécessaire d'exclure les ovules géants à cause du risque d'aneuploïdie pour les embryons qui en découlent.



**Figure 47 : Schéma récapitulatif des paramètres morphologiques utilisés pour évaluer la qualité d'un ovule.**

Figure inspirée de (Ozturk, 2020) et créée avec Biorender.

## 2.h. Conclusion

L'observation de la morphologie des ovules destinés à être fécondés est un outil intéressant et non-invasif permettant d'évaluer la bonne ou mauvaise qualité du gamète. Chez la femme, un ovule considéré de bonne qualité mesure environ 150  $\mu\text{m}$  de diamètre, n'a plus de vésicule germinale et possède un globule polaire rond ou ovale, lisse et non fragmenté. Le cytoplasme est

clair, non granuleux, dépourvu de vacuole et de corps réfractile. Le fuseau méiotique est intact, fortement biréfringent, en forme de tonneaux avec des bordures bien délimitées. L'espace périvitellin est réduit et non granuleux. Enfin, la zone pellucide est intacte et fortement biréfringente.

Au contraire, la présence d'un fuseau méiotique dysmorphique, des agrégats de réticulum endoplasmique lisse dans le cytoplasme ou bien une forte augmentation de la taille de l'ovule sont des signes impactant fortement le devenir du gamète. D'ailleurs, en raison du risque pour le futur individu, les ovules anormalement gros ou contenant des agrégats de réticulum endoplasmique lisse doivent être utilisés avec une grande prudence.

Les autres anomalies décrites dans ce chapitre ont des répercussions moins drastiques sur la compétence développementale de l'ovule. D'ailleurs, certains résultats et notamment la granulation du cytoplasme, la taille et la position du fuseau ou encore l'épaisseur de la zone pellucide manquent de reproductibilité. Ce problème peut s'expliquer par des différences d'interprétation entre opérateurs ou par des modifications de l'ovule au cours du temps. Cela souligne la nécessité de trouver des marqueurs de qualité ovocytaire plus robustes.

### 3. L'aneuploïdie

Chez l'Homme, les cellules somatiques sont diploïdes et contiennent 22 paires de chromosomes homologues et une paire de chromosomes sexuels. Les gamètes, cellules haploïdes contenant 23 chromosomes, sont formés à l'issue de deux divisions de méiose successives. La première division de méiose sépare les chromosomes homologues, la seconde sépare les chromatides sœurs. Une mauvaise ségrégation des chromosomes est responsable de la formation de cellules aneuploïdes qui contiennent un nombre de chromosomes incorrect. Chez la femme, l'aneuploïdie affecte 10 à 25 % des ovules ovulés avant 30 ans et augmente fortement avec l'âge. L'aneuploïdie est un facteur majeur de la baisse de fertilité des femmes puisqu'après 40 ans, plus de la moitié des ovules sont anormaux d'un point de vue chromosomique (Thomas, Cavazza, & Schuh, 2021). La fécondation d'un ovule aneuploïde donne lieu à la formation d'un embryon également aneuploïde qui, dans la plupart des cas, ne pourra pas se développer. L'aneuploïdie est donc une cause majeure d'avortement spontané.

### 4. Les paramètres métaboliques

La maturation ovocytaire et le développement embryonnaire nécessitent une quantité importante d'énergie fournie sous forme d'ATP. Chez la souris, la production d'ATP est gérée par les mitochondries et une forte corrélation existe entre cet organite et la compétence développementale des ovules. Ainsi, certains critères relatifs au nombre de mitochondries et à leur efficacité peuvent être utilisés pour évaluer la qualité ovocytaire.

#### 4.a. L'ADN mitochondrial

A l'exception du noyau, la mitochondrie est le seul organite à posséder son propre matériel génétique. Dans une cellule, la quantité d'ADN mitochondrial est proportionnel au nombre de mitochondries. Plusieurs études ont montré une diminution significative de la quantité d'ADN mitochondrial dans les ovules de femmes en échec de développement suite à une FIV ou une ICSI (Reynier et al., 2001; Santos, El Shourbagy, & St John, 2006). De plus, une diminution de la quantité d'ADN mitochondrial est également remarquée dans les ovules de patientes souffrant d'insuffisance ovarienne (May-Panloup et al., 2005). De même, chez la souris, les ovules contenant moins de 50 000 copies d'ADN mitochondrial ne sont pas capables de se développer (Wai et al., 2010). La quantification de l'ADN mitochondrial dans l'ovule est réalisée par PCR et implique la destruction du gamète, cette méthode est donc incompatible avec la production d'embryons. L'utilisation du globule polaire ou des cellules du cumulus sont des alternatives intéressantes puisqu'elles permettent de préserver l'intégrité du gamète féminin. D'ailleurs, la quantité d'ADN mitochondrial tend à diminuer dans les cellules du cumulus de femmes avec une réserve ovarienne réduite (Boucret et al., 2015) mais aussi dans les cellules du cumulus entourant des ovules immatures (Desquirit-Dumas et al., 2017) ou à l'origine d'embryons de mauvaise qualité (Ogino et al., 2016) qui ne parviennent pas à s'implanter (Taugourdeau et al., 2019). En revanche, sachant que les mitochondries ne sont pas équitablement réparties entre l'ovule et le globule polaire, la faible quantité d'ADN mitochondrial contenu les globules polaires rend les analyses plus difficiles et la différence observée n'est pas statistiquement significative (Konstantinidis et al., 2014).

Localisé à proximité de la chaîne respiratoire et dépourvu de protection efficace, l'ADN mitochondrial est particulièrement sensible aux espèces réactives de l'oxygène et aux mutations. Le nombre de ces mutations dans les ovules augmente avec l'âge et est en partie responsable de la baisse de fertilité des femmes de plus de 35 ans. Chez la souris, l'accumulation de mutations de l'ADN mitochondrial entraîne une diminution de NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit) (L. Yang et al., 2020). NADH produit au cours du cycle de Krebs est un donneur d'électrons de la chaîne respiratoire et un acteur essentiel de la production d'ATP dans les cellules. En plus de perturber le fonctionnement des mitochondries et la compétence développementale des ovules, les mutations de l'ADN mitochondrial peuvent être à l'origine de maladies graves dont l'incidence est estimée à 1/5000 naissances (Jiang & Shen, 2022).

#### 4.b. Production d'ATP

En suivant la quantité d'ATP dans les ovocytes de souris au cours de leur maturation, des scientifiques ont observé une élévation du niveau d'ATP au moment de l'extrusion du premier globule polaire. De façon intéressante, cette dynamique n'est pas retrouvée dans les ovocytes qui n'atteignent pas le stade MII (Dalton, Szabadkai, & Carroll, 2014). De la même façon, l'augmentation du potentiel de membrane des mitochondries ayant lieu au cours de la maturation n'apparaît pas dans les ovocytes qui restent bloqués au stade GV (Al-Zubaidi et al., 2019). Ces résultats vont dans le sens de Xiao Zhang et Hai-tao Zeng et de leurs collègues respectifs qui observent des anomalies du fuseau méiotique ou une diminution de sa biréfringence dans les ovules dont la quantité d'ATP est réduite (Zeng et al., 2007; X. Zhang, Wu, Lu, Guo, & Ma, 2006).

Il est tout de même important de noter que certains ovocytes sont capables de murer malgré un dysfonctionnement des mitochondries et une diminution de la quantité d'ATP (Chiaratti et al., 2018; Johnson, Freeman, Gardner, & Hunt, 2007; Van Blerkom, Davis, & Lee, 1995). En effet, dans les ovocytes en croissance, la structure des mitochondries (petite, sphérique, claire) est caractéristique d'un état immature et inactif. De ce fait, l'ATP nécessaire à la croissance ovocytaire est fournie par les cellules de la granulosa qui communiquent avec l'ovocyte via les projections transzonales. La compensation en ATP soutenue par les cellules de la granulosa n'est cependant plus possible dans les embryons et la diminution de la quantité d'ATP dans les ovules entraîne une altération du développement préimplantatoire, de l'éclosion des blastocystes et de leur implantation (Thouas, Trounson, Wolvetang, & Jones, 2004; Van Blerkom et al., 1995).

#### *4.c. Organisation spatiale des mitochondries*

La maturation ovocytaire s'accompagne d'une importante réorganisation spatiale des mitochondries qui vont se regrouper en région périnucléaire avant la GVBD puis autour du fuseau méiotique en formation. Cette translocation des mitochondries est nécessaire pour subvenir à l'augmentation des besoins énergétiques liée à la maturation ovocytaire (GVBD, condensation des chromosomes, formation du fuseau méiotique) (Van Blerkom, 2011) et son absence est corrélée à un arrêt de maturation ovocytaire (Van Blerkom & Runner, 1984).

#### *4.d. La consommation de dioxygène*

Dans la chaîne respiratoire, la réduction du dioxygène  $O_2$  en  $H_2O$  au niveau du complexe IV permet le transfert de protons vers l'espace intermembranaire (Nolfi-Donagan et al., 2020). La consommation d'oxygène d'une cellule, ou respiration, est directement reliée à sa production d'ATP par phosphorylation oxydative. Ainsi, chez la femme, la consommation d'oxygène des ovules est positivement corrélée avec le taux de fécondation, la qualité du développement embryonnaire préimplantatoire et le taux d'implantation (Tejera et al., 2011). La capacité respiratoire des cellules du cumulus est également associée à la qualité de l'ovule. Une diminution significative de la capacité respiratoire est retrouvée dans les cellules folliculaires entourant des ovules immatures. Ce paramètre est également diminué chez les femmes de plus de 35 ans et les ovules ayant formé des embryons de mauvaise qualité après fécondation, mais cette diminution n'est pas statistiquement significative du fait d'une forte variabilité inter-individus (Anderson et al., 2018). Il existe différentes méthodes pour évaluer la capacité respiratoire des cellules. L'une d'elles mesure le gradient de concentration d' $O_2$  dans l'environnement immédiat de la cellule ce qui permet d'obtenir des résultats pour un ovule unique sans altérer sa compétence développementale (Lopes, Greve, & Callesen, 2007).

#### *4.e. Le métabolisme lipidique*

Sachant que la fertilité des femmes souffrant de désordres métaboliques (maigreur, obésité, diabète) est altérée, l'impact du métabolisme lipidique sur la qualité ovocytaire représente une voie d'investigation prometteuse. Une étude rétrospective réalisée dans une clinique d'aide à la procréation a révélé une diminution du diamètre des ovules et une altération du développement embryonnaire préimplantatoire chez les femmes souffrant de surcharge pondérale (Leary, Leese,

& Sturme, 2015). Aussi, chez la vache une augmentation du taux d'acides gras non estérifiés dans le plasma sanguin, le fluide folliculaire ou le milieu de culture altère la maturation ovocytaire et le taux de fécondation. De plus, cela induit une modification du profil d'expression de gènes régulant, entre autres, le métabolisme énergétique, l'apoptose et l'implantation embryonnaire (Leroy et al., 2005; Van Hoeck et al., 2013; Van Hoeck et al., 2015).

Si la corrélation entre l'alimentation de la mère, le contenu lipidique des fluides biologiques (sang, fluide folliculaire) et la qualité ovocytaire est bien établie, l'évaluation de la qualité ovocytaire à partir de l'observation des gouttelettes lipidiques reste imprécise. D'après une étude réalisée chez le bovin, la couleur foncée du cytoplasme ovocytaire est corrélée avec une augmentation du taux de lipides et un meilleur développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste (Jeong et al., 2009). En revanche, une étude réalisée chez la femme montre que le taux de gestation tend à diminuer lorsque le nombre de gouttelettes lipidiques augmente dans les cellules de la granulosa (Raviv et al., 2020). D'après ces différentes observations, plusieurs conclusions peuvent être établies :

- La santé métabolique de la mère influence grandement la qualité ovocytaire. Un taux d'acides gras anormalement élevé dans l'environnement de l'ovocyte altère sa maturation et sa compétence développementale.
- Du fait des différences de composition lipidique des ovocytes de Mammifères, l'extrapolation de résultats entre la femme, la vache et la souris est dangereuse.
- L'utilisation du nombre de gouttelettes lipidiques comme biomarqueur de la qualité ovocytaire est imprécise. En revanche, l'utilisation de critères relatifs au métabolisme lipidique et notamment dans l'environnement proche de l'ovocyte est prometteuse. Cela mérite d'avantage d'investigations.

---

## Chapitre n°5 : La qualité embryonnaire

---

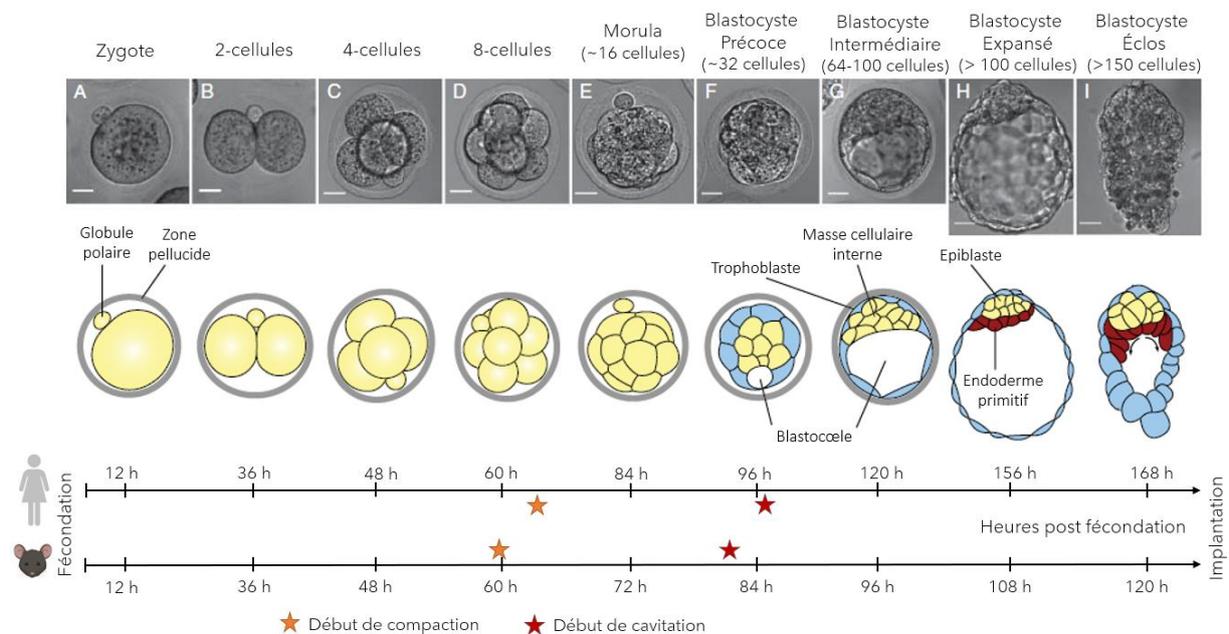
Dans les laboratoires d'AMP, le recours à la stimulation ovarienne est devenu monnaie courante et permet d'obtenir plusieurs ovules au cours d'un même cycle. Après avoir été fécondés, ces ovules deviennent des embryons pouvant être réimplantés. La réimplantation d'un embryon unique permet d'éviter les grossesses multiples, plus risquées, mais nécessite la sélection de l'embryon avec le meilleur potentiel de développement, soulignant l'importance d'identifier des critères de qualité embryonnaire, robustes et reproductibles. Ce chapitre vise à décrire différentes méthodes permettant l'évaluation de la qualité des embryons. Ces méthodes sont qualifiées de non-invasives lorsqu'elles n'ont pas ou peu d'impact sur le développement de l'embryon. Une méthode d'évaluation de la qualité embryonnaire est dite invasive lorsqu'elle risque de perturber le développement de l'embryon, lorsqu'elle nécessite la réalisation de marquages (par exemple le marquage de certaines structures avec des composants fluorescents) ou lorsqu'elle implique la destruction de l'embryon. La plupart des méthodes invasives ne sont pas compatibles avec la réimplantation d'embryon chez la femme.

### I. Le développement embryonnaire préimplantatoire des Mammifères

Le développement embryonnaire préimplantatoire correspond au développement de l'embryon à partir du stade zygote et jusqu'à l'éclosion du blastocyste, étape précédant l'implantation de l'embryon dans la muqueuse utérine. Sa durée varie d'une espèce de Mammifères à l'autre et n'est pas proportionnelle à la durée totale de la gestation. Chez la femme, le stade blastocyste est atteint environ 6,5 jours après la fécondation pour une durée totale de gestation de 280 jours en moyenne. Chez la souris, le blastocyste se forme en 4,5 jours et la naissance des souriceaux a lieu 19 à 21 jours après la fécondation. Malgré les différences chronologiques, plusieurs caractéristiques du développement embryonnaire préimplantatoire sont communes aux différentes espèces de Mammifères. Au cours des vingt heures suivant la fécondation, les pronoyaux se forment puis se rapprochent jusqu'à devenir collés. On parle alors de fusion des pronoyaux, mais les génomes d'origines maternelle et paternelle restent, d'un point de vue épigénétique, distincts jusqu'au stade morula. A la fin du premier cycle cellulaire, les chromosomes de chaque pronoyau se condensent et les membranes nucléaires disparaissent. Les chromosomes s'alignent alors sur une même plaque métaphasique puis se séparent pour former un embryon diploïde qui se divisera par mitoses successives (Beaujean et al., 2010; Duranthon, 2019).

A partir du stade 12-cellules en moyenne chez la femme et 8-cellules chez la souris (Coticchio et al., 2021; Saiz & Plusa, 2013), certaines cellules de l'embryon commencent à fusionner, on parle alors de compaction (Kirkegaard, Agerholm, & Ingerslev, 2012). Le stade morula, respectivement atteint 72 h et 85 h après la fécondation chez la souris et chez la femme, est caractérisé par une compaction totale de l'embryon. L'apparition d'une cavité appelée blastocœle, au cours du processus de cavitation, permet la formation d'un blastocyste comprenant plusieurs types de cellules : les cellules externes qui forment le trophoblaste (ou trophoctoderme), un épithélium à

partir duquel le placenta se développera et les cellules de la Masse Cellulaire Interne (MCI), elles-mêmes divisées en épiblaste qui formera l'embryon à proprement parler, et l'endoderme primitif, précurseur du sac vitellin qui entourera l'embryon. Au cours de l'expansion du blastocyste, les cellules continuent de se diviser et le blastocœle grossit, entraînant une forte augmentation du volume de l'embryon. Ce dernier exerce alors une pression sur la zone pellucide qui finit par se rompre permettant l'éclosion du blastocyste.



**Figure 48 : Chronologie du développement embryonnaire préimplantatoire chez la femme et chez la souris.**

Après la fécondation, le zygote initie une série de divisions mitotiques au cours desquelles le volume total de l'embryon est conservé. Environ 72 h et 84 h après la fécondation chez la souris et la femme respectivement, l'embryon atteint le stade morula, dont les cellules fortement compactées sont difficiles à compter. S'ensuit l'étape de cavitation aboutissant à la formation d'un blastocyste composé du trophoblaste, de la masse cellulaire interne et du blastocœle. L'expansion du blastocyste est caractérisée par une importante augmentation du volume de l'embryon et est suivie par l'éclosion du blastocyste qui sort alors de la zone pellucide pour s'implanter dans la muqueuse utérine. Figure modifiée à partir de (Saiz & Plusa, 2013).

## II. Les méthodes non invasives d'évaluation de la qualité embryonnaire

### 1. Paramètres morpho-cinétiques

#### 1.a. La microscopie « time-lapse »

La principale méthode d'évaluation de la qualité des embryons repose sur des critères morphologiques analysés en fonction du stade de l'embryon en développement, on parle alors de paramètres morpho-cinétiques. L'avènement de la microscopie en temps réel (« time lapse ») intégrée aux incubateurs a permis de grandes avancées dans le domaine puisqu'elle permet d'imager automatiquement les embryons à intervalles de temps réguliers. Non-invasive (ou peu

invasive puisque les embryons sont tout de même éclairés de façon répétée), elle présente l'avantage de suivre le développement des embryons sans les sortir des incubateurs, limitant ainsi les variations de température et de pH des milieux de culture. De plus, le suivi en continu permet l'obtention de données relatives à la cinétique de développement et l'observation d'événements qui évoluent rapidement. L'utilisation de ce type de microscopie est devenue courante et a permis l'obtention d'une grande quantité de données permettant l'évaluation de la compétence développementale d'un embryon.

#### *1.b. Paramètres généraux de classification des embryons*

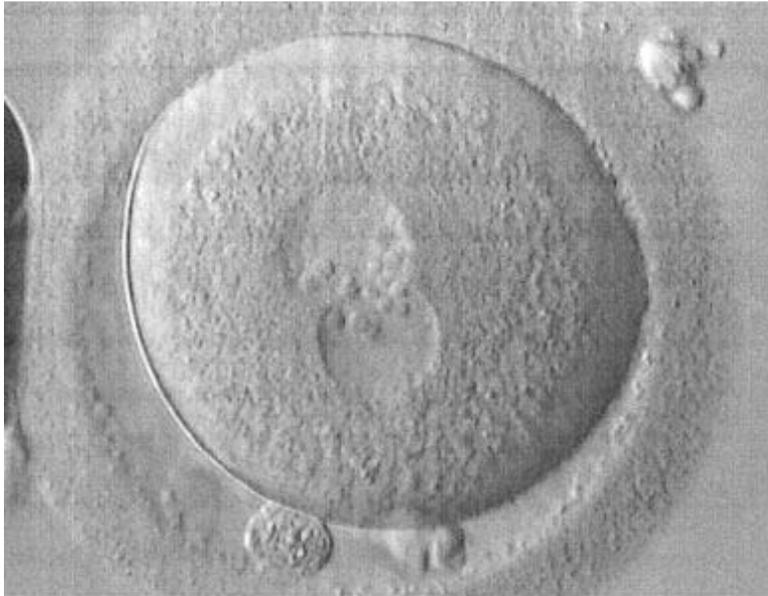
Parmi les multiples critères permettant d'évaluer la qualité d'un embryon d'un point de vue morphologique, certains sont communs à plusieurs stades du développement embryonnaire préimplantatoire. Par exemple, des blastomères multinucléés ou de taille asymétrique, la présence de fragmentation ou de vacuoles sont des éléments communément utilisés dans les laboratoires d'aide médicale à la procréation et associés à une réduction de la capacité des embryons à poursuivre leur développement (Alikani et al., 2000; Alpha Scientists in Reproductive & Embryology, 2011; L. Chen et al., 2022; Khalife, Abu-Musa, Khalil, & Ghazeeri, 2021). D'ailleurs, l'ACE (Association of Clinical Embryologists) et la BFS (British Fertility Society) utilisent une méthode de classification des embryons attribuant une note de 1 à 4 en fonction du pourcentage de fragmentation et de différence de taille des blastomères. Cette méthode a été reprise dans le consensus d'Istanbul de 2011 (Alpha Scientists in Reproductive & Embryology, 2011).

#### *1.c. Evaluation de la qualité des zygotes*

Plusieurs critères morphologiques des zygotes ont une importance particulière dans l'évaluation future de la qualité embryonnaire puisqu'ils renseignent sur l'efficacité de la fécondation. En effet, la formation des pronoyaux, leur rapprochement puis leur « fusion », mais aussi l'extrusion du second globule polaire vont dans le sens d'une fécondation et d'une activation ovocytaire correcte. De façon surprenante, certains zygotes avec un seul pronoyau parviennent tout de même à se développer, bien que le taux de blastocystes soit largement diminué (Araki et al., 2018). Aussi, la présence de trois pronoyaux ou plus peut être signe de polyspermie ou d'absence de formation du second globule polaire, et induit la formation d'embryons aneuploïdes (Embryology & Alpha Scientists in Reproductive Medicine. Electronic address, 2017). La qualité de l'enveloppe nucléaire, la taille des pronoyaux, leur position dans le cytoplasme, mais aussi la cinétique d'apparition du second globule polaire et de fusion des pronoyaux sont des indices supplémentaires de qualité embryonnaire (Aguilar et al., 2014; Alpha Scientists in Reproductive & Embryology, 2011; Araki et al., 2018; Azzarello, Hoest, & Mikkelsen, 2012).

Autre paramètre spécifique au stade zygote, le halo cytoplasmique, observé dès 1997 (Payne, Flaherty, Barry, & Matthews, 1997), correspond à une modification de l'aspect du cytoplasme en périphérie du zygote (Figure 49). Ce phénomène apparaît entre 8 h et 23 h après la fécondation et concerne 67,7 à 88,7 % des embryons (Ebner et al., 2003; Ezoë et al., 2020). Il serait lié à la relocalisation d'organites cytoplasmiques (notamment les mitochondries) qui, après la fécondation, migrent depuis la périphérie vers la région périnucléaire (Ebner et al., 2003).

L'utilisation du halo cytoplasmique comme marqueur prévisionnel de développement embryonnaire a fait l'objet de plusieurs études, mais les résultats sont controversés. En effet, alors que certaines études observent un effet bénéfique sur le développement embryonnaire préimplantatoire et/ou sur le taux d'implantation (Alvarez, Taronger, Garcia-Garrido, & Gonzalez de Merlo, 2008; Ebner et al., 2003; Senn et al., 2006), une étude plus récente incluant 1009 zygotes a montré que la présence de halo cytoplasmique impacte négativement la vitesse de développement préimplantatoire et le taux de blastocyste (Ezoe et al., 2020). Cette même étude a également montré une corrélation entre la durée de présence de halo et le développement des embryons jusqu'au stade blastocyste.



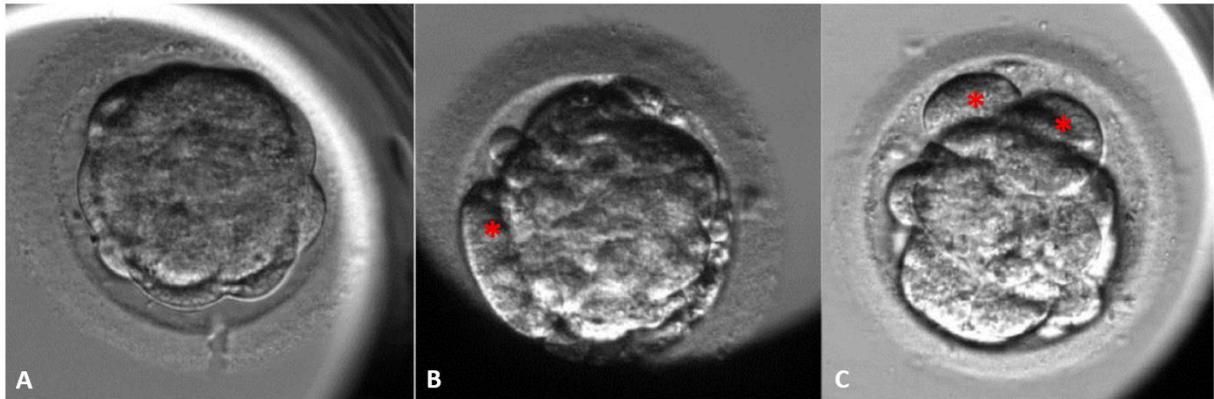
**Figure 49 : Observation d'un halo cytoplasmique dans un embryon de femme au stade zygote.**

Les deux pronoyaux sont clairement visibles au centre de l'embryon. Le halo cytoplasmique apparaît sur toute la périphérie et plus particulièrement en haut à gauche de l'image. Image d'après (Ebner et al., 2003).

#### *1.d. Evaluation de la qualité de la compaction*

Au cours de la compaction embryonnaire, les blastomères initialement sphériques et bien définis se resserrent et augmentent leur surface d'échange. Ce phénomène implique la modification des jonctions intercellulaires et nécessite l'expression de gènes activés après l'EGA. L'impact de la chronologie de compaction sur la qualité des blastocystes formés a été étudiée chez l'Humain en 2014 et révèle que les embryons initiant leur compaction avant le stade 8-cellules ont une plus forte tendance à former des blastocystes de mauvaise qualité (Iwata et al., 2014). Il existe différents profils de compaction embryonnaire : la compaction des blastomères peut être totale (tous les blastomères sont compactés) ou partielle (un ou plusieurs blastomères sont exclus de la compaction) (Figure 50). Dans le cas d'une compaction partielle, l'exclusion du ou des blastomères peut se faire dès le début de la compaction ou bien au cours du processus (Lagalla et al., 2020). Bien que minoritaires (39% des morulas d'après (Coticchio et al., 2021)), les embryons dont la compaction est totale ont un meilleur taux de formation de blastocyste (63% contre ~44% pour les embryons partiellement compactés) (Lagalla et al., 2020). D'ailleurs, l'augmentation du nombre de blastomères exclus de la compaction est corrélée à la diminution du taux de blastocyste (Coticchio et al., 2021). De façon intéressante, une augmentation du taux d'aneuploïdie a été observée dans les blastomères exclus de la compaction, l'exclusion de

blastomères pourrait être un mécanisme d'autocorrection visant écarter les blastomères anormaux et limiter le risque d'aneuploïdie (Lagalla et al., 2017).



**Figure 50 : Images d'embryons humains au stade morula présentant différents profils de compaction.**

A : compaction totale d'un embryon, tous les blastomères sont correctement compactés. B-C : compaction partielle d'un embryon, les embryons exclus de la compaction sont marqués d'un astérisque rouge. Figure d'après (Lagalla et al., 2017).

#### *1.e. Evaluation de la qualité des blastocystes*

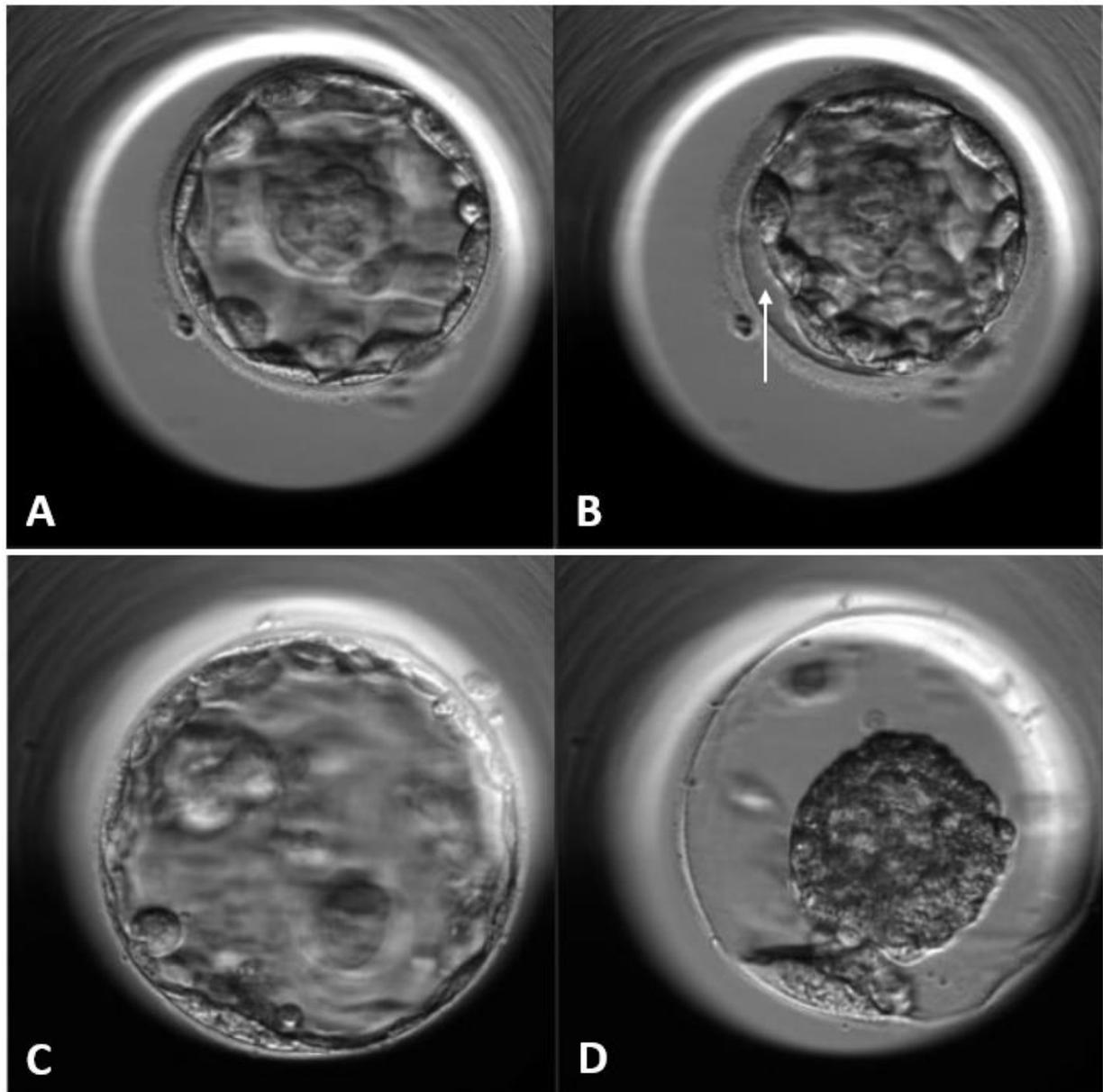
En 1999, les scientifiques Pr David K. Gardner et Dr William Schoolcraft ont publié une méthode d'évaluation de la qualité des blastocystes d'un point de vue morphologique. Bien que légèrement modifiée, cette méthode est aujourd'hui encore largement utilisée. Elle a d'ailleurs été reprise par le consensus d'Istanbul de 2011 (Alpha Scientists in Reproductive & Embryology, 2011) et illustrée dans une revue parue en 2012 dans *Human Reproduction* (Hardarson, Van Landuyt, & Jones, 2012). Elle permet de classer les blastocystes en prenant en compte trois critères : le niveau d'expansion du blastocyste, l'aspect de la masse cellulaire interne et l'aspect du trophoblaste (Tableau 1). L'expansion du blastocyste est caractérisée par une multiplication cellulaire active, mais aussi d'une augmentation significative du volume du blastocœle, conduisant à l'augmentation du volume globale de l'embryon. En fonction de leur niveau d'expansion, les blastocystes sont qualifiés de précoces, intermédiaires, expansés ou éclos.

<i>Critère de classification</i>	<i>Note</i>	<i>Description</i>
<i>Niveau d'expansion du blastocyste</i>	1 : Blastocyste précoce	Le blastocœle occupe moins de 50 % du volume de l'embryon.
	2 : Blastocyste intermédiaire	Le blastocœle occupe au minimum 50 % du volume de l'embryon et la zone pellucide est épaisse.
	3 : Blastocyste expansé	Le blastocœle occupe l'intégralité du volume de l'embryon et la zone pellucide est fine.
	4 : Blastocyste éclos	L'embryon est entièrement sorti de la zone pellucide.
<i>Aspect de la masse cellulaire interne</i>	1 : Qualité optimale	Les cellules de la MCI sont correctement compactées.
	2 : Qualité moyenne	Certaines cellules de la MCI sont mal compactées.
	3 : Mauvaise qualité	Peu de cellules de la MCI sont correctement compactées.
<i>Aspect du trophoblaste</i>	1 : Qualité optimale	Le trophoblaste contient de nombreuses cellules avec une forte cohésion entre elles.
	2 : Qualité moyenne	Certaines cellules ont une mauvaise cohésion ce qui forme un épithélium relâché.
	3 : Mauvaise qualité	Le trophoblaste contient peu de cellules et la cohésion inter-cellulaire est faible.

**Tableau 1 : Critères de classification des blastocystes, adaptés de la méthode de DK. Gardner et W. Schoolcraft.**

Cette méthode permet l'évaluation de la qualité des blastocystes sur des critères morphologiques, en prenant en compte le niveau d'expansion des blastocystes et l'aspect de la masse cellulaire interne et du trophoblaste. Cette version est la version publiée dans le consensus d'Istanbul de 2011, adaptée de la méthode de DK. Gardner et W. Schoolcraft (Alpha Scientists in Reproductive & Embryology, 2011).

L'observation de l'expansion des blastocystes en microscopie time lapse a permis d'observer un phénomène de contractions spontanées des blastocystes chez plusieurs espèces de Mammifères, dont la femme et la souris. Dans les blastocystes non contractés, l'espace périvitellin n'est pas visible, les cellules du trophoblaste sont étirées et aplaties et la masse cellulaire interne est ovale ou cubique. Lors d'une contraction d'un blastocyste, les cellules du trophoblaste se compriment, l'espace périvitellin apparaît et la masse cellulaire interne prend une forme mal définie. La taille de l'espace périvitellin, le pourcentage de cellules du trophoblaste décollées de la zone pellucide et la différence de volume du blastocyste sont différents paramètres permettant de quantifier l'intensité des contractions (**Figure 51**). Une étude réalisée chez la souris et utilisant un inhibiteur de MLCK (Myosin Light-Chain Kinase), suggère que l'intensité, mais pas la fréquence des contractions des blastocystes, dépend de l'état de phosphorylation des chaînes légères des myosines (Niimura, 2003). De plus, les mêmes auteurs ont montré que la ré-expansion des blastocystes dépend du transport et de l'accumulation du Na<sup>+</sup> depuis le trophoblaste vers le blastocœle. Enfin, il semblerait que, chez la souris, les contractions de faible intensité favorisent l'éclosion des blastocystes, à l'inverse des contractions de forte intensité qui auraient un effet inhibiteur de l'éclosion (Niimura, 2003). Ces résultats concordent avec les études rétrospectives réalisées chez la femme et qui indiquent que la présence d'au moins une contraction forte des blastocystes est associée à une diminution du taux de grossesse, sachant qu'une contraction de blastocyste est considérée comme forte si plus de 50 % des cellules du trophoblastes se décollent de la zone pellucide (Marcos et al., 2015) ou bien si le volume du blastocyste est réduit d'au moins 50 % (Romualdo Sciorio et al., 2020), (**Figure 51**). De plus, la taille du blastocyste lors de son expansion maximale est positivement corrélée au taux de gestation chez la femme (R. Sciorio, Thong, Thong, & Pickering, 2021).



**Figure 51 : Observation, par microscopie time lapse, des contractions de blastocystes humains.**

Les images A et B représentent un blastocyste avant (A) et pendant (B) une contraction de faible intensité au cours de laquelle le volume total du blastocyste diminue peu, et où plus de 50 % des cellules du trophoblaste restent collées à la zone pellucide. L'espace périvitellin devenu visible et est marqué d'une flèche. Les images C et D représentent un blastocyste avant (C) et pendant (D) une contraction de forte intensité au cours de laquelle l'intégralité des cellules du trophoblaste se décollent de la zone pellucide et le volume du blastocyste est diminué de plus de 50 %. Images d'après (Romualdo Sciorio et al., 2020).

*1.f. Impact de la cinétique du développement embryonnaire préimplantatoire sur le devenir de l'embryon*

L'utilisation de la microscopie time lapse présente un intérêt certain dans l'étude de la cinétique de développement embryonnaire puisqu'elle permet de mesurer des intervalles de temps entre deux événements, même courts. Les études détaillées de cinétique embryonnaire

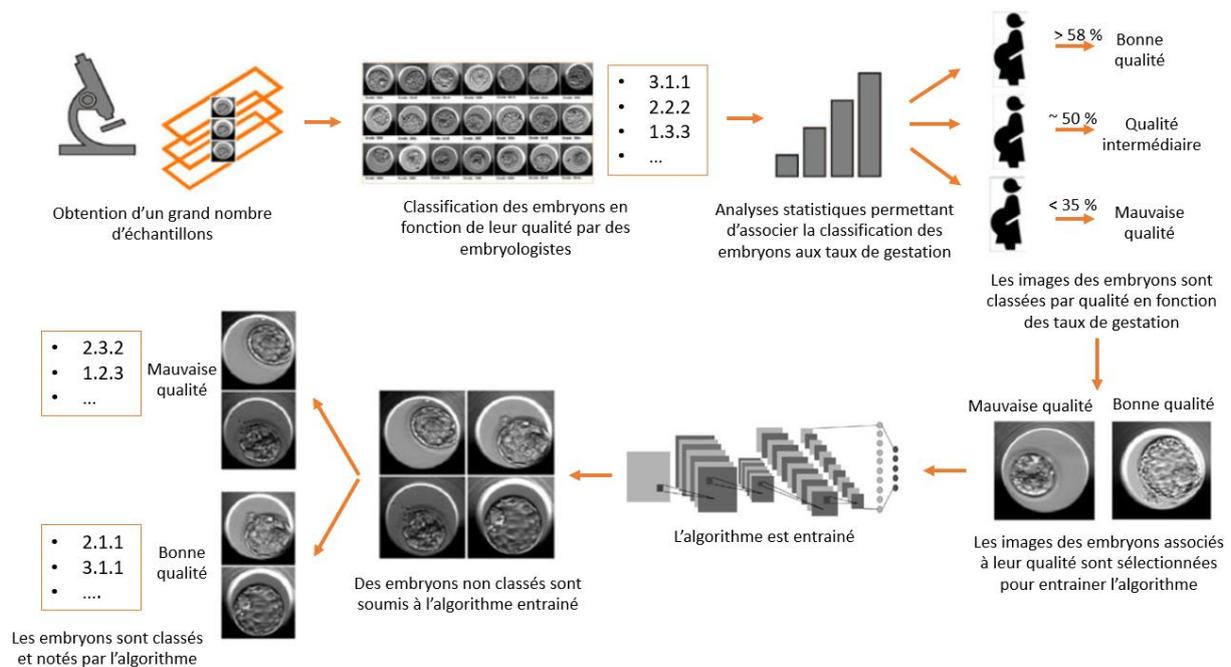
ont permis l'identification de marqueurs cinétiques associés à un bon pronostic de développement. De manière générale, les embryons dont la vitesse de développement se situe dans la moyenne haute ont de meilleures chances d'implantation. Plus précisément, la cinétique des événements suivants est régulièrement associée à une bonne qualité embryonnaire :

- Extrusion du second globule polaire rapide (Payne et al., 1997).
- Formation et disparition rapide des pronoyaux (Lemmen, Agerholm, & Ziebe, 2008; Payne et al., 1997).
- Passages aux stades 2, 3, 4 et 5 cellules précoces (Bartolacci et al., 2021; Cruz et al., 2012; Meseguer et al., 2011; Wong et al., 2010).
- Synchronicité des divisions entre 2 et 4-cellules et entre 4 et 8-cellules (Bartolacci et al., 2021; Cruz et al., 2012; Meseguer et al., 2011; Wong et al., 2010).
- Initiation précoce de la compaction et de la blastulation (Storr et al., 2015).
- Rapidité de la compaction et de l'expansion des blastocystes (Storr et al., 2015).

Il est tout de même important de garder à l'esprit que le développement d'un embryon de manière anormalement rapide est un marqueur de mauvaise qualité embryonnaire. D'ailleurs, le taux d'implantation des embryons qui se développent en moins de 5 h entre les stades 2 et 3-cellules est significativement réduit (Rubio et al., 2012). De plus, la réalisation de mitoses trichotomes, au cours desquelles un blastomère se divise en formant trois cellules, est qualifiée d'anomalie de clivage et associée à une diminution du taux d'implantation (Y. L. Fan, Han, Wu, Wang, & Huang, 2016; Ferraretto et al., 2021).

#### *1.g. Les nouvelles technologies au service du développement embryonnaire*

Le suivi du développement embryonnaire en temps réel implique l'accumulation d'une importante quantité de données à analyser. En plus d'être très coûteuse en temps et en énergie, l'analyse de ces données est sujette à une variabilité d'interprétation dépendante des expérimentateurs. De façon à faciliter et à homogénéiser ces analyses, différents algorithmes peuvent être utilisés et permettent de noter les embryons en fonction de leur potentiel de développement (Milewski & Ajduk, 2017). L'intelligence artificielle repose sur des méthodes d'apprentissage automatique où des algorithmes sont entraînés à détecter des marqueurs de bonne ou mauvaise qualité embryonnaire afin de sélectionner les embryons dont les chances de développement sont les meilleures. C'est ce qu'on appelle l'apprentissage profond ou « deep learning » (Figure 52). De cette façon, les intelligences artificielles sont entraînées à détecter des anomalies de clivage, de morphologie ou de vitesse de développement et sont capables d'analyser la qualité des blastocystes. L'utilisation d'outils microscopiques associés à de puissants algorithmes va d'ailleurs plus loin, des scientifiques ont réussi à corrélérer la dynamique cytoplasmique avec les vagues calciques et la qualité embryonnaire (Ajduk et al., 2011; Milewski, Szpila, & Ajduk, 2018) tandis que d'autres travaillent sur la détection des aneuploïdies de manière totalement non-invasive (Chavez-Badiola, Flores-Saiffe-Farias, Mendizabal-Ruiz, Drakeley, & Cohen, 2020; C. I. Lee et al., 2021). Ces outils nécessitent d'être améliorés, mais les résultats sont prometteurs.



**Figure 52 : Schéma simplifié illustrant l'apprentissage d'une intelligence artificielle pour l'évaluation de la qualité embryonnaire.**

Des images d'embryons à réimplanter sont d'abord analysées par des professionnels du développement embryonnaire afin de classer les embryons selon leur qualité. Après avoir réalisé une corrélation entre la classe des embryons et le taux de gestation, les images des embryons et leur qualité associée sont utilisées pour entraîner l'algorithme. Après apprentissage, l'algorithme est utilisé pour évaluer automatiquement la qualité de nouveaux embryons. Les résultats obtenus à partir de l'algorithme entraîné permettent de guider les embryologistes dans le choix de l'embryon à réimplanter. Schéma inspiré de (Khosravi et al., 2019).

## 2. Analyse du milieu de culture : les microARN

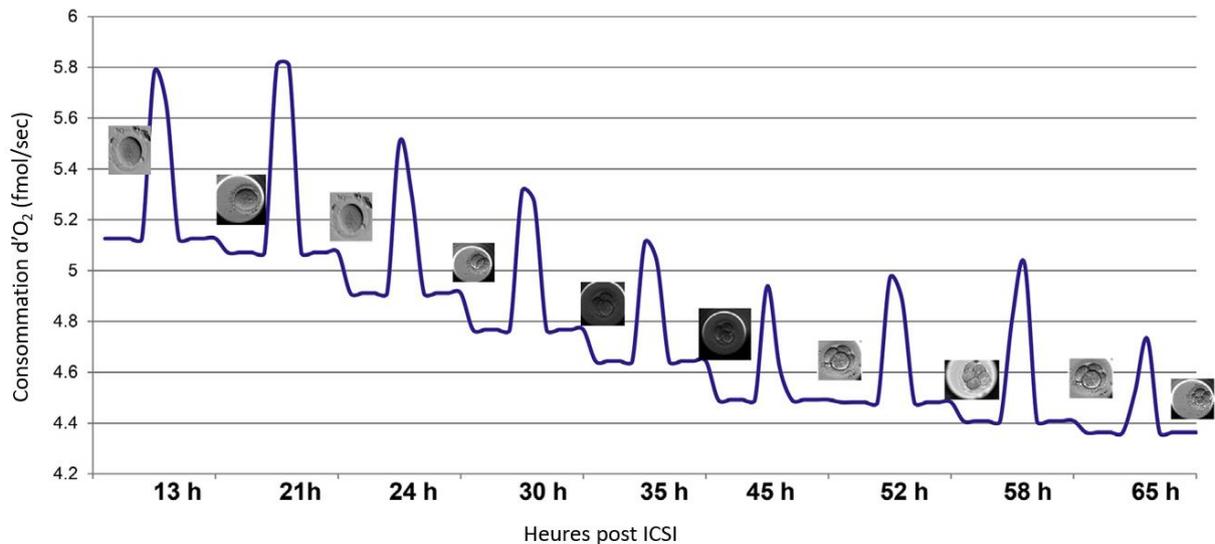
Les microARN (miARN) sont des petits ARN simple brin non codants qui participent à la régulation post-transcriptionnelle de l'expression de gènes. D'une longueur de 20 à 25 nucléotides, ces miARN s'apparient à des ARN messagers cibles par complémentarité de séquences et empêchent la synthèse de la protéine, soit par dégradation de l'ARNm cible, soit par inhibition de la traduction. Les miARN sont impliqués dans la régulation de multiples processus biologiques dont la prolifération et la différenciation cellulaire, le métabolisme ou encore l'apoptose et sont associés à certaines maladies et en particulier les cancers. Les miARN sont exprimés dans les ovules et dans les embryons et sont essentiels au développement embryonnaire (Tang et al., 2007). Chez l'Humain, un panel de miARN dont miR-19b sont différemment exprimés dans des blastocystes morphologiquement normaux issus de femmes atteintes d'un syndrome des ovaires polykystiques (McCallie, Schoolcraft, & Katz-Jaffe, 2010). Les miARN sont sécrétés par les blastocystes (et plus spécifiquement par les cellules du trophoblaste) et se retrouvent alors dans les milieux de culture où ils peuvent être dosés et utilisés comme marqueurs de qualité. En 2017 et 2020, Masood Abu-Halima ont identifié des miARN dont l'abondance dans les milieux de culture des embryons de femmes diffère selon le pronostic implantatoire. Parmi ces miARN, ils

retrouvent miR-19b et identifient deux nouveaux mi-ARN : miR-634 et miR-29c-3p (Abu-Halima et al., 2017; Abu-Halima et al., 2020). De la même façon, l'augmentation de l'expression de miR-191-5p et hsa-miR-199a-5p et la diminution de hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-432-5p dans les milieux de cultures des blastocystes ont été associés à de meilleurs taux de grossesses (Acuna-Gonzalez et al., 2021; F. Fang et al., 2021; S. Wang, Chen, Zhu, & Jiang, 2021).

### 3. L'analyse du milieu de culture : les paramètres métaboliques

#### 3.a. Le métabolisme énergétique de l'embryon

Au cours des premiers stades du développement embryonnaire préimplantatoire, le volume de l'embryon n'augmente pas et les besoins énergétiques sont relativement réduits. De ce fait, la consommation moyenne d'oxygène et l'activité glycolytique sont faibles. D'après l'hypothèse de l'embryon silencieux connue sous le terme anglais « the quiet embryo hypothesis », la faible consommation d'oxygène permet de limiter la production d'espèces réactives de l'oxygène et ainsi limiter les dommages causés par le stress oxydatif, notamment sur l'ADN mitochondrial qui est mal protégé et dont les capacités de réparation sont limitées (Leese, 2012; Leese, Baumann, Brison, McEvoy, & Sturmey, 2008). Cependant, des analyses de consommation d'oxygène en temps réel, couplées à de la microscopie time lapse, ont montré des augmentations ponctuelles de la consommation d'oxygène qui apparaissent au moment de la formation des pronoyaux et à chaque mitose. Il est alors possible de distinguer les phases passives du développement embryonnaire où la consommation d'oxygène est faible, des phases actives caractérisées par une augmentation de la consommation d'oxygène (**Figure 53**). Ces pics de consommation d'oxygène permettent de subvenir aux besoins énergétiques ponctuellement plus élevés des embryons en cours de division (Tejera et al., 2016). L'initiation de la compaction embryonnaire s'accompagne d'une forte augmentation des besoins énergétiques qui seront comblés par une importante augmentation de la consommation d'oxygène, de pyruvate et de glucose. Cette élévation du métabolisme énergétique est maintenue au stade blastocyste (Thompson, Partridge, Houghton, Cox, & Leese, 1996).



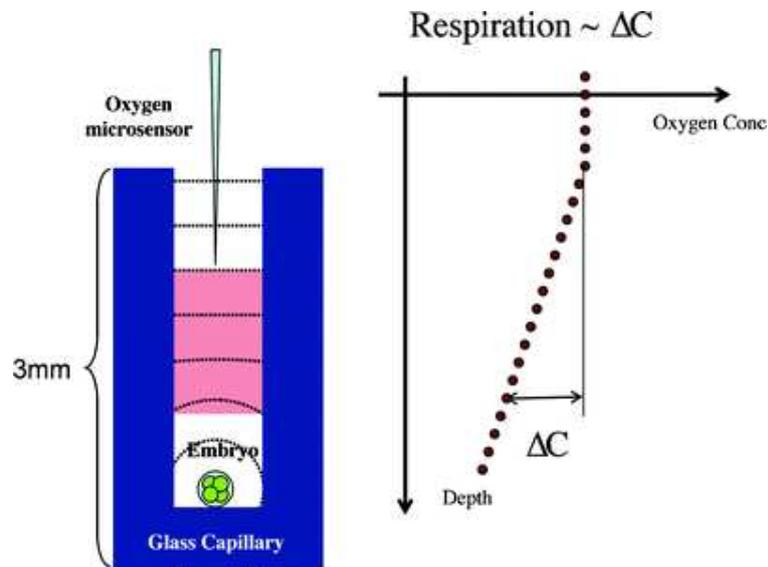
**Figure 53 : Evolution de la consommation d'oxygène d'un embryon entre le stade zygote et le stade 8-cellules.**

Au cours des premières mitoses embryonnaires, la consommation d'oxygène de l'embryon est soumise à des augmentations transitoires corrélées à des événements spécifiques du développement, tels que la formation des pronoyaux ou la mitose. Ces augmentations de consommation d'oxygène permettent de fournir l'énergie nécessaire à la réalisation correcte des événements associés. Figure d'après (Tejera et al., 2016).

### *3.b. La consommation d'oxygène comme marqueur de qualité embryonnaire*

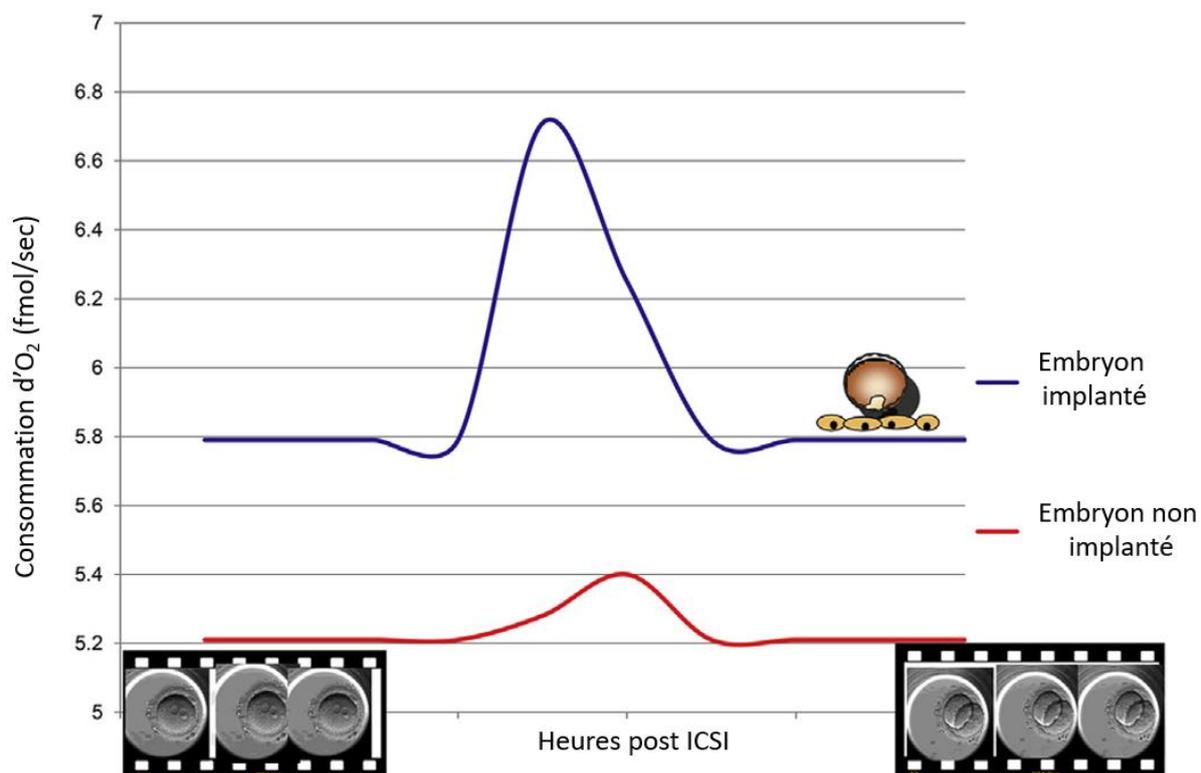
La consommation d'oxygène d'un embryon unique peut être estimée de manière non invasive en mesurant le gradient de concentration en oxygène dans l'environnement proche de cet embryon (Lopes, Greve, et al., 2007) (Figure 54). Cette mesure est pertinente à réaliser car au stade blastocyste, il existe une corrélation entre la quantité d'oxygène consommée par l'embryon et son potentiel de développement et d'implantation. Cette caractéristique est conservée parmi différentes espèces dont l'Homme (Yamanaka et al., 2011), le bovin (Abe, 2007; Lopes, Madsen, et al., 2007) ou bien le porc (Sakagami et al., 2015; Sugimura et al., 2010). Il est tout de même important de noter que la consommation d'oxygène des blastocystes dépend du nombre total de cellules, du ratio entre le nombre de cellules de la masse cellulaire interne et du trophoblaste, mais aussi des conditions d'obtention et de culture des embryons (Lopes, Madsen, et al., 2007; Sakagami et al., 2015; Sugimura et al., 2010). Cela souligne l'importance de l'homogénéité des échantillons comparés. Le lien entre la consommation d'oxygène et la qualité embryonnaire avant le stade morula est plus difficile à établir et les résultats plus contradictoires (Ottosen, Hindkjaer, Lindenberg, & Ingerslev, 2007; Tejera et al., 2011). Cela peut s'expliquer par une plus grande variabilité des mesures du fait de la faible consommation d'oxygène des embryons au début du développement préimplantatoire, mais aussi par les importantes variations de consommation d'oxygène décrites précédemment. De ce fait, il est nécessaire de réaliser des mesures de consommation d'oxygène en temps réel afin de détecter des variations interprétables. De cette manière, Alberto Tejera et ses collègues ont réussi à mettre en évidence des différences de consommation d'oxygène au cours des premiers clivages et de façon dépendante du potentiel

d'implantation des embryons. Ces différences sont observées à la fois dans les phases dites actives et dans les phases dites passives (Tejera et al., 2016), (Figure 55).



**Figure 54 : Représentation schématique du système permettant de mesurer la consommation d'oxygène d'un embryon.**

En respirant, l'embryon consomme de l'oxygène et génère un gradient de concentration en oxygène qui augmente de façon linéaire en s'éloignant de l'embryon. Les mesures de concentration en oxygène sont réalisées à l'aide d'un micro-senseur, à différentes distances de l'embryon (zone colorée en rose), et permettent d'évaluer le taux de respiration de l'embryon. Figure d'après (Lopes, Greve, et al., 2007).



**Figure 55 : Le profil de consommation d'oxygène au cours des premières divisions embryonnaires varie en fonction du potentiel d'implantation de l'embryon.**

Au cours des premières divisions, la consommation d'oxygène des embryons ayant réussi à s'implanter dépassait celle des embryons non implantés. Cette observation est valable dans les phases actives et dans les phases passives et se traduit par un pic de consommation d'oxygène plus élevé. Figure d'après (Tejera et al., 2016).

### 3.c. D'autres marqueurs métaboliques associés à la qualité embryonnaire

En plus de la consommation d'oxygène, d'autres marqueurs du métabolisme de l'embryon tels, que la consommation de glucose et de pyruvate (Gardner, Lane, Stevens, & Schoolcraft, 2001; Gardner, Wale, Collins, & Lane, 2011), la production de lactate (Y. S. Lee, Thouas, & Gardner, 2015) ou bien l'utilisation de certains acides aminés, peuvent aider à prédire la qualité de ce dernier. Ces résultats encouragent la réalisation d'analyses plus poussées du métabolisme embryonnaire. La métabolomique est un nouveau membre des techniques dites « omiques » qui regroupent la génomique (analyse de l'ADN), la transcriptomique (analyse de l'ARN) et la protéomique (analyse des protéines). Elle permet d'identifier et de quantifier les métabolites (substances de petite taille formées au cours du métabolisme) contenus dans l'environnement de l'embryon (milieu de culture ou fluide folliculaire), et ainsi établir le profil métabolique de l'embryon. Ce profil métabolique dépend de plusieurs facteurs dont l'espèce, le stade de développement embryonnaire, ou encore les conditions de cultures (Krisher et al., 2015). Dans une revue parue en 2015, Tina Rødgaard et ses collègues recensent différents biomarqueurs métaboliques prometteurs dans l'évaluation de la qualité embryonnaire (Rodgaard, Heegaard, & Callesen, 2015). Bien qu'encourageants, ces résultats manquent de reproductibilité et les contraintes

techniques et financières associées aux outils de métabolomique rendent la méthode difficile à mettre en place au niveau clinique.

### III. Les méthodes invasives d'évaluation de la qualité embryonnaire

#### 1. Le diagnostic préimplantatoire

Le diagnostic préimplantatoire (DPI) s'adresse à des couples porteurs d'anomalies génétiques connues et susceptibles de donner naissance à un enfant atteint d'une maladie génétique grave et incurable. Il consiste à rechercher une anomalie génétique à partir d'une ou plusieurs cellules prélevée(s) sur un embryon obtenu par FIV ou ICSI, dans le but d'identifier le ou les embryon(s) sain(s) pouvant être réimplanté(s) et de rejeter les embryons anormaux. C'est la seule méthode d'évaluation de la qualité embryonnaire qualifiée d'invasive mais compatible avec la réimplantation chez la femme. Trois types de biopsie embryonnaire peuvent être proposés (Griffin & Ogur, 2018). La biopsie de globule polaire est la technique la moins invasive puisque les globules polaires sont voués à se dégrader. Réalisée au stade zygote, elle présente l'avantage de laisser plus de temps pour l'analyse génétique mais ne peut pas être utilisée pour des anomalies d'origine paternelle et ne permet pas de détecter les erreurs post-méiotiques. La biopsie de blastomère au cours des premières mitoses se réalise au 3<sup>ème</sup> jour post fécondation sur un embryon contenant au moins 6 blastomères. En général, un seul blastomère est prélevé, le prélèvement de deux blastomères peut être envisagé au cas par cas pour limiter le risque de faux négatif et pallier les problèmes techniques, mais cela diminue le potentiel implantatoire de l'embryon. Enfin, la biopsie au stade blastocyste consiste à prélever 2 à 10 cellules du trophoblaste. En plus d'obtenir davantage de matériel, la biopsie sur blastocyste permet de sélectionner naturellement les meilleurs embryons puisque ceux qui n'atteignent pas le stade blastocyste sont éliminés. En revanche, cette technique nécessite la congélation quasi systématique des embryons car l'obtention des résultats des analyses génétiques n'est pas compatible avec la fenêtre d'implantation embryonnaire.

Dans un embryon, il est possible et même fréquent que certaines cellules soient aneuploïdes alors que les autres sont diploïdes. On parle alors de mosaïsme. Ce phénomène est souvent détecté dans les embryons au cours des trois premiers jours de développement et n'est pas toujours délétère pour le futur individu puisque les cellules aneuploïdes peuvent être naturellement éliminées avant l'implantation. Une biopsie réalisée de manière précoce peut ainsi détecter une aneuploïdie potentiellement non délétère induisant l'élimination d'un embryon de bonne qualité (Griffin & Ogur, 2018).

Bien que la biopsie de blastomère soit une méthode courante et bien maîtrisée, elle n'est pas sans risque pour le développement embryonnaire. Chez la souris, la biopsie de blastomère induit des retards de développement embryonnaire préimplantatoire et d'éclosion et diminue le potentiel d'implantation (Scott, Upham, Forman, Zhao, & Treff, 2013; Sugawara & Ward, 2013; Ugajin et al., 2010). Aussi, toujours chez la souris, les nouveaux nés issus d'un transfert d'embryons biopsiés sont, à la naissance et à l'âge adulte, plus lourds que les nouveaux nés issus d'embryons

non biopsiés (conception naturelle ou développement *in vitro*) et présentent des comportements de types anxiété (Sampino et al., 2014). Notons que les embryons utilisés dans cette étude ont été obtenus en absence de stimulation ovarienne afin de s'affranchir des effets de la stimulation sur la masse de naissance. Ces résultats ne sont pas retrouvés chez l'Humain où l'ICSI est associée à une diminution de la masse de naissance des nourrissons, paramètre non exacerbé par la réalisation de biopsie de blastomère et possiblement lié à la stimulation ovarienne (Eldar-Geva et al., 2014; M. He, Sun, Wang, & Sui, 2022; Liebaers et al., 2010; Sunkara, Antonisamy, Selliah, & Kamath, 2017). De plus, la réalisation d'un diagnostic préimplantatoire ne semble pas perturber le développement des enfants (Kuiper et al., 2018), bien que nous manquions encore de recul.

## 2. Etude du profil d'expression des gènes dans les embryons

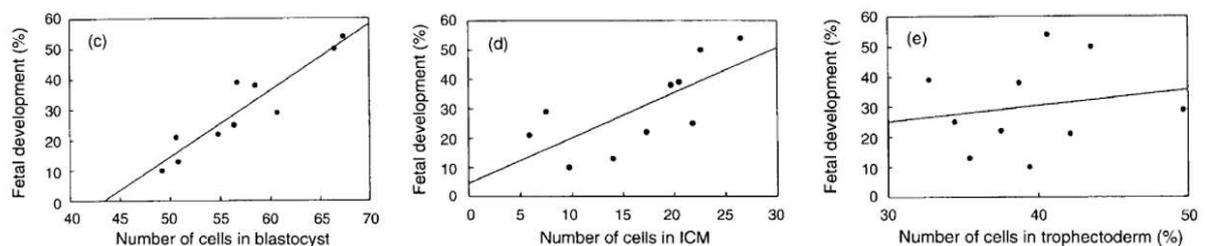
Au cours du développement embryonnaire préimplantatoire, trois périodes sont marquées par d'importantes modifications du profil d'expression des gènes. La première correspond à l'activation du génome embryonnaire et comprend une phase mineure et une phase majeure. La deuxième période concorde avec l'initiation de la compaction de l'embryon au stade 8-cellules. Enfin, la troisième période a lieu lors de la formation du blastocyste et de la différenciation cellulaire à l'origine de la formation de la masse cellulaire interne et du trophoblaste. L'exécution correcte des changements d'expression de gènes est primordiale à la formation d'un embryon de qualité. De ce fait, des modifications de l'expression de certains gènes clés du développement embryonnaire peuvent servir de marqueur de qualité (Hamatani, Carter, Sharov, & Ko, 2004; M. S. Ko et al., 2000).

La quantification de l'expression d'un gène dans une cellule nécessite d'avoir accès à l'ARNm et implique la lyse de la cellule. Ces études sont donc principalement réalisées sur des modèles animaux puisque chez l'Humain, seuls les embryons donnés pour la recherche peuvent être analysés. Chez les bovins, le type de fécondation (FIV ou ICSI) (Arias, Risopatron, Sanchez, & Felmer, 2015) ou bien le milieu de culture utilisé pour le développement embryonnaire *in vitro* (Cordova et al., 2014) impactent le potentiel de développement des embryons et sont associés à des modifications d'expression de gènes au stade blastocyste. Parmi ces gènes se trouvent des régulateurs clés de la prolifération cellulaire et/ou de l'apoptose (*BIRC5*, *BAX*, *IGF2*, *TP53*, *HSPA9B*), du métabolisme (*SCD1*, *GLUT1*), du stress oxydant (*CAT*, *SOD2*, *GPX1*) ou encore des gènes particulièrement important pour le développement embryonnaire dont *POU5F1* qui code pour OCT4, un marqueur de pluripotence responsable du renouvellement des cellules souches embryonnaires et *INFt* qui code pour une protéine sécrétée par le blastocyste et qui permet de maintenir la production de progestérone au début de la gestation. De la même façon, le milieu de culture des embryons de souris (Moreira et al., 2006) ou bien la santé métabolique de la mère (Bermejo-Alvarez, Rosenfeld, & Roberts, 2012) sont liés à une modification de l'expression des gènes *Glut1*, *Glut5*, *G6pdh*, *Bax*, *Birc5*, *Gpx1*, *Pou5f1*, *Igf2* dans les blastocystes. Chez l'humain, le potentiel de développement d'un blastocyste est corrélé à l'expression des IGF et de leurs récepteurs dans cet embryon (H. C. Liu et al., 1997).

Les gènes identifiés sont parfois appelés « gènes marqueurs de qualité embryonnaire ». Notons tout de même que l'expression d'un gène peut varier dans le même sens dans un embryon qualifié de bonne qualité et dans un embryon en souffrance. Par exemple, une étude de 2008 a montré une augmentation de l'expression de *Birc5* (gène codant pour un inhibiteur de l'apoptose) dans des blastocystes bovins de meilleure qualité d'un point de vue morphologique (Jeon et al., 2008). D'après les auteurs, cette augmentation de l'expression de *birc5* est associée à une bonne qualité embryonnaire, liée à une augmentation des capacités de lutte contre l'apoptose. Or, dans une autre étude, l'expression de *Birc5* est augmentée dans des blastocystes bovins ayant été vitrifiés et dans lesquels le niveau d'apoptose est augmenté (S. Y. Park et al., 2006). Dans ce second exemple, l'augmentation de l'expression de *Birc5* n'est pas un signe de bonne qualité embryonnaire et l'utilisation du terme « gène marqueur de qualité » peut porter à confusion.

### 3. Quantification des blastomères dans les blastocystes

Dans un article paru en 1997, David K. Gardner et son collègue M. Lane ont observé une corrélation positive entre le nombre total de cellules dans un blastocyste de souris et son taux de développement après réimplantation. Cette corrélation est également observée lorsqu'on étudie uniquement le nombre de cellules de la masse cellulaire interne et est nettement moins flagrante avec les cellules du trophoblaste (Lane & Gardner, 1997) (Figure 56).



**Figure 56 : Corrélation entre le nombre de cellules d'un blastocyste et son potentiel de développement.**

Chez la souris, le nombre de cellules totales d'un blastocyste est associé à un meilleur taux de développement après réimplantation, probablement du fait d'une meilleure croissance embryonnaire. Cette corrélation existe également entre le nombre de cellules de la masse cellulaire interne et le taux de développement embryonnaire mais s'efface lorsque seules les cellules du trophoblaste sont étudiées. Figures d'après (Lane & Gardner, 1997).

Depuis cela, l'étude du nombre de cellules totales des blastocystes et le ratio entre le nombre de cellules de la masse cellulaire interne et le nombre de cellules du trophoblaste est régulièrement utilisée en recherche sur modèles animaux (Bang et al., 2015; I. Choi, Dasari, Kim, & Campbell, 2015; Knijn et al., 2003) mais pas dans les laboratoires d'AMP puisque cette analyse nécessite un marquage cellulaire. Ces marquages peuvent se faire par immunofluorescence avec, par exemple, un anticorps anti-OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) pour marquer la masse cellulaire interne et un anticorps anti-CDX2 (Caudal-type homeobox) pour marquer le trophoblaste (I. Choi et al., 2015; Cui et al., 2019). Chez l'humain, le nombre de cellules total d'un blastocyste peut être indirectement estimé par la mesure du diamètre de l'embryon (Kocyigit &

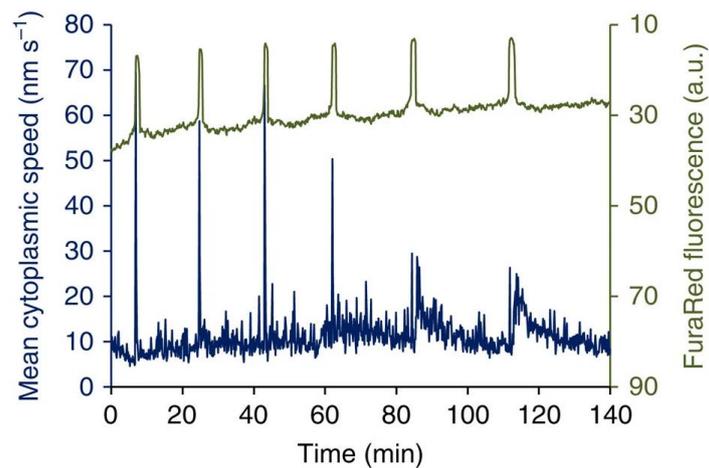
Cevik, 2016; Mori, Otoi, & Suzuki, 2002), bien que moins informative, cette méthode présente l'avantage d'être non invasive et donc compatible avec la réimplantation embryonnaire.

#### 4. Etude de l'intégrité chromosomique

En plus de la FISH, technique couramment utilisée dans le diagnostic de l'aneuploïdie, différentes méthodes existent pour évaluer l'intégrité du matériel génétique dans les embryons. Les dommages de l'ADN peuvent être étudiés par des tests de Tunel, par l'observation de micronoyaux ou encore par des marquages de la chromatine. Par exemple, des cassures double brin de l'ADN peuvent être mises en évidence avec un marquage des histones H2A.X phosphorylées (Baran & Pisko, 2022) et des anomalies de ségrégation des chromosomes peuvent être mises en évidence par des marquages des histones H2B (Yao et al., 2018).

#### 5. Etude des vagues calciques

Comme décrit précédemment, la libération oscillante de calcium en réponse à l'entrée du spermatozoïde dans l'ovule est un élément essentiel puisqu'elle déclenche une série de réactions nécessaires au développement de l'embryon et regroupées sous le nom d'activation ovocytaire (voir le chapitre 2.II « *L'activation ovocytaire* »). Chez le lapin et la souris, l'inhibition des oscillations calciques ou la modification de leur nombre, de leur fréquence ou de leur intensité modifie le profil d'expression des blastocytes, affecte l'implantation des embryons et perturbe leur développement, notamment post-implantatoire (Ozil et al., 2006; Ozil & Huneau, 2001; Rogers et al., 2006). Le nombre, la fréquence et l'intensité des oscillations calciques pourraient être utilisés pour prédire la compétence de développement des embryons, mais le marquage du calcium (généralement avec des molécules de type fluo-4) n'est pas compatible avec la réimplantation des embryons chez la femme. Cependant, l'observation des mouvements cytoplasmiques causés par les contractions du cytosquelette au cours des oscillations calciques (**Figure 57**) représente une méthode alternative efficace et non invasive permettant l'évaluation de la qualité embryonnaire grâce à l'étude des oscillations calciques (Ajduk et al., 2011; Milewski et al., 2018).



**Figure 57 : Corrélation entre la dynamique cytoplasmique et les oscillations calciques suite à la fécondation d'un ovule de souris.**

L'observation simultanée de la libération de calcium (vert) et de la dynamique cytoplasmique (bleu) dans un ovule de souris tout juste fécondé, permet de mettre en évidence la juxtaposition de ces deux évènements. L'observation des oscillations calciques pourrait donc se faire à travers l'observation de la dynamique cytoplasmique, une alternative non invasive applicable chez l'humain. Figure d'après (Ajduk et al., 2011).

---

## Chapitre n°6 : Les facteurs influençant la qualité ovocytaire et embryonnaire

---

### I. L'infertilité

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'infertilité est une anomalie du système reproducteur féminin ou masculin, caractérisée par une incapacité à concevoir un bébé après 12 mois ou plus de rapports sexuels réguliers et non protégés. Cela affecte environ 180 millions de personnes dans le monde et 3,3 millions de personnes en France, soit 19 à 30 % des couples essayant de procréer ("Rapport sur les causes d'infertilité," 2022; Slama et al., 2012). La hausse de la prévalence et les conséquences de l'infertilité, tant sur la population générale que sur les individus concernés, font de cette pathologie un enjeu majeur de santé publique. Les origines de l'infertilité peuvent être féminines, masculines, mixtes ou idiopathiques.

Chez la femme, l'infertilité, d'origine congénitale ou acquise, peut résulter d'une multiplicité de causes, souvent combinées. Ces causes peuvent être, entre autres :

- Des dysfonctions du système hypothalamo-hypophysaire responsable d'une dérégulation de la production de gonadotrophines,
- Une obstruction du col de l'utérus (sténose cervicale) ou des trompes de Fallope, empêchant la migration correcte des spermatozoïdes,
- Des pathologies inflammatoires (ex : endométriose),
- Des pathologies ovariennes (ex : syndrome des ovaires polykystiques responsable de troubles du cycle menstruel et de l'ovulation, insuffisance ovarienne précoce),
- Des atteintes ovocytaires (échec de maturation ovocytaire).

### II. Les causes d'altération de la qualité ovocytaire

#### 1. L'âge

Comme indiqué dans le rapport national sur les causes de l'infertilité, l'âge est, dans les pays industrialisés, l'un des principaux facteurs (voir le principal facteur) de la hausse de l'infertilité féminine. En 40 ans, l'âge des femmes au moment de leur premier enfant a reculé de 5 ans, passant de 24 à 29 ans en moyenne ("Rapport sur les causes d'infertilité," 2022). Le risque de faire une fausse couche augmente drastiquement avec l'âge et atteint 22,2 % après 40 ans (Mikwar, MacFarlane, & Marchetti, 2020). Ces fausses couches s'expliquent notamment par l'augmentation de l'aneuploïdie des ovules, résultant en la formation d'embryons aneuploïdes souvent non viables. Cette augmentation de l'aneuploïdie chez les femmes âgées peut s'expliquer par une non-disjonction des chromosomes homologues au cours de la méiose I ou des chromatides sœurs au cours de la méiose II, des dysfonctions de la formation du fuseau méiotique, des anomalies de la cohésion des chromosomes ou encore des altérations des modifications post-traductionnelles des

histones et de la tubuline (Mikwar et al., 2020). De plus, l'augmentation de l'âge maternel est associée à une dérégulation de l'expression de certains gènes dans les ovules, dont *TOP2B*, *BRCA1* (BReast CAncer 1), *MAD2* (Mitotic Arrest Deficient) ou *BUB1* (Budding Uninhibited by Benomyl). *TOP2B* code pour l'ADN Topoisomérase II Beta et interagit avec la cohésine, son absence est donc liée à des erreurs de ségrégation des chromosomes (J. J. Zhang et al., 2020). Chez la souris, la diminution de l'expression de *Brca1*, gène impliqué dans l'assemblage du fuseau, induit la formation de fuseaux anormaux ou multiples et perturbe l'alignement et la ségrégation des chromosomes (Pan, Ma, Zhu, & Schultz, 2008). Enfin, *MAD2* et *BUB1* sont impliqués dans l'attachement des microtubules sur les kinétochores et participent au contrôle de l'assemblage du fuseau (Steuerwald, Cohen, Herrera, Sandalinas, & Brenner, 2001). La dérégulation de l'expression des gènes dans les ovules de femmes âgées affecte également des gènes de la chaîne de transport d'électrons (ex : *SDHA*, *COQ10*) ou des gènes antioxydants (*TXN2* (Thioredoxin 2), *PRDX3* (Peroxyredoxin 3), *SOD1* (SuperOxide dismutase 1) ou *GSTM2* (Glutathione S-Transferase mu 2)), induisant une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène dans les ovules et donc une diminution de leur compétence développementale (L. Wang et al., 2021).

## 2. La stimulation ovarienne

Louise Brown, le premier bébé FIV née en 1978 a été conçue au cours d'un cycle naturel ayant permis la ponction d'un ovule unique. Malgré ce succès, en 1980, le taux de naissance après FIV était très faible, principalement à cause des difficultés d'obtention des ovules (0,5 à 0,7 par cycle) et des échecs d'implantation (Edwards, Steptoe, & Purdy, 1980; Garcia et al., 1984). En 2017, en France, le nombre d'ovules ponctionnés au cours d'un cycle a été multiplié par 16 (9,7 ovules par cycle en moyenne d'après l'agence de la biomédecine). Cette augmentation a été permise par le développement et l'amélioration des techniques de stimulation ovarienne. Le principe de la stimulation ovarienne repose sur l'administration de gonadotrophines pour stimuler la croissance simultanée de plusieurs follicules et de maintenir leur développement jusqu'à leur maturité afin de pouvoir les ponctionner. Du fait de la variabilité des profils des femmes ayant recours à l'AMP, il est nécessaire d'adapter le protocole de stimulation au cas par cas. Dans un schéma classique, la première étape consiste à bloquer une ovulation spontanée qui pourrait intervenir avant que le follicule n'ait atteint sa maturité. Cela nécessite de bloquer le pic de LH en inhibant la production de GnRH. Dans une deuxième phase, l'administration de FSH, seule ou en complément avec de la LH, permet de stimuler la croissance de plusieurs follicules. Enfin, l'étape finale de la maturation ovocytaire est déclenchée en administrant une forte dose de hCG (Casarini, Brigante, Simoni, & Santi, 2016).

L'impact de la stimulation ovarienne sur la qualité des ovules et des embryons est bien documenté chez la souris. En effet, la stimulation ovarienne permet d'augmenter le nombre d'ovules ovulés mais est associée à une augmentation des défauts ovocytaires et embryonnaires :

- Anomalies du fuseau méiotique et de l'alignement des chromosomes (Kalthur et al., 2016; Van Blerkom & Davis, 2001),
- Modification de la distribution spatiale des mitochondries et de l'appareil de golgi dans les ovules (Kalthur et al., 2016),

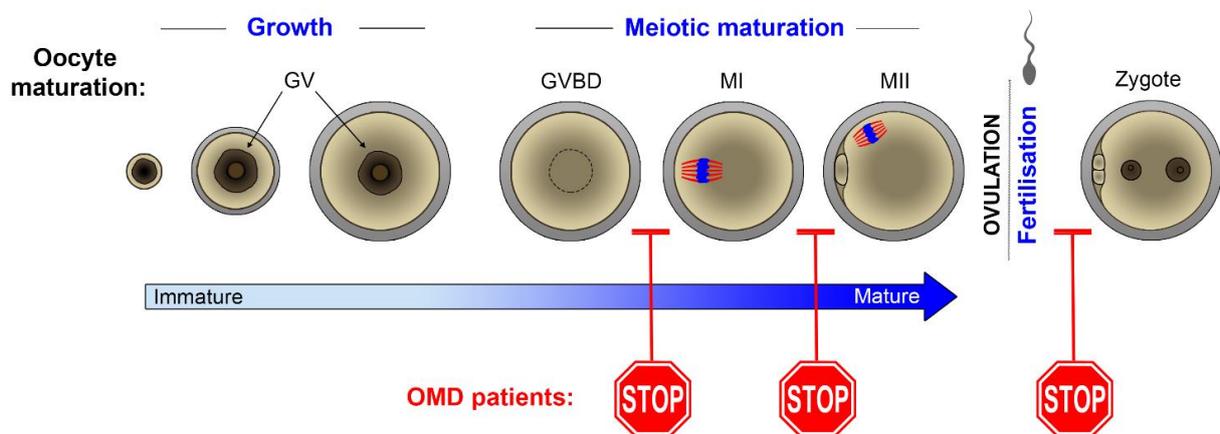
- Augmentation du stress oxydant dans les ovules et les ovaires (Chao et al., 2005; Kalthur et al., 2016),
- Augmentation des mutations de l'ADN mitochondrial dans les ovaires (Chao et al., 2005),
- Modification du profil d'expression des ovules et des embryons (Linke, May, Reifenberg, Haaf, & Zechner, 2013; Ozturk, Yaba-Ucar, Sozen, Mutlu, & Demir, 2016),
- Retard et arrêt du développement préimplantatoire (Ertzeid & Storeng, 2001; Kalthur et al., 2016),
- Augmentation du taux d'apoptose dans les blastocytes (Kalthur et al., 2016),
- Diminution du taux d'éclosion (Kalthur et al., 2016),
- Diminution du taux d'implantation (Ertzeid & Storeng, 2001),
- Diminution de la masse de naissance des souriceaux (Ertzeid & Storeng, 2001).

De plus, les défauts observés sont aggravés en cas de stimulations ovariennes répétées (Chao et al., 2005; Kalthur et al., 2016; Van Blerkom & Davis, 2001). En revanche, la stimulation ovarienne ne semble pas impacter la mise en place des vagues calciques chez la souris (Savy, Stein, Shi, & Williams, 2021). Ces anomalies pourraient être liées à la sélection trop précoce de follicules dont la maturation cytoplasmique serait insuffisante. Les ovules auraient alors accumulé moins d'ARN et la queue poly(A) de ces ARNm pourrait être trop courte pour permettre la traduction. Cela induirait alors une diminution de la production des protéines nécessaires à la maturation méiotique, à la fécondation et au développement embryonnaire jusqu'à l'EGA. La diminution des protéines nécessaires à la ségrégation des chromosomes pourrait alors induire une augmentation de l'aneuploïdie. La maturation cytoplasmique s'accompagne d'une réorganisation du réticulum endoplasmique et des mitochondries. Les ovules dont la maturité cytoplasmique est insuffisante peuvent donc avoir des défauts de réorganisation du réticulum endoplasmique, perturbant la libération de calcium et l'activation ovocytaire. De la même façon, des mitochondries immatures seraient moins efficaces en termes de production d'ATP et pourraient produire davantage d'espèces réactives de l'oxygène (Clement, 2007).

L'impact de la stimulation hormonale sur la qualité des ovules et des embryons chez la femme est plus difficile à évaluer. En effet, la femme étant une espèce mono-ovulante, seul un ovule (maximum 2 dans de rares cas) peut être ponctionné au cours d'un cycle naturel. Il faudrait donc réaliser une étude sur un grand nombre de femmes afin d'obtenir des données interprétables. Une équipe danoise a tout de même réussi à réaliser ce type d'étude : des femmes ont tout d'abord été stimulées afin de ponctionner plusieurs follicules en vue de réaliser une FIV ou une ICSI, puis les embryons supplémentaires ont été congelés. Afin de maximiser les chances de réussite, la réimplantation d'un embryon congelé a été réalisée en suivant le cycle naturel de la femme, au cours duquel le follicule dominant a été ponctionné puis fécondé. De cette manière, il a été possible de comparer 128 ovules obtenus en cycle naturel et 1349 ovules obtenus en cycle stimulé. Les auteurs n'ont pas observé de différence du taux de clivage et du développement embryonnaire à J2. De plus, le pourcentage d'embryons avec moins de 10 % de fragmentation était similaire dans les deux groupes (Ziebe et al., 2004).

### 3. L'échec de maturation ovocytaire

L'échec de maturation ovocytaire est caractérisé par la production et l'ovulation d'une majorité d'ovules immatures, incapables de mûrir *in vitro* et qui ne répondent pas à la fécondation (Figure 58). Ce syndrome rare est à distinguer des cas où la production d'ovules immatures est occasionnelle (Beall, Brenner, & Segars, 2010). Parmi les cas reportés, le cycle menstruel des femmes et les dosages hormonaux réalisés étaient normaux. De plus, les tentatives de modulation du protocole de stimulation ovarienne, la maturation des ovules *in vitro* ou bien la fécondation par ICSI se sont soldées par des échecs (Bar-Ami, Zlotkin, Brandes, & Itskovitz-Eldor, 1994; Bergere, Lombroso, Gombault, Wainer, & Selva, 2001; Hartshorne, Montgomery, & Klentzeris, 1999; Levran, Farhi, Nahum, Glezerman, & Weissman, 2002).



**Figure 58 : le syndrome d'échec de maturation ovocytaire.**

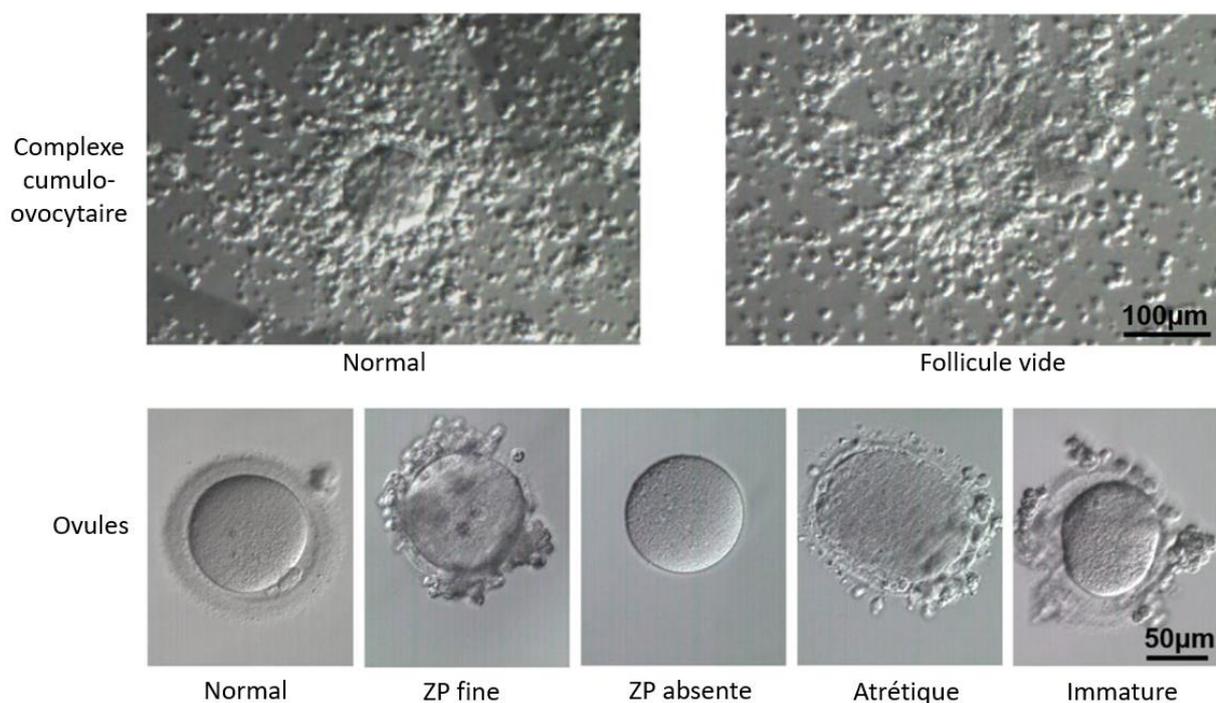
Le syndrome d'échec de maturation ovocytaire est caractérisé par la production répétée d'ovules méiotiquement incompetents, arrêtés au stade GV ou MI et incapables de mûrir *in vitro*. Parfois, ce syndrome peut inclure des ovules ayant mûri jusqu'au stade MII mais inapte à reprendre leur seconde division méiotique après fécondation. OMD : oocyte maturation deficiency. Figure d'après (Marie Christou-Kent, 2019).

### 4. Les causes génétiques de l'infertilité

L'ovogenèse est un processus complexe régulé par de nombreux gènes et donc particulièrement sensibles aux défauts génétiques. D'ailleurs, chez la femme, il est estimé que 5 à 10 % des infertilités ont une origine génétique (Hanson et al., 2017). Les anomalies génétiques responsables d'infertilité peuvent être des aberrations chromosomiques quantitatives ou structurales (ex : le syndrome de Turner) ou des mutations affectant le fonctionnement de gènes contrôlant des fonctions biologiques essentielles telles que la signalisation hormonale, la croissance folliculaire et ovocytaire, la fécondation, le développement embryonnaire ou encore l'implantation. L'implication de facteurs génétiques dans l'infertilité féminine a fait l'objet de plusieurs revues récentes : (Fei & Zhou, 2022; Sang, Zhou, Mu, & Wang, 2021; Yatsenko & Rajkovic, 2019).

#### 4.a. Les protéines ZP

La zone pellucide, mise en place dans les follicules primaires et persistant jusqu'à l'éclosion du blastocyste, est une matrice extracellulaire aux fonctions multiples. En plus de son rôle de protection de l'ovocyte et de l'embryon, elle participe à la fixation du spermatozoïde lors de la fécondation et prévient la polyspermie. La zone pellucide est traversée par les projections transzonales, des extensions cytoplasmiques des cellules folliculaires, nécessaires à la communication entre l'ovocyte et les cellules folliculaires. Chez la femme, elle est composée de quatre glycoprotéines majoritaires : ZP1, ZP2, ZP3 et ZP4. De nombreuses mutations des gènes *ZP1-4* (69 d'après une revue récente (J. Zhou et al., 2022)) ont été identifiées et sont responsables d'infertilité avec des phénotypes multiples : forte augmentation du taux d'ovules atrétiques, présence de follicules vides, formation d'ovules dépourvus de zone pellucide ou entourés d'une zone pellucide anormalement fine, ovulation d'ovules immatures (Figure 59). Bien que la plupart des mutations identifiées soient responsables de la production de gamètes incompatibles avec la formation d'un embryon viable, certains ovules ont pu être fécondés par ICSI pour former un embryon ayant engendré une naissance (Dai et al., 2019; Metwalley et al., 2020; J. Zhou et al., 2022).



**Figure 59 : Multiplicité des phénotypes liés aux mutations des gènes *ZP1-4* chez la femme.**

Les mutations des gènes *ZP1-4* sont responsables d'infertilité féminines plus ou moins sévères, caractérisées par une multiplicité de phénotypes : présence de follicules vides, production d'ovules dépourvus de ZP ou avec une ZP fine, production d'ovules atrétiques ou immatures. Figure modifiée à partir de (J. Zhou et al., 2022).

#### 4.b. Les causes génétiques de l'échec de maturation ovocytaire

L'utilisation d'animaux transgéniques et de la technologie de l'interférence à l'ARN visant à inhiber la traduction d'un ARNm ciblé a permis d'identifier plusieurs gènes potentiellement

impliqués dans le syndrome d'échec de maturation ovocytaire. Ainsi, l'inhibition de l'expression des gènes suivants entraîne un phénotype d'échec de maturation ovocytaire chez la souris : *Mlh1* (MutL Homolog 1) (Edelmann et al., 1996), *Cdc25b* (Cell Division Cycle 25B) (Lincoln et al., 2002), *Mei1* (Meiosis Inhibitor Protein 1) (Libby et al., 2002), *Cks2* (CDC28 Protein Kinase Regulatory Subunit 2) (Spruck et al., 2003), *Pde3A* (Masciarelli et al., 2004), *Smc1B* (Structural Maintenance of Chromosomes 1B) (Revenkova et al., 2004), *Lfng* (Lunatic fringe) (Hahn, Johnson, Beres, Howard, & Wilson-Rawls, 2005), *Mfn2* (mitofusin 2) (J. H. Zhang et al., 2016), *Rasd1* (Ras dexamethasone-induced protein 1) (Y. Lee et al., 2016), *Prkarbβ* (Protein Kinase CAMP-Dependent Type II Regulatory Subunit Beta) (H. Yoon et al., 2018), *Nek5* (NIMA Related Kinase 5) (Y. Y. Li et al., 2019), *Eb1* (end-binding protein 1) (D. Zhou, Nie, & Cui, 2021), *Kifc1* (kinesin family member C1) (Shan et al., 2022).

Chez la femme, des mutations responsables d'échec de maturation ovocytaire ont été identifiées sur les gènes *TUBB8* (Feng et al., 2016), *TRIP13* (Z. Zhang et al., 2020), *CDC20* (L. Zhao et al., 2021; L. Zhao et al., 2020) et *PATL2* (B. Chen et al., 2017; M. Christou-Kent et al., 2018).

*TUBB8* (Tubulin Beta 8 Class VIII) est responsable de la production de  $\beta$ -tubuline, composant majeur du fuseau méiotique. Absent dans les spermatozoïdes matures, *TUBB8* est fortement exprimé dans les ovules et au cours des premiers stades du développement embryonnaire. Son absence est associée à la formation de fuseaux très anormaux et à un arrêt méiotique, souvent au stade MI (Feng et al., 2016).

*TRIP13* (Thyroid Receptor-Interacting Protein 13) code pour une AAA-ATPase impliquée dans le contrôle de l'assemblage du fuseau et importante à la fois dans la mitose et dans la méiose. Plusieurs types de variants pathogènes ont été identifiés et sont associés à différents phénotypes, dont la formation de tumeurs rénales enfantines ou à une infertilité féminine (arrêt méiotique au stade MI ou anomalie de division du zygote) (Solovova & Chernykh, 2022; Z. Zhang et al., 2020).

*CDC20* (Cell Division Cycle protein 20), exprimé dans les cellules somatiques et germinales, code pour une protéine de régulation du cycle cellulaire. Elle permet l'activation de APC/C, étape essentielle à la reprise de la méiose (voir chapitre 1.III.2.c « Migration et séparation des chromosomes » et chapitre 2.II.3.c « La reprise de la méiose II et la formation des pronoyaux »). En effet, APC/C est responsable de la dégradation de la Cycline B1 (protéine du MPF) et de la Sécurine qui permet le maintien des chromatides sœurs (Musacchio & Salmon, 2007). Une mutation de *CDC20* induisant la formation d'une protéine tronquée mal fonctionnelle a été identifiée chez la femme et est donc responsable d'échec de maturation ovocytaire. L'absence d'activation de APC/C empêche la dégradation de la Cycline B1 et les ovocytes restent bloqués en métaphase I (L. Zhao et al., 2021).

*PATL2* appartient à la famille des protéines associées à la topoisomérase II (PAT), composées, chez les Vertébrés, des protéines *PATL1* et *PATL2*. Comme discuté précédemment, *PATL1* est principalement impliquée dans la dégradation des ARNm dans les cellules somatiques alors que *PATL2* est une protéine ovocytaire responsable de l'inhibition de la traduction (voir chapitre 3.II.4b « Les protéines *PAT1* chez les Vertébrés »). Chez la femme, plusieurs variants du gène *PATL2* ont été identifiés et sont responsables d'infertilité avec un phénotype d'échec de maturation

ovocytaire, principalement caractérisé par un arrêt de maturation au stade GV, ou bien, plus rarement, au stade MI ou MII (B. Chen et al., 2017; M. Christou-Kent et al., 2018; Huang et al., 2018; Huo et al., 2022; Lei, Li, Zhou, & Zhang, 2022; Maddirevula et al., 2017; L. Sun et al., 2022; Wu et al., 2019). Chez les femmes concernées, quelques embryons ont pu être obtenus mais tous ont stoppé leur développement prématurément (Wu et al., 2019).

L'implication de PATL2 dans le phénotype d'échec de maturation ovocytaire a été validée par la création d'une lignée de souris génétiquement modifiée, générée par la méthode Cre/Lox et dans laquelle l'exon 7 a été supprimé et le cadre de lecture modifié. De cette façon, le domaine d'association à la topoisomérase est absent et la protéine n'est pas fonctionnelle. La caractérisation phénotypique de ces souris a montré que les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> ovulent des gamètes dont près de la moitié ne sont pas au stade MII et que les ovules ayant atteint ce stade de maturation présentent d'importants défauts et notamment des fuseaux anormaux et des anomalies d'alignement des chromosomes. De plus, des analyses réalisées aux stades GV et MII mettent en évidence des altérations du transcriptome chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>. Il est toutefois important de noter que l'absence de PATL2 chez la souris entraîne des anomalies moins sévères que chez les femmes. En effet, bien que fortement sous fertiles, les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> peuvent se reproduire et engendrer une descendance viable (M. Christou-Kent et al., 2018).

#### 4.c. Les causes génétiques de l'échec de fécondation

Chez la femme, l'ovule en attente de fécondation est bloqué en métaphase II et achèvera sa seconde division méiotique après l'entrée du spermatozoïde qui apporte la PLC $\zeta$  nécessaire à l'activation ovocytaire. L'échec de fécondation est caractérisé par la production d'ovules morphologiquement normaux mais incapables d'être fécondés ou d'initier la formation d'un embryon en réponse à la fécondation. Plusieurs gènes sont essentiels à la réalisation correcte de ce mécanisme et sont recensés dans les revues suivantes : (Ikawa et al., 2010; Okabe, 2018). Parmi les acteurs ovocytaires caractérisés chez la souris se trouvent *Cd9* dont l'absence altère le processus de fusion entre l'ovule et le spermatozoïde (Le Naour, Rubinstein, Jasmin, Prenant, & Boucheix, 2000), mais aussi *Cd81* (Rubinstein et al., 2006), *Juno* (Bianchi et al., 2014) ou encore *Piga* (Alfieri et al., 2003).

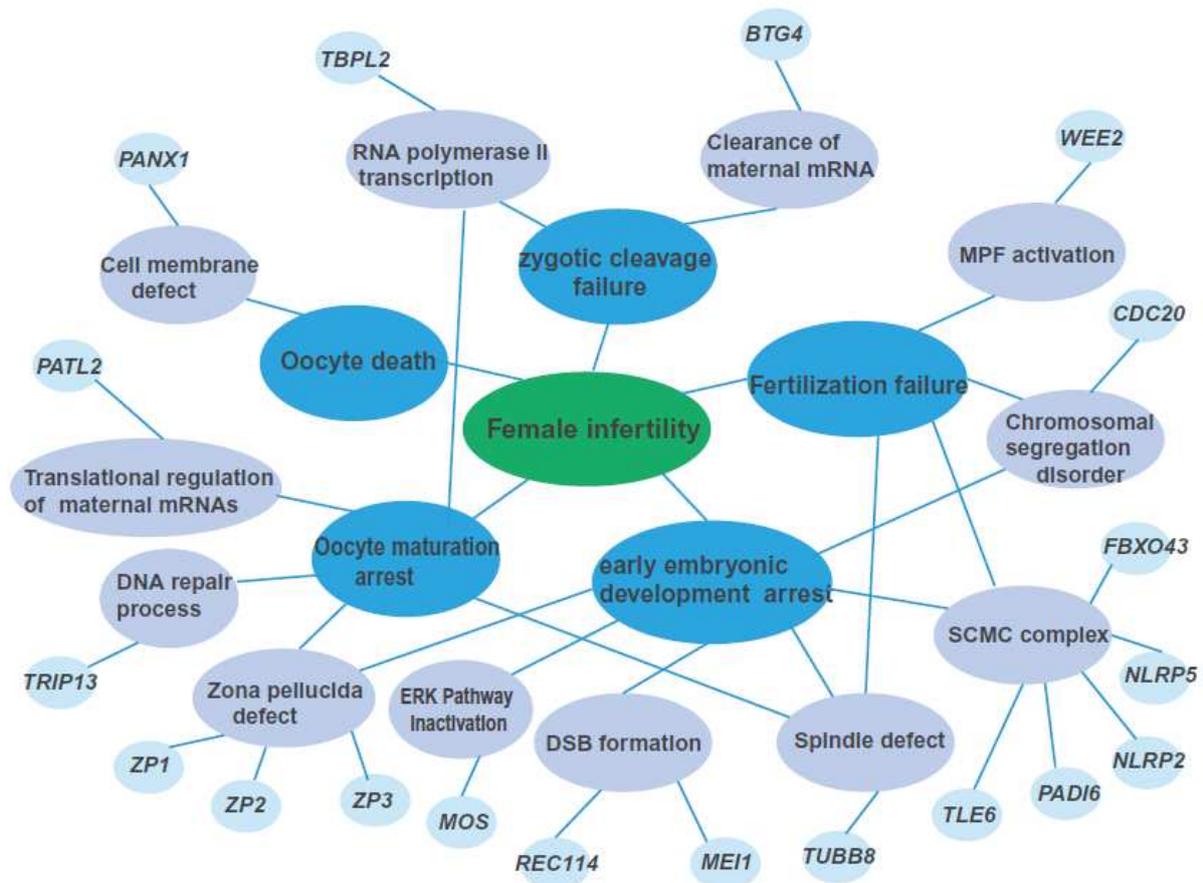
Chez la femme, WEE1B est également impliquée dans l'échec de fécondation. *WEE1B* (également appelée WEE2) code pour une protéine kinase responsable de la phosphorylation de CDK1 et essentielle à la régulation de l'arrêt méiotique dans les ovocytes. Dans les ovules bloqués en MII, l'arrêt méiotique est maintenu par une activité élevée du MPF, médiée par l'absence de phosphorylation de CDK1. L'entrée du spermatozoïde dans l'ovule induit une augmentation de la concentration en calcium et l'activation de la protéine kinase CaMKII. CaMKII active alors WEE1B qui, en phosphorylant CDK1, diminue l'activité du MPF et permet la sortie de la métaphase II (Oh et al., 2011). Chez la femme, plusieurs mutations ont été identifiées sur le gène WEE1B et sont responsables d'une diminution de la quantité de protéine WEE1B dans les ovules qui deviennent alors incapables de reprendre la seconde division méiotique lors de la fécondation (Sang et al., 2018). Les anomalies impliquant WEE1B se trouvent donc à l'interface entre l'échec de maturation ovocytaire et l'échec de fécondation.

D'autres mutations ont été identifiées chez la femme et sont responsables d'anomalies situées à l'interface entre l'échec de fécondation et l'arrêt du développement embryonnaire précoce. C'est le cas de *TLE6* (Transducin-Like Enhancer of split 6) dont la mutation est responsable d'une forte diminution du taux de fécondation, les quelques embryons obtenus stoppent leur développement de manière précoce (Alazami et al., 2015; J. Lin et al., 2020). De plus, des mutations du gène *BTG4* (B-cell Translocation Gene 4), normalement impliqué dans la dégradation des ARNm via son interaction avec CNOT (membre du complexe de déadénylation CCR4-CNOT), sont associées à la formation de zygotes incapables d'initier leur première division (Zheng et al., 2020).

#### 4.d. Les causes génétiques de l'arrêt du développement embryonnaire préimplantatoire

Le SCMC (SubCortical Maternal Complex) est un complexe protéique spécifique aux ovocytes et aux embryons et est composé d'au moins 6 protéines : FLOPED (Ooep), MATER (Nlrp5), NLRP2, TLE6, FILIA (Khdc3) et PADI6. Le SCMC est essentiel à la formation d'embryons capables de se développer car il régule plusieurs fonctions biologiques essentielles et notamment la traduction, la réorganisation du cytosquelette, la formation et le positionnement du fuseau méiotique, la redistribution des organelles au cours de la maturation ovocytaire et de la fécondation ou encore la reprogrammation épigénétique (Bebbere, Albertini, Coticchio, Borini, & Ledda, 2021; Bebbere, Masala, Albertini, & Ledda, 2016; X. J. Yu et al., 2014). Comme indiqué précédemment, les anomalies de TLE6 sont responsables d'infertilité chez la femme, principalement du fait d'un échec de fécondation. L'altération du fonctionnement de PADI6 (Y. Xu et al., 2016), KHDC3 (Fatemi et al., 2021), OOEP (Tong et al., 2022), NLRP5 et NLRP2 (Mu et al., 2019) est responsable d'arrêt du développement embryonnaire préimplantatoire.

REC114 et MEI1 (Meiosis Inhibitor Protein 1) sont deux autres facteurs impliqués dans l'arrêt du développement embryonnaire préimplantatoire. Ces deux protéines participent à la formation de cassures double brins de l'ADN, nécessaires à la recombinaison homologue et à la ségrégation des chromosomes lors de la méiose. Chez la souris, l'absence de REC114 ou de MEI1 entraîne la stérilité des mâles et des femelles du fait d'une altération de la gamétogenèse (Kumar et al., 2018; Libby et al., 2002). Chez la femme, des mutations à l'origine d'une perte de fonction de REC114 sont liées à une augmentation du nombre de pronoyaux dans les zygotes, à un arrêt du développement embryonnaire préimplantatoire et à une augmentation du risque d'avortement spontané (W. Wang et al., 2020). De plus, des mutations de *MEI1* sont associées à des arrêts de développement embryonnaire préimplantatoire, des échecs d'implantation ou à une augmentation du taux d'avortement spontané (Dong et al., 2021).



**Figure 60 : Les facteurs génétiques responsables d'infertilité féminine.**

L'ovogenèse, la fécondation et le développement embryonnaire préimplantatoire sont des processus complexes, régulés par de nombreuses voies de signalisation. Une variété de facteurs génétiques a été identifiée dans différents phénotypes d'infertilité féminine. Parmi eux, PANX1 est associé à la mort ovocytaire, PATL2, TRIP13 et TUBB8 sont impliqués dans l'échec de maturation ovocytaire et les protéines de la ZP sont associées à une multiplicité de phénotypes incluant l'échec de maturation ovocytaire et l'arrêt du développement embryonnaire préimplantatoire. TLE6, membre du complexe SCMC, est impliquée dans les échecs de fécondation tandis que les autres membres du complexe sont principalement associés à l'arrêt du développement embryonnaire préimplantatoire. Aussi, REC114 et MEI1, impliqués dans la formation des cassures double brins de l'ADN, participent également aux arrêts du développement embryonnaire préimplantatoire. Figure d'après (Fei & Zhou, 2022).

---

## Problématique et objectifs de la thèse

---

En affectant 186 millions de personnes dans le monde (Organisation Mondiale de la Santé, septembre 2020), l'infertilité est aujourd'hui considérée comme un véritable problème de santé publique. La prévalence de l'infertilité étant en augmentation, de plus en plus de couples ont recours à l'assistance médicale à la procréation (AMP) qui regroupe différentes techniques visant à aider un couple à concevoir un enfant. Parmi ces techniques, la fécondation *in-vitro* (FIV) et l'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) sont très couramment utilisées et permettent généralement la production de plusieurs embryons par couple. Afin de limiter les risques liés à des grossesses multiples, la réimplantation d'un embryon unique est de plus en plus utilisée. Ainsi, l'un des principaux défis en FIV et en ICSI est la sélection des ovules et des embryons avec la meilleure compétence développementale possible, afin de maximiser les chances de grossesse rapide et limiter le nombre de procédures éprouvantes pour les couples, tant sur le point physique que psychologique. Pour cela, la méthode de sélection des ovules et des embryons doit être à la fois efficace et le moins invasive possible.

L'évaluation de la qualité des ovules repose essentiellement sur l'observation de la morphologie du gamète mais aussi sur l'étude des cellules qui l'entourent. L'état de maturité de l'ovule, sa taille, l'aspect du cytoplasme et de l'espace périvitellin mais aussi la morphologie du globule polaire, du fuseau méiotique et de la zone pellucide, sont différents indices utilisés pour évaluer la compétence développementale des ovules. Le rôle des cellules folliculaires est prépondérant au cours de la biogenèse des ovocytes car ces cellules fournissent l'environnement nécessaire à la croissance et à la maturation ovocytaire. L'injection d'un spermatozoïde dans un ovule au cours d'une ICSI nécessite le retrait de ces cellules qui peuvent donc être utilisées sans impacter l'efficacité de la fécondation ni le développement du futur embryon. Certains paramètres métaboliques, et notamment la quantité d'ADN mitochondrial, varient dans le même sens dans les cellules du cumulus et dans l'ovule associé, signifiant que la qualité de l'ovule se reflète dans la qualité des cellules du cumulus. D'ailleurs, l'expression de gènes clés de la folliculogénèse (*GDF9*, *BMP15*) ou de l'ovulation (*HAS2*, *VCAN*, *TNFAIP6*, *PTGS2*) dans les cellules du cumulus est utilisée comme marqueur de la qualité ovocytaire. De plus, le niveau d'apoptose de ces cellules, et donc l'expression de *BCL2*, est associé à une altération de la qualité des ovules et des embryons qui en découlent.

De la même façon, la sélection des embryons à réimplanter a d'abord été réalisée à partir de critères exclusivement morphologiques. Par exemple, la présence de blastomères de taille asymétrique, de fragmentation ou de vacuole est associée à un mauvais potentiel de développement embryonnaire. De plus, des méthodes de classification des embryons comme celle de DK.Gardner et W.Schoolcraft, permettent scorer les blastocystes en fonction de leur niveau d'expansion et de l'aspect de la masse cellulaire interne et du trophoblaste. Cependant, ces méthodes restent peu reproductibles, notamment à cause de variabilités dépendantes des expérimentateurs. L'utilisation de la microscopie en temps réelle et l'arrivée de l'intelligence

artificielle permet de générer et d'analyser un grand nombre de données, puis d'entraîner des algorithmes capables de scorer des embryons de façon automatique, rapide et indépendamment de l'interprétation humaine, améliorant ainsi la reproductibilité des résultats. De plus, les méthodes dites « omiques », et notamment la transcriptomique et la métabolomique permettent, par analyse des ARN ou des métabolites rejetés par l'embryon dans les milieux de culture, d'identifier de nouveaux marqueurs de qualité embryonnaire.

En dépit des progrès réalisés dans ce domaine au cours des cinquante dernières années, le taux de succès cumulé à l'ensemble d'un parcours de fécondation *in vitro* n'est que de 40 % chez les femmes de moins de 35 ans et passe sous la barre des 30 % à partir de 39 ans (Soullier, Bouyer, Pouly, Guibert, & de La Rochebrochard, 2011), et les échecs sont fortement corrélés à l'utilisation de gamètes de mauvaise qualité. Malgré l'importance du spermatozoïde qui apporte la moitié du matériel génétique, le devenir de l'embryon dépend majoritairement de l'ovule qui apporte une diversité de facteurs maternels nécessaires à la fécondation et au développement embryonnaire précoce (mitochondries, ARNm, protéines...). Pour cette raison, la découverte de nouveaux critères de qualité ovocytaire et embryonnaire est un véritable enjeu.

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe Génétique, Epigénétique et Thérapie de l'Infertilité (GETI) de l'Institut Albert Bonniot (IAB) en région grenobloise. Ce laboratoire présente une grande expertise dans l'identification de gènes candidats associés à des phénotypes d'infertilité chez l'Humain. C'est dans ce contexte que le laboratoire a identifié une mutation du gène *PATL2*, responsable d'échec de maturation ovocytaire, une forme sévère d'infertilité féminine. L'implication de *PATL2* dans ce phénotype a été vérifiée par la création d'une lignée de souris transgéniques *Patl2*<sup>-/-</sup> et a permis la publication d'un article paru en 2018 dans *EMBO Molecular Medicine* (M. Christou-Kent et al., 2018). L'absence de cette protéine chez la souris entraîne un phénotype moins sévère que chez la femme. Bien qu'ayant une fertilité fortement altérée, les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> produisent des ovules pouvant être fécondés et engendrer une descendance viable. La qualité de ces ovules est cependant fortement altérée puisque ces gamètes présentent des défauts de maturation, de structure et des dérégulations transcriptomiques.

En plus de valider l'importance de *PATL2* dans le processus d'ovogenèse, cette lignée de souris *Patl2*<sup>-/-</sup> a permis de créer un excellent modèle de mauvaise qualité ovocytaire et a été utilisée pour répondre aux trois objectifs de cette thèse :

- Le premier objectif consistait à étudier l'impact de l'absence de *PATL2* sur la qualité ovocytaire et embryonnaire chez la souris, et à évaluer l'importance de cette protéine entre la GVBD et l'EGA. Pour cela, la qualité des ovules *Patl2*<sup>-/-</sup> a été évaluée par l'observation du fuseau méiotique en immunofluorescence tandis que la qualité embryonnaire a été étudiée sur des critères morphologiques et par l'analyse de l'expression de gènes importants pour le développement embryonnaire.
- Le second objectif consistait à étudier l'impact de la stimulation ovarienne sur la qualité des ovules et des embryons des femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>. En effet, la stimulation ovarienne est une procédure largement utilisée dans les laboratoires d'AMP, dans le but d'augmenter le nombre d'ovules pouvant être prélevés. Cependant, cette procédure est connue pour

altérer la qualité des ovules, il est donc légitime de se demander quelles sont les conséquences de son utilisation sur des ovules dont la qualité est déjà diminuée. Cette étude a été réalisée en comparant la qualité des ovules et des embryons de souris, obtenus à partir de femelles *Patl2<sup>+/+</sup>* et *Patl2<sup>-/-</sup>* ayant ovulé naturellement ou après un traitement hormonal.

- Le troisième objectif consistait à étudier le rôle de PATL2 entre la GVBD et l'EGA. Il sera traité de manière à mettre en avant la méthodologie utilisée : la première stratégie mise en place repose sur l'injection de morpholinos dans des ovocytes au stade GV, dans le but d'inhiber la traduction de *Patl2*. La seconde stratégie vise à restaurer la protéine dans des ovules de souris *PATL2<sup>-/-</sup>* en injectant de l'ARN messager codant pour *Patl2* au cours d'une ICSI.

Les méthodes utilisées et les résultats obtenus sont détaillés dans la suite de ce manuscrit.

# Matériel & Méthodes

## I. Echantillons biologiques

### 1. Déclaration d'éthique

Les procédures d'élevage et d'expérimentation ont été réalisées conformément aux lois nationales et internationales relatives au bien-être des animaux de laboratoire et à l'expérimentation (Directive 2010/63/EU du Conseil de la CEE, septembre 2010). Les expériences ont été réalisées sous la supervision de C.A. (accord 38 10 38) dans l'animalerie de la Plateforme de Haute Technologie Animale (PHTA) (accord C3851610006 délivré par la Direction Départementale de la Protection des Populations) et ont été approuvées par le comité d'éthique de la PHTA et par le gouvernement français (APAFIS#7128-2016100609382341.v2).

### 2. Souris utilisées

La fonction de PATL2 est étudiée à partir d'une lignée transgénique *Patl2*<sup>-/-</sup>, générée par la méthode Cre/Lox, de manière à mimer la mutation identifiée chez la femme et qui induit la formation d'un codon stop dans l'exon 6. Pour cela, l'exon 7 du gène *Patl2* chez la souris a été supprimé, ce qui modifie le cadre de lecture (M. Christou-Kent et al., 2018). Dans le cas où une protéine PATL2 serait produite, elle ne ferait qu'un tiers de la taille totale de la protéine et serait dépourvue du domaine d'association à la topoisomérase et de sa région PatC (en région c-terminale), elle serait donc non fonctionnelle. Cette lignée de souris, issue d'un fond génétique hybride, a été croisée avec des souris C57BL/6J.

L'expression de PATL2 a été étudiée à partir de la lignée transgénique PATL2-HA, générée par la méthode CRISPR/CAS9, et sur un fond génétique C57BL/6J. Vingt-sept nucléotides codants pour une étiquette HA (Human Influenza Hemagglutinin) ont été insérées juste avant le codon stop du gène *Patl2* (M. Christou-Kent et al., 2018).

Les souris B6D2 utilisées sont issues d'un accouplement entre un mâle DBA/2J et une femelle C57BL/6J.

### 3. Obtention et préparation des ovocytes au stade GV

Les ovocytes au stade GV sont obtenus à partir de femelles de 3 à 8 semaines et par dilacération des ovaires dans du milieu M2 supplémenté avec de la cilostamide 1 µM (Sigma-Aldrich, C7971), un inhibiteur de phosphodiésterases permettant de bloquer la maturation méiotique. Les cellules folliculaires sont retirées manuellement avec une pipette très fine.

### 4. Obtention et préparation des ovules au stade MII

#### 4.a. Par stimulation ovarienne

Des femelles âgées de 6 à 12 semaines reçoivent tout d'abord 7,5 UI de PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin, Med-Vet, syncro-part PMSG, 600 UI) en intra-péritonéale, afin de stimuler

la croissance folliculaire. Quarante-huit heures plus tard, l'injection de 7,5 UI de HCG (Human Chorionic Gonadotropin, Med-Vet, Chorulon 1500 UI) permet de stimuler l'ovulation. Douze à 14 h après l'injection de HCG, les complexes cumulo-ovocytaires sont récupérés dans l'ampoule de l'oviducte, dans du milieu M2 (Sigma-Aldrich, M7167). L'incubation des complexes cumulo-ovocytaires dans du milieu M2 supplémenté avec de la hyaluronidase 0.1 mg/ml pendant 10 min permet de retirer les cellules du cumulus.

#### *4.b. En absence de stimulation ovarienne*

En fin de journée, les femelles, âgées de 6 à 12 semaines, sont mises en accouplement avec des mâles, qui, de façon naturelle, s'accouplent préférentiellement avec les femelles en œstrus. Afin d'obtenir des ovules non fécondés, les mâles utilisés sont stériles (mâles mutés pour un gène codant pour une protéine du flagelle et ayant un phénotype MMAF (Multiple Morphological Abnormalities of the Flagella)). Le lendemain matin, les femelles présentant un bouchon vaginal sont euthanasiées par dislocation cervicale. Le tractus génital (cornes utérines et ovaires) est isolé dans du milieu M2 et les complexes cumulo-ovocytaires sont prélevés dans l'ampoule de l'oviducte.

## 5. Préparation et culture des embryons

### *5.a. Par fécondation in vivo*

Des femelles âgées de 6 à 12 semaines reçoivent 7,5 UI de PMSG suivi de 7,5 UI de HCG, 48 h plus tard. Immédiatement après l'injection de HCG, les femelles sont placées avec des mâles fertiles de façon à former un couple par cage. En fonction des objectifs de l'expérimentation, les femelles peuvent être mise en accouplement sans traitement hormonal. Le lendemain matin, l'accouplement est validé par la présence du bouchon vaginal. Les embryons au stade zygote sont prélevés dans du milieu M2, les cellules folliculaires restantes sont retirées après traitement à la hyaluronidase 0.1 mg/ml (Sigma-Aldrich, H3884) pendant 10 minutes à 37°C. Les zygotes sont ensuite lavés dans du milieu KSOM (voir la composition ci-dessous) recouvert d'huile minérale (Sigma-Aldrich, M8410), puis mis en culture dans ce même milieu, à 37 °C + CO<sub>2</sub> 5 %. Vingt-quatre heures plus tard, les embryons sont transférés dans un nouveau puits de KSOM. Le suivi du développement des embryons est réalisé quotidiennement.

### *5.b. Par fécondation in vitro*

La fécondation in vitro est réalisée à partir du protocole de David A.Carter (Carter, 1993), légèrement adapté. Les spermatozoïdes sont obtenus par dilacération des épидидymes dans du milieu M2 puis capacités dans du milieu M16 (Sigma-Aldrich, M7292) + BSA 2 % (Sigma-Aldrich, A3803) pendant 80 min à 37 °C + CO<sub>2</sub> 5 %. Les complexes cumulo-ovocytaires, préparés selon le protocole précédemment décrit, sont placés dans un puits de 500 µL de milieu M16 auquel 300 000 spermatozoïdes capacités sont ajoutés. Après 4 h d'incubation à 37 °C + CO<sub>2</sub> 5 %, les zygotes sont lavés pour retirer les spermatozoïdes non fixés et les cellules folliculaires, puis mis en culture dans du milieu KSOM recouvert d'huile minérale, à 37 °C + CO<sub>2</sub> 5 %.

### 5.c. Par ICSI

Les spermatozoïdes sont obtenus par dilacération des épидидymes dans 1 mL de milieu NIM (voir la composition ci-dessous) à 4 °C, puis lavés par centrifugation à 500 g pendant 5 min. Après retrait du surnageant, le culot est repris dans 1 mL de NIM et la procédure centrifugation/reprise du culot est répétée. La tête des spermatozoïdes est séparée du flagelle par sonication pendant 5 min à 60 % sur glace (QSONICA, modèle Q125). Afin de pouvoir les manipuler individuellement, les spermatozoïdes sont placés dans du milieu NIM rendu visqueux par la présence de PVP à 6 % (Polyvinylpyrrolidone 360, Sigma-Aldrich (PVP360)).

Les ovules sont obtenus à partir de femelles B6D2 âgées de 6 à 12 semaines et hormonalement stimulées comme décrit précédemment. Les complexes cumulo-ovocytaires sont prélevés dans du milieu M2 et les cellules folliculaires sont retirées après traitement à la hyaluronidase 0.1 mg/ml pendant 10 minutes à 37 °C. Les ovocytes, placés dans du milieu HCZB (voir la composition ci-dessous) sont alors injectés selon la procédure décrite dans un article paru en 2007 dans *Nature Protocols* (Yoshida & Perry, 2007). Les acides nucléiques injectés lors de l'ICSI sont mélangés à la solution de spermatozoïdes-PVP.

## 6. Composition des milieux utilisés

Composants du milieu KSOM	Concentration (mM)
NaCl	95
KCl	2,55
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,37
MgSO <sub>4</sub>	0,2
NaHCO <sub>3</sub>	25
CaCl <sub>2</sub>	1,7
Na <sub>2</sub> -EDTA	0,013
L-Glutamine	1,0
Na-Lactate	1,67
Na-Pyruvate	0,18
D-Glucose	0,2
BSA	1 mg/mL
Acides Aminés essentiels (Gibco 11130051)	1 mL/100mL
Acides aminés non essentiels (Gibco 11140050)	0,5 mL/100mL

Tableau 2 : Composition du milieu KSOM

Composants du milieu NIM	Concentration (mM)
KCl	125
NaCl	2,6
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4
EDTA	3,0

Tableau 3 : Composition du milieu NIM

Composants du milieu HCZB	Concentration (mM)
NaCl	81,62
KCl	4,83
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,18
MgSO <sub>4</sub>	1,18
NaHCO <sub>3</sub>	5,0
CaCl <sub>2</sub>	1,7
Na <sub>2</sub> -EDTA	0,11
L-Glutamine	1,0
Na-Lactate	28,0
Na-Pyruvate	0,27
D-Glucose	5,55
Polyvinyl Alcohol (PVA)	0,1 mg/mL

Tableau 4 : Composition du milieu HCZB

## II. RT-qPCR

### 1. Analyse de l'expression de *Patl2* dans les ovocytes et les embryons

L'expression de *Patl2* dans les ovocytes et les embryons est étudiée par RT-qPCR. Chaque échantillon, contenant 25 ovocytes ou embryons issus de souris B6D2, est soigneusement lavé dans du PBS-PVP 0,5 %, prélevé dans 3  $\mu\text{L}$  de PBS-PVP 0,5 %, et congelé par « snap-freeze » dans de l'azote liquide. Les échantillons sont ensuite conservés à  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  jusqu'à utilisation. La lyse et la RT-qPCR sont réalisées avec le kit *fast Advanced cell-to-CT* (Invitrogen, A35374) selon le protocole du fournisseur légèrement adapté. Pour cela, les échantillons sont lysés pendant 15 minutes à température ambiante, dans 49,5  $\mu\text{L}$  de tampon de lyse et 0,5  $\mu\text{L}$  de DNase I. Afin d'inhiber certains composants du tampon de lyse pouvant perturber la suite des réactions, 5  $\mu\text{L}$  de solution stop sont ajoutés aux échantillons alors incubés 2 min supplémentaires à température ambiante. La transcription inverse (RT ou « reverse transcription »), permettant de produire de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'ARN messager, est réalisée selon les recommandations du fournisseur, à  $37\text{ }^\circ\text{C}$  pendant 30 min, dans un volume total de 50  $\mu\text{L}$  contenant 22,5  $\mu\text{L}$  d'échantillon et 27,5  $\mu\text{L}$  d'un mix composé de l'enzyme reverse transcriptase (2,5  $\mu\text{L}$ ) et de son tampon (25  $\mu\text{L}$ ). La réaction est ensuite inhibée par une incubation de 5 min à  $95\text{ }^\circ\text{C}$ . Un contrôle sans enzyme reverse transcriptase est systématiquement réalisé. La qPCR est réalisée avec 4  $\mu\text{L}$  d'échantillon d'ADNc et 16  $\mu\text{L}$  d'un mix contenant 10  $\mu\text{L}$  de master mix, 1  $\mu\text{L}$  de sonde TaqMan et 5  $\mu\text{L}$  d'eau. La qPCR est réalisée selon le programme du fournisseur, dans un thermocycleur Biorad. L'efficacité des sondes TaqMan est vérifiée sur un échantillon de 40 ovocytes au stade GV, dilué par 5 dilutions en série, avec un facteur 1/2 entre chaque dilution. L'expression de *Patl2* est représentée sous forme de quantification relative (QR), calculée avec la méthode  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (Schmittgen & Livak, 2008), et normalisée par rapport à l'expression de *Patl2* au stade GV (QR au stade GV = 1). Le gène de référence utilisé est *H2afz*. De cette façon,  $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{Patl2}} - \text{Ct}_{\text{H2afz}})_{\text{échantillon A}} - (\text{Ct}_{\text{Patl2}} - \text{Ct}_{\text{H2afz}})_{\text{ovocytes GV}}$  où l'échantillon A correspond au stade de développement ovocytaire ou embryonnaire étudié.

### 2. Analyse de l'expression de gènes importants pour le développement embryonnaire dans un blastocyste unique

L'expression des gènes *Scd1*, *Epas1*, *Birc5*, *Gpx1* et *Pou5f1* est étudiée par RT-qPCR dans les blastocystes issus femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>. Les blastocystes sont soigneusement lavés dans du PBS-PVP 0,5 %, prélevés individuellement dans 3  $\mu\text{L}$  de PBS-PVP 0,5 %, et congelés par « snap-freeze » dans de l'azote liquide. Ils sont ensuite conservés à  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  jusqu'à utilisation. La RT-qPCR est réalisée avec le kit *Taq-Man Gene expression Cell to Ct* (Invitrogen, AM1728), selon le protocole du fournisseur légèrement adapté. Pour cela, les échantillons sont lysés pendant 15 minutes à température ambiante dans 49,5  $\mu\text{L}$  de tampon de lyse et 0,5  $\mu\text{L}$  de DNase I. Afin d'inhiber certains composants du tampon de lyse pouvant perturber la suite des réactions, 5  $\mu\text{L}$  de solution stop sont ajoutés aux échantillons alors incubés 2 min supplémentaires à température ambiante. La RT est réalisée selon les recommandations du fournisseur, à  $37\text{ }^\circ\text{C}$  pendant 60 min, dans un volume total de 50  $\mu\text{L}$  contenant 22,5  $\mu\text{L}$  d'échantillon et 27,5  $\mu\text{L}$  d'un mix composé de l'enzyme reverse transcriptase (2,5  $\mu\text{L}$ ) et de son tampon (25  $\mu\text{L}$ ). La réaction est ensuite inhibée par une incubation

de 5 min à 95 °C. Un contrôle sans enzyme reverse transcriptase est systématiquement réalisé. La qPCR est réalisée avec 4 µL d'échantillon d'ADNc et 16 µL d'un mix contenant 10 µL de master mix, 1 µL de sonde TaqMan et 5 µL d'eau. La qPCR est réalisée selon le programme du fournisseur, dans un thermocycleur Biorad. L'efficacité des sondes TaqMan est réalisée sur un lot de 10 blastocystes, dilué par 5 dilutions en série, avec un facteur 1/2 entre chaque dilution. L'expression des gènes est représentée sous forme de quantification relative (QR), calculée avec la méthode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , et en utilisant le gène de référence *Gapdh* et en normalisant avec l'échantillon B :  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{Gapdh}})_{\text{échantillon A}} - (Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{Gapdh}})_{\text{échantillon B}}$  (Schmittgen & Livak, 2008).

### 3. Sondes TaqMan

Gène	Identification de la sonde TaqMan
<i>H2afz</i> (référence)	Mm02018760_g1
<i>Patl2</i>	Mm01326226_m1
<i>Gapdh</i> (référence)	Mm99999915_g1
<i>Scd1</i>	Mm00772290_m1
<i>Epas1</i>	Mm01236112_m1
<i>Birc5</i>	Mm00599749_m1
<i>Gpx1</i>	Mm00656767_g1
<i>Pou5f1</i>	Mm03053917_g1

**Tableau 3 : Liste des sondes TaqMan utilisées.**

Les sondes TaqMan utilisées proviennent de chez ThermoFisher Scientific.

## III. Synthèse d'ARNm de *Patl2* et *mCherry*

### 1. Transformation bactérienne et culture

La transformation bactérienne est réalisée à partir de bactéries *E.Coli* compétentes *One Shot® TOP10F' Competent Cells* (Invitrogen, C3030-03), et selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, 50 µL de bactéries sont décongelées et incubées sur glace pendant 30 min avec 10 ng de plasmide contenant le gène d'intérêt (*Patl2* ou *mCherry*) ainsi qu'un gène de résistance à un antibiotique, ici la kanamycine. La transformation bactérienne est réalisée par choc thermique, précisément à 42 °C pendant 30 sec, ce qui permet de créer des pores membranaires afin de faire rentrer le matériel génétique. Après l'ajout de 250 µL de milieu SOC, milieu optimisé pour la croissance des bactéries transformées, et une incubation de 1 h 30 à 37 °C, les bactéries sont étalées sur du milieu LB-Agar + kanamycine 50 µg/mL et laissées toute une nuit à 37 °C. Le

lendemain, une pré-culture dans 2 mL de milieu LB + kanamycine 50 µg/mL est réalisée à partir d'une colonie isolée. Après 6 h d'incubation à 37 °C sous agitation, cette pré-culture est utilisée pour faire une culture bactérienne plus conséquente, dans 200 mL de milieu LB + kanamycine 50 µg/mL, et incubée toute la nuit à 37 °C. La culture bactérienne est ensuite centrifugée pendant 15 min à 4 °C à 6000 g. Le surnageant est retiré et le culot bactérien est conservé à -20 °C jusqu'à extraction et purification de l'ADN plasmidique.

## 2. Extraction et purification d'ADN plasmidique

La purification d'ADN est réalisée par chromatographie échangeuse d'anions, à partir du kit *NucleoBond Xtra Midi* (Macherey-Nagel, 740410.50) et selon les recommandations du fournisseur. Le culot bactérien est repris dans un milieu contenant des RNase puis les cellules sont lysées dans un milieu contenant du SDS permettant de dénaturer les complexes nucléoprotéiques. Le lysat est alors passé sur une colonne chargée positivement, ce qui permet la fixation de l'ADN chargé négativement. Les débris cellulaires et les protéines sont éliminés par lavages, puis l'ADN est élué avec un tampon riche en sels. L'ajout d'isopropanol dans l'éluât permet de faire précipiter l'ADN qui sera culoté par centrifugation. Ce culot d'ADN est lavé à l'éthanol et séché puis repris dans de l'eau stérile.

## 3. Préparation d'ARNm à partir d'ADN

L'ADN plasmidique est linéarisé avec les enzymes de restriction CutSmart (New England Biolab) MFE1 et AGE1 pour *mCherry* et *Pat12* respectivement. L'ADN linéarisé est ensuite purifié avec le kit *Monarch PCR & DNA cleanup* (New England Biolab, T1030L), et selon les recommandations du fournisseur. Deux protocoles différents ont été utilisés pour synthétiser l'ARN *Pat12* à partir de 1 µg d'ADN :

(1) : le kit *hiscribe T7 ARCA mRNA* (Biolabs, E2060S) permet de réaliser la transcription *in vitro* et l'ajout de la queue poly(A), selon les recommandations du fournisseur.

(2) : le kit *T7-FlashScribe™ Transcription* (Cellscript, C-ASF3507) permet de réaliser la transcription *in vitro*, puis la queue poly(A) est ajoutée avec le kit *A-Plus™ Poly(A) Polymerase Tailing* (Cellscript C-PAP5104H), selon les recommandations du fournisseur.

L'ARN *mCherry* a été synthétisé avec le kit n°1. Pour finir, l'ARN est purifié avec le kit *NucleoSpin RNA Clean-up* (Macherey-Nagel, 740948.50). L'éluat des ARNm est réalisée avec de l'eau stérile dépourvue de RNase. Afin de limiter l'obstruction des pipettes utilisées pour la microinjection dans les ovocytes, les ARNm sont filtrés avec des filtres de 0,1 µm (*Ultrafree®-MC and -CL Centrifugal Filter*, Sigma-Aldrich UFC30VV25). Les ARNm sont ensuite dosés au Qubit, aliquotés et conservés à -80 °C.

#### 4. Electrophorèse sur gel d'agarose

Afin de vérifier l'intégrité des ARNm synthétisés, 500 ng sont déposés sur un gel d'agarose 1,5 % contenant du gel red. Après environ 40 min de migration à 110 V, le gel est observé sous un rayonnement ultraviolet.

#### 5. Observation des protéines produites à partir des ADN ou ARNm *mCherry* et *Patl2*

MCHERRY étant une protéine fluorescente, sa production à partir de l'ADN ou de l'ARNm peut être vérifiée directement en microscopie à fluorescence. Pour cela, deux méthodes sont ici employées : l'injection d'ARNm *mCherry* dans les ovocytes ou la transfection de cellules HEK-293T.

Contrairement à *mCherry*, les ADN et ARNm *Patl2* ne permettent pas la production d'une protéine fluorescente pouvant être détectée directement. Cependant, une étiquette « DDK » composée de 8 acides aminés est présente à l'extrémité C-terminale de la protéine et permet sa détection avec un anticorps spécifique. Ainsi, la production de protéines PATL2 à partir d'ADN et d'ARNm est vérifiée par Western Blot à partir d'extraits protéiques de cellules HEK-293T transfectées ou bien par immunofluorescence sur des embryons obtenus par ICSI au cours de laquelle l'ADN ou l'ARNm *Patl2* a été injecté.

### IV. Microinjection d'ovocytes au stade GV

Les morpholinos sont introduits dans les ovocytes GV par microinjection à l'aide d'un microinjecteur  $\mu$ PUMP (World Precision Instruments) sur lequel est fixée une pipette d'injection PI-1,6 (BioMedical Instruments). Le volume de solution injectée dans les ovocytes est difficile à estimer et à contrôler. Les morpholinos sont donc co-injectés avec de l'ARNm codant pour la protéine fluorescente *mCherry*. L'obtention d'ovocytes fluorescents permet de vérifier que l'injection a fonctionné, l'intensité de fluorescence permet de comparer la quantité de solution injectée dans les différents ovocytes. Un contrôle est réalisé avec un morpholino contrôle qui n'affecte pas l'expression du gène d'intérêt et n'induit aucun phénotype dans les ovocytes. Pour plus de simplicité, ces morpholinos sont appelés « morpholinos-contrôle », les morpholinos utilisés pour inhiber PATL2 sont appelés « morpholinos-Patl2 ». Le protocole utilisé est inspiré des articles suivants : (Eisa et al., 2019; Oh, Han, & Conti, 2010).

Les ovocytes au stade GV sont préparés selon la méthode décrite précédemment, puis injectés dans du milieu HCZB supplémenté avec de la cilostamide 1 mM. La pipette d'injection est remplie avec 3  $\mu$ l d'une solution de morpholinos 1 mM et d'ARNm *mCherry* 20 ng/ $\mu$ l, diluée dans de l'eau stérile et dépourvue de RNase. Afin d'éviter l'obstruction des pipettes d'injection, les morpholinos et les ARNm sont filtrés avec des filtres de 0,1  $\mu$ m (Sigma-Aldrich, UFC30VV25). Chaque ovocyte est injecté individuellement avec les paramètres d'injection suivants : pression d'injection = 12 kPa, pression de compensation = 0,50 kPa, temps d'injection = 0,2 s. Les ovocytes sont ensuite incubés dans du milieu M16 + cilostamide 1mM pendant 24 h, temps nécessaire à l'action des morpholinos et appelé « temps de blocage ».

## V. Maturation ovocytaire *in vitro*

Comme détaillé dans l'introduction, le blocage méiotique au stade GV est maintenu par l'AMPc qui, par l'intermédiaire de plusieurs protéines kinases dont PKA et WEE1, permet la phosphorylation des résidus thréonine 14 et tyrosine 15 du MPF. Dans cet état de phosphorylation, le MPF est inactif et la méiose est bloquée en prophase I. Dans l'ovocyte, une partie de l'AMPc est produite à partir du cGMP fourni par les cellules de la granulosa, et transféré vers les ovocytes par les jonctions communicantes. Chez la souris, le retrait des cellules folliculaires des ovocytes GV prélevés dans les follicules antraux permet une reprise spontanée de la maturation méiotique. Afin de coordonner ce processus, les ovocytes au stade GV sont tout d'abord préparés dans du milieu M2 contenant de la cilostamide 1  $\mu$ M, un inhibiteur de phosphodiesterases qui, en bloquant l'hydrolyse des liaisons phosphodiesteres, prévient la dégradation de l'AMPc. Les cellules folliculaires sont retirées manuellement avec une pipette très fine puis les ovocytes sont soigneusement rincés dans du milieu M16 dépourvu de cilostamide. Après 16 h d'incubation à 37 °C + CO<sub>2</sub> 5 %, le taux de maturation est déterminé par l'observation du premier globule polaire.

## VI. Immunofluorescence

### 1. Immunofluorescence sur ovocytes et embryons

Les ovocytes/embryons sont tout d'abord fixés pendant 10 min dans une solution de PFA 4 % puis soigneusement lavés dans du PBS-PVP 0,5 %. Une étape de perméabilisation, réalisée à température ambiante pendant 20 min dans du PBS-Triton 0,25 %, est suivie d'une étape de blocage de 90 min dans du PBS (Phosphate Buffered Saline), NGS (Normal Goat Serum) 2 %, Triton 0,1 %, à température ambiante. Les échantillons sont ensuite marqués avec les anticorps primaires dilués dans la solution de blocage, au cours d'une incubation réalisée à 4 °C, durant toute une nuit. Le lendemain, après deux étapes de lavages de 10 min dans du PBS-PVP 0,5 %, les échantillons sont incubés avec l'anticorps secondaire, dilué dans la solution de blocage supplémentée de Hoechst 33342 (2  $\mu$ l/mL), pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Deux lavages sont finalement réalisés afin d'éliminer les anticorps non fixés. Les échantillons sont ensuite conservés à 4 °C dans du PBS-PVP 0,5 %.

Observation du fuseau méiotique : les ovules MII proviennent de femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>. Chaque ovule est observé avec un microscope confocal (Nikon) permettant de réaliser une acquisition en « z-stack » (80 images/ovule, différence de profondeur entre chaque image = 1  $\mu$ m). La reconstruction 3D de chaque ovule est réalisée avec le logiciel Nis Element.

Quantification de PATL2-HA : Les ovocytes GV et MII proviennent de femelles issues de la lignée PATL2-HA. Les embryons ont été formés à partir d'un ovule PATL2-HA et d'un spermatozoïde B6D2. Des embryons contrôles sont formés à partir d'individus B6D2. La quantification du signal PATL2-HA est réalisée avec le logiciel Zen. Les réglages sont réalisés à partir d'un échantillon traité sans anticorps primaire.

Quantification de PATL2-DDK : Les ovules sont obtenus à partir de femelles B6D2 et injectés avec des acides nucléiques permettant la production d'une protéine PATL2 avec une étiquette « DDK », détectée avec un anticorps anti-DDK. La quantification du signal PATL2-DDK est réalisée avec le logiciel Zen. Les réglages sont réalisés à partir d'un échantillon traité sans anticorps primaire.

## 2. Anticorps

Expérience	Antigène ciblé	Espèce de production	Dilution	Fournisseur (référence)
Observation du fuseau méiotique	$\beta$ -tubuline	Souris	1/800	Sigma Aldrich (T4026)
	AC secondaire: IgG souris (Dylight 549)	Chèvre	1/400	Jackson Immuno Research (115-505-062)
Expression de PATL2	Etiquette HA (« tag »)	Rat	IF : 1/800 WB : 1/1000	Roche (11867423001)
	AC secondaire : IgG rat (Alexa fluor 488)	Chèvre	1/400	Life Technologies (A11006)
	AC secondaire : IgG rat (HRP)	Chèvre	1/5000	Millipore (AP136P)
Production de PATL2-DDK à partir d'ADN ou d'ARNm	Etiquette DDK	Souris	IF : 1/500 WB : 1/1000	Origène (TA50011-1)
	Etiquette DDK	Souris	IF : 1/500	Sigma-Aldrich (F3165)
	AC secondaire : IgG souris (Alexa fluor 488)	Chèvre	1/1000	Invitrogen (A11001)
	AC secondaire : IgG souris (HRP)	Chèvre	1/10000	Jackson Immuno Research (115-035-174)

**Tableau 5: Liste des anticorps utilisés.**

« AC » = anticorps.

## VII. Western Blot

### 1. Transfection de cellules HEK-293T

Les cellules HEK-293T (Human Embryonic Kidney) sont des cellules dérivées de rein embryonnaire humain et ayant été modifiées pour créer une lignée cellulaire capable de proliférer indéfiniment. Ces cellules sont largement utilisées pour les expériences de transfection, procédé permettant l'introduction de matériel génétique dans les cellules eucaryotes. La transfection des cellules HEK-293T avec de l'ADN ou de l'ARN est réalisée avec les agents de transfection JetPrime (Polyplus, 101000027) et JetMessenger (Polyplus, 101000056) respectivement. Ces méthodes de

transfection reposent sur l'utilisation de polymères cationiques chargés positivement, qui forment des complexes avec les acides nucléiques chargés négativement, et qui permettent le passage des acides nucléiques à travers les membranes biologiques, également chargées négativement (Damodaran, Courtheoux, Watrin, & Prigent, 2020). La transfection des cellules HEK-293T est réalisée selon les recommandations du fournisseur. Les cellules HEK-293T sont d'abord ensemencées dans du milieu DMEM supplémenté en FBS 10 % + pénicilline/streptomycine et cultivées à 37 °C + 5 % CO<sub>2</sub>. Le lendemain, les acides nucléiques sont mélangés à l'agent de transfection et son tampon, vortexés et incubés 10 min à température ambiante. Le tout est ensuite ajouté aux cellules et ces dernières sont remises en culture pendant 48 h. Un contrôle de transfection est réalisé avec des acides nucléiques codant pour la protéine fluorescente mCherry, un contrôle négatif est réalisé avec des cellules non transfectées.

## 2. Extraction de protéines

### 2.a. De cellules HEK-293T

Les cellules sont lavées au PBS puis décollées à la trypsine et centrifugées à 4 °C et 1500 RPM pendant 5 min. Après élimination du surnageant contenant la trypsine, le culot est repris dans du tampon de lyse (Thermo Scientific, 87787) supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases sans EDTA (Roche, 11836170001). Le lysat est alors agité sur roue à 4 °C pendant 2 h puis centrifugé à 16 000 g à 4 °C pendant 10 min. L'extrait protéique contenu dans le surnageant est dosé avec le kit *QuantiPro™ BCA Assay* (Sigma-Aldrich QPBCA), repris dans du Laemmli 5X + β-mercaptoéthanol 5 % puis chauffé pendant 10 min à 95 °C.

### 2.b. D'ovocytes et embryons

Les ovocytes et les embryons sont préparés comme décrit précédemment, lavés 3 fois dans du PBS-PVP 0.5 %, puis mélangés à du Laemmli 5X + β-mercaptoéthanol 5 % de façon à obtenir un volume inférieur à 20 µL. L'échantillon est chauffé pendant 10 min à 95 °C puis conservé à -80 °C jusqu'à utilisation.

## 3. Western Blot

Le Western Blot est réalisé à partir de l'extrait protéique repris dans du Laemmli + β-mercaptoéthanol et ayant été chauffé pendant 10 min à 95 °C. Le tampon de charge est ici contenu dans le laemmli.

Pour un Western Blot sur ovocytes ou embryons, l'intégralité de l'échantillon est déposée sur un gel 4–20 % *TGX Mini-PROTEAN stain-free precast gel* (Bio-Rad). Pour un Western Blot sur cellules HEK-293T, 30 µg de protéines sont déposées. Les échantillons sont migrés pendant 35 min à 160 V puis observés dans le gel sous une lumière UV pour vérifier que les puits contiennent une quantité équivalente de protéines. Les protéines sont transférées sur une membrane en Polyfluorure de vinylidène (PVDF) puis bloquées en PBS-Tween 0,1 %-Lait 5 % pendant 1 h à température ambiante. Après une nuit d'incubation à 4 °C avec les anticorps primaires dilués dans la solution de blocage, 3 lavages de 5 min sont réalisés dans du PBS-tween 0,1 %. L'incubation avec les anticorps secondaires, couplés à la HRP (Horse radish peroxidase) et également dilués dans la

solution de blocage, est réalisée à température ambiante pendant 1 h. Après trois nouveaux lavages en PBS-tween 0,1 %, la membrane est incubée avec le substrat de la HRP et les protéines ciblées par les anticorps sont observées par chimioluminescence.

## VIII. Analyses statistiques

Un test de Shapiro-Wilk est d'abord réalisé pour savoir si la distribution des données suit une loi normale. Si la normalité est validée, la comparaison des moyennes de deux groupes est réalisée avec un test de Student. Si au moins une série de données ne suit pas une loi normale, l'analyse est réalisée avec un test de Mann-Whitney.

L'étude du développement embryonnaire nécessite de comparer un nombre de groupes supérieur à deux. La normalité n'étant pas vérifiée, un test de Kruskal-Wallis est tout d'abord réalisé pour savoir si au moins un des groupes est différent d'un autre groupe. Le résultat étant positif, le test de comparaison multiple de Dunn permet d'identifier le ou les groupe(s) différent(s) des autres.

La comparaison des échantillons d'un point de vue statistique est réalisée avec le logiciel GraphPad Prism. Pour chaque test, une p-valeur inférieure à 0,05 est considérée comme significative.

# Résultats

---

## 1ère partie : Etude d'un modèle de mauvaise qualité ovocytaire chez la souris, le modèle *Patl2*<sup>-/-</sup>

---

### I. Problématique

Chez la femme, l'ovogenèse est un processus long et complexe qui débute au cours du développement embryonnaire par la production de plusieurs millions d'ovogonies. Ces ovogonies rentrent en première division méiotique pour former des ovocytes primaires, bloqués au stade diplotène de la première prophase. A la naissance, ces ovocytes, appelés GV, constituent la réserve ovarienne de la femme. Ce n'est qu'à partir de la puberté que, périodiquement, un groupe d'ovocytes entre en croissance, processus caractérisé par une forte augmentation du volume des ovocytes et une multiplication active des cellules folliculaires qui l'entourent. Devenus sensibles aux stimuli hormonaux, une partie de ces ovocytes entre en maturation méiotique, étape marquée par la rupture de la vésicule germinale (GVBD) et l'extrusion du premier globule polaire. Lors de l'ovulation, les ovules sont bloqués en métaphase de seconde division méiotique (MII). L'accomplissement de cette seconde division méiotique étant dépendante de facteurs apportés par le spermatozoïde, elle ne se fera qu'après la fécondation et se manifeste par l'extrusion du second globule polaire.

Dans l'ovocyte, la GVBD est marquée par un arrêt de la transcription, cette dernière ne reprendra qu'à partir de l'activation du génome embryonnaire (EGA), soit au stade 2-cellules chez la souris et au stade 4-8-cellules chez la femme. De ce fait, les protéines nécessaires à la maturation ovocytaire, à la fécondation et au développement embryonnaire jusqu'à l'EGA sont formées à partir des transcrits produits au cours de la croissance ovocytaire. La régulation correcte du stockage de ces transcrits, de leur dégradation et de leur traduction au moment opportun est donc primordiale à la production d'ovules de qualité, capables de se développer et de former un embryon viable.

L'échec de maturation ovocytaire est un type d'infertilité féminine caractérisé par la production d'ovules immatures et inaptes au développement d'un embryon (voir chapitre 6.II.3 « *L'échec de maturation ovocytaire* »). Une des causes génétiques identifiées dans ce type d'anomalie chez la femme est la mutation du gène *PATL2*. Malgré un cycle menstruel d'apparence normal, les femmes atteintes sont infertiles et ne produisent que des ovules immatures, majoritairement bloqués au stade GV (B. Chen et al., 2017; M. Christou-Kent et al., 2018). En 2018, notre équipe a validé l'implication de *PATL2* dans ce phénotype, par la production d'une lignée de souris déficiente en *PATL2* (*Patl2*<sup>-/-</sup>). Bien qu'ayant un phénotype moins sévère que les femmes, les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> sont fortement sous-fertiles. Lorsque l'ovulation est stimulée hormonalement, ces femelles produisent une quantité anormalement élevée d'ovules immatures et le développement embryonnaire est fortement altéré (M. Christou-Kent et al., 2018). Le premier objectif de cette thèse est d'étudier le profil d'expression de *PATL2* chez la souris, puis de réévaluer l'impact de l'absence de *PATL2* sur la qualité ovocytaire et embryonnaire, en absence de stimulation hormonale. Sachant que la stimulation ovarienne peut altérer la qualité des ovules

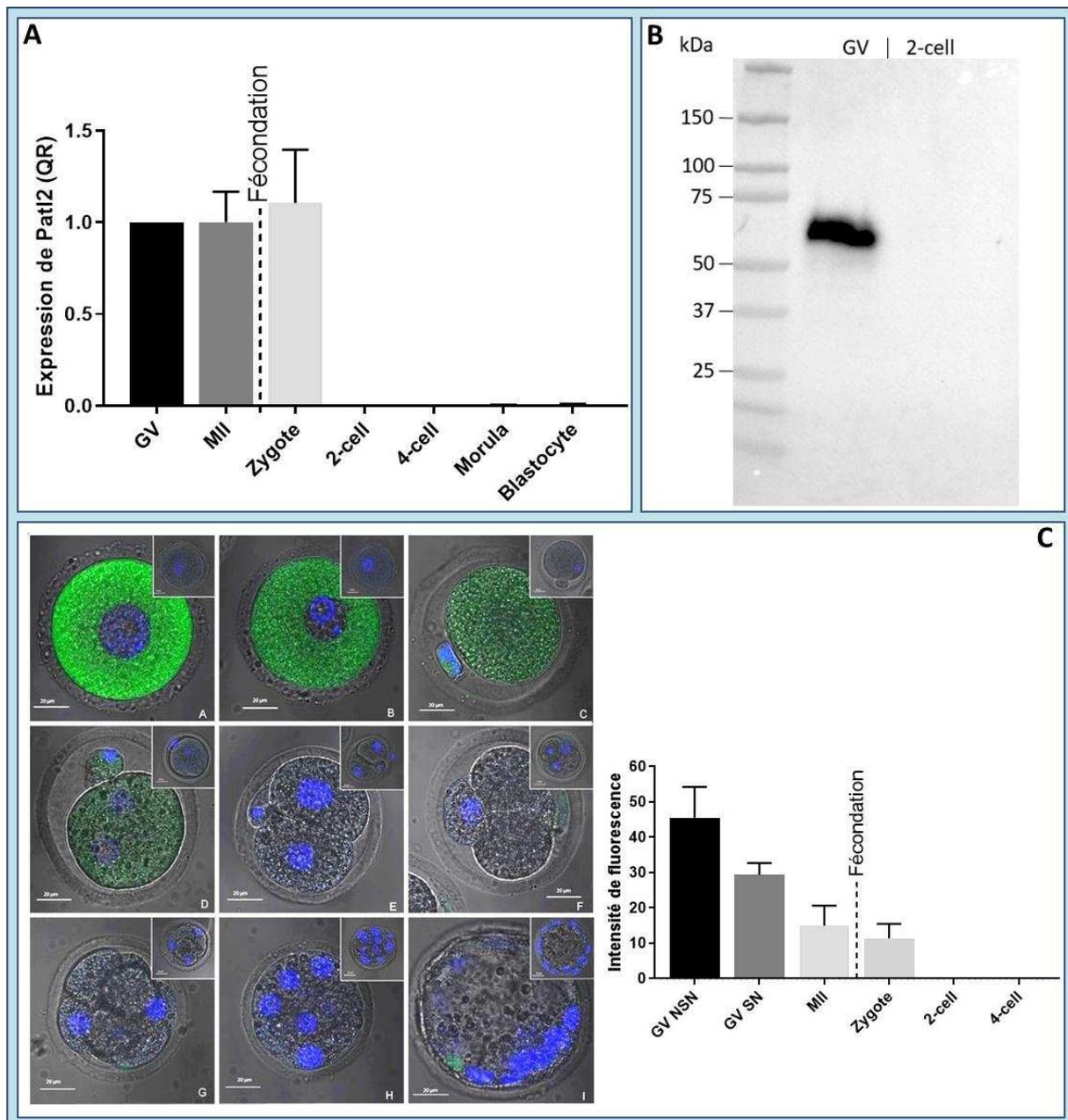
de souris, l'étude de qualité ovocytaire et embryonnaire en ovulation naturelle permettra de n'étudier que les défauts liés à l'absence de PATL2 et de s'affranchir des défauts liés à la super-ovulation. Pour des raisons pratiques, le profil d'expression de PATL2 a été étudié dans des ovules et des embryons obtenus après stimulation ovarienne.

## II. PATL2, une protéine ovocytaire, éliminée après la fécondation chez la souris

Du fait de la difficulté de production d'un anticorps anti-PATL2 spécifique, une lignée de souris « PATL2-HA » dans laquelle une étiquette (« tag ») HA (Human Influenza Hemagglutinin) a été insérée à l'extrémité C-terminale de PATL2, a été générée par CRISPR/Cas9. Du fait de sa petite taille (9 acides aminés), cette étiquette est moins susceptible d'impacter la localisation et la fonction de la protéine étiquetée PATL2. D'ailleurs, la fertilité des souris PATL2-HA (mâles et femelles) n'est pas altérée, ce qui suggère que PATL2 fonctionne normalement. Cette lignée de souris a été utilisée afin d'étudier l'expression de PATL2 dans les ovocytes et les embryons, à partir du stade ovocytaire GV NSN et jusqu'au stade embryonnaire blastocyste. Les ovules et les embryons ont été obtenus à partir de femelles hormonalement stimulées. Des analyses de RT-qPCR ont été réalisées pour étudier la quantité d'ARNm codant pour PATL2 dans les ovocytes et les embryons, et des analyses d'immunofluorescence et de Western Blot ont permis de quantifier PATL2 en termes de protéines.

Dans les expériences d'immunofluorescence, l'absence de signal dans les ovocytes et les embryons obtenus à partir des individus B6D2 confirme la spécificité de l'anticorps anti-HA utilisé pour détecter la protéine « taguée » PATL2-HA. Le signal fluorescent correspondant à PATL2-HA est intense dans les ovocytes GV NSN (transcriptionnellement actifs) et diminue progressivement au cours de la maturation ovocytaire, persiste légèrement dans les zygotes et disparaît dans les embryons au stade 2-cellules (**Figure 61.C**). La disparition de la protéine PATL2 au stade 2-cellules est confirmée par Western Blot (**Figure 61.B**). De façon surprenante, les images d'immunofluorescence montrent un petit signal vert dans les embryons aux stades 4-cellules, 8-cellules et blastocyste. L'absence de colocalisation avec le Hoechst (ADN) indique que ce signal ne correspond pas à une cellule entière.

Les résultats de RT-qPCR confirment que PATL2 est fortement exprimée dans les ovocytes (GV et MII) et les zygotes, et disparaît à partir du stade 2-cellules (**Figure 61.A**).



**Figure 61 : Profil d'expression de PATL2 dans les ovocytes et les embryons chez la souris.**

A : quantification relative (QR) de l'expression de *Patl2* par RT-qPCR, dans des ovocytes et des embryons issus d'individus B6D2. Gène de référence = *H2afz*. 25 ovocytes ou embryons par lot, n = 4.

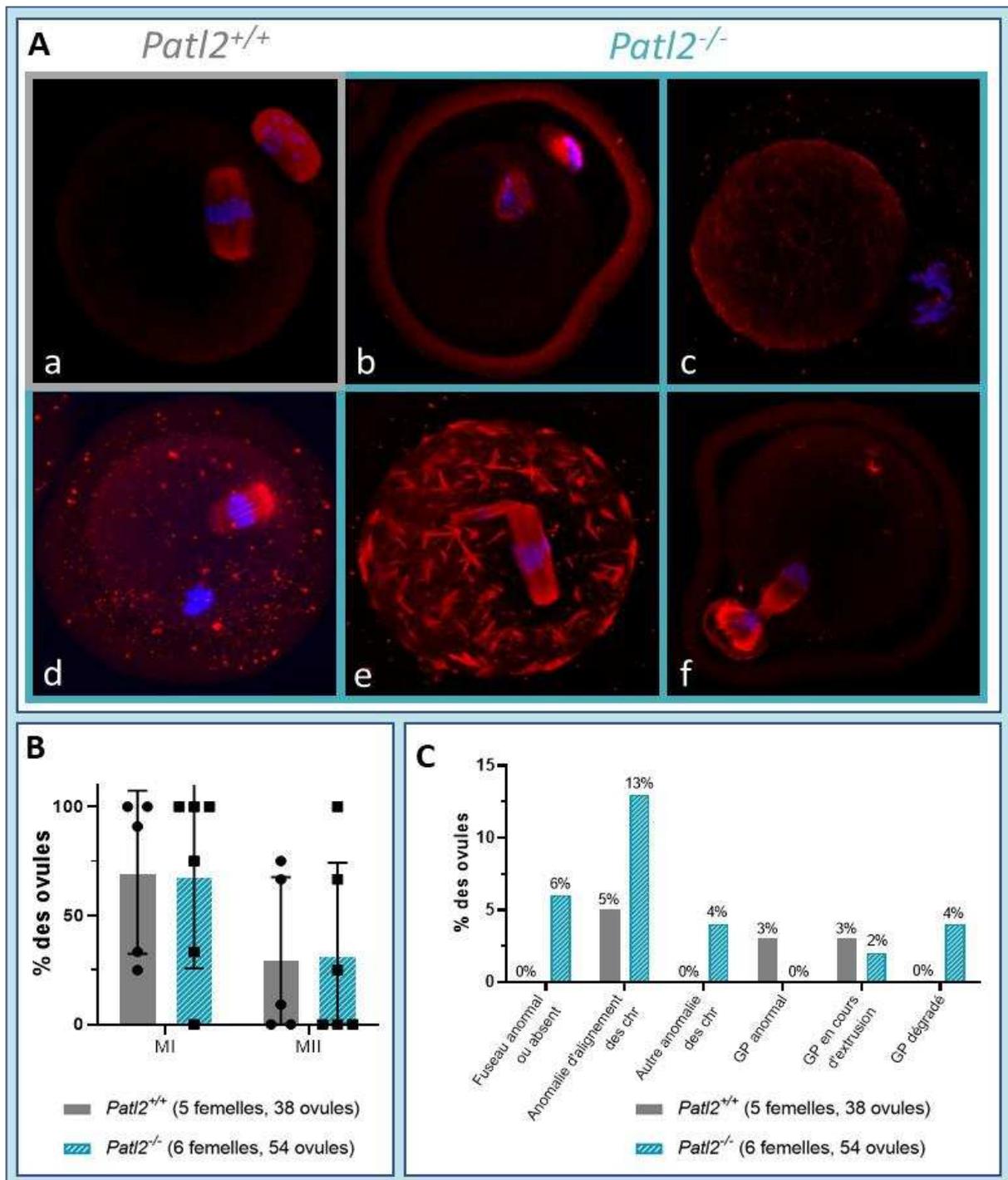
B : détection de la protéine PATL2-HA dans les ovocytes GV et dans les embryons au stade 2-cellules par **Western Blot** avec un anticorps primaire anti-HA. 120 à 130 ovocytes/embryons issus d'une femelle de la lignée PATL2-HA sont déposés par puits. PATL2-HA attendue = 60,74 kDa.

C : détection de la protéine PATL2-HA dans les ovocytes et les embryons issus d'une femelle de la lignée PATL2-HA, par **immunofluorescence**, avec un anticorps primaire anti-HA (vert). L'ADN est marqué avec du Hoechst 33342 (bleu). L'intensité de fluorescence (unités arbitraires) est mesurée avec le logiciel Zen et normalisée avec des images d'ovocytes et embryons B6D2 aux mêmes stades (visualisées en haut à droite). Barre d'échelle = 20 µm. A : ovocyte GV NSN. B : ovocyte GV SN. C : ovule MII. D : zygote. E : 2-cellules. F : 4-cellules. G : 8-cellules. H : morula. I : blastocyste.

### III. L'absence de PATL2 est responsable de défauts ovocytaires modérés

L'influence de l'absence de PATL2 sur la qualité ovocytaire est étudiée à partir de la lignée de souris *Patl2*<sup>-/-</sup>. Dans l'étude précédemment réalisée par Marie Christou-Kent et ses collègues, les ovules étaient obtenus à partir de femelles hormonalement stimulées avec du PMSG pour stimuler la croissance folliculaire, et de l'HCG pour déclencher l'ovulation (M. Christou-Kent et al., 2018). Cette pratique courante permet d'augmenter la quantité d'ovules prélevés mais peut altérer la qualité ovocytaire et perturber le profil d'expression des gènes (Linke et al., 2013; Ozturk et al., 2016). Afin de se positionner dans un environnement physiologique et n'étudier que les défauts ovocytaires liés à l'absence de PATL2, j'ai répété cette étude avec des ovules *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> ovulés naturellement. L'état de maturation des ovules est évalué par la présence, ou non, de la vésicule germinale ou du premier globule polaire. L'aspect du fuseau méiotique est observé par immunofluorescence, par l'intermédiaire d'un marquage de la tubuline.

Les ovules naturellement ovulés par les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> sont collectés et l'évaluation de leur qualité est réalisée par des critères morphologiques (taux de maturation, observation du fuseau méiotique). De façon surprenante, aucun ovocyte bloqué au stade GV n'a été retrouvé chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> et le pourcentage d'ovules bloqués au stade MI est identique chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> (Figure 62.B). En revanche, par comparaison avec les ovules *Patl2*<sup>+/+</sup>, les ovules *Patl2*<sup>-/-</sup> présentent une légère augmentation des anomalies du fuseau méiotique (fuseau(x) de forme anormale, absent ou multiples) et des défauts d'alignement des chromosomes sur le fuseau. D'autres anomalies sont retrouvées dans les ovules *Patl2*<sup>-/-</sup>, dont une mauvaise répartition des chromosomes entre l'ovule et le globule polaire ou la présence d'un globule polaire dégradé, mais ces anomalies ne représentent qu'une minorité (4 %). Les ovules dont le globule polaire est en cours d'extrusion sont retrouvés en proportion équivalente dans les deux génotypes (3 % des ovules *Patl2*<sup>+/+</sup> et 2 % des ovules *Patl2*<sup>-/-</sup>) (Figure 62.C). Les mesures de fuseaux méiotiques ne révèlent pas de différence en termes de longueur et de diamètre, mais l'étalement des chromosomes est augmenté chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> (Figure 63), résultat probablement lié aux anomalies d'alignement des chromosomes observées précédemment.

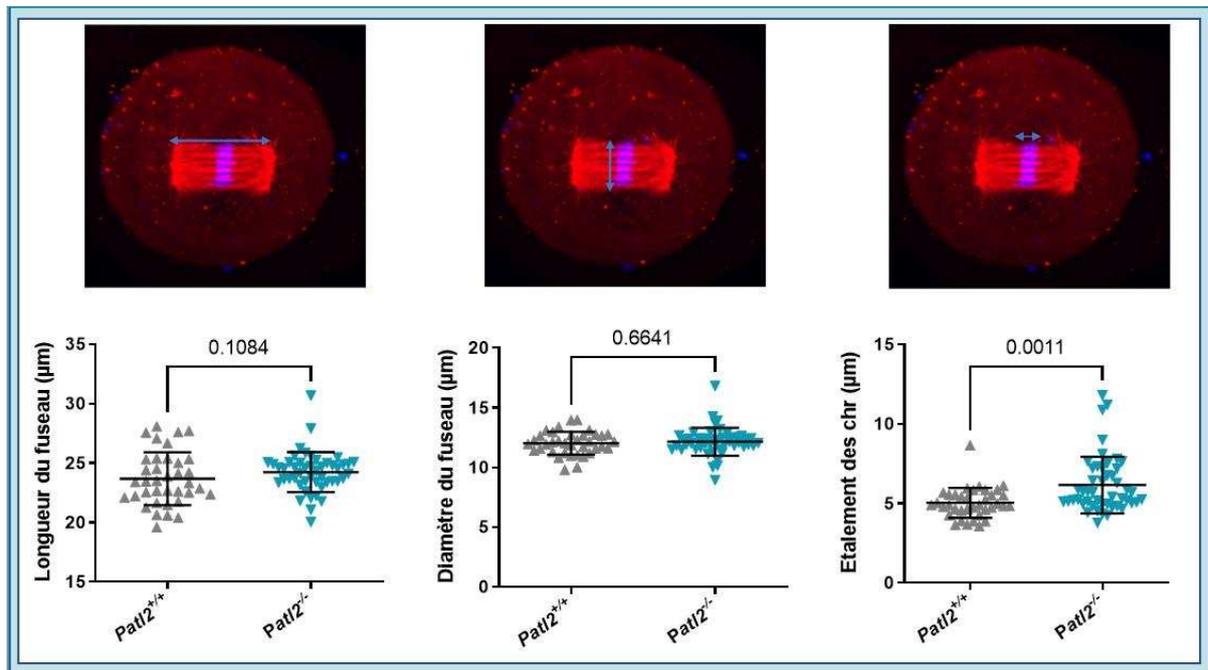


**Figure 62 : Anomalies morphologiques des ovules *Patl2*<sup>-/-</sup> obtenus en ovulation naturelle.**

A : illustration des différents défauts observés sur les ovules *Patl2*<sup>-/-</sup>. Le fuseau méiotique est marqué avec un anticorps anti-tubuline (rouge), l'ADN est marqué avec du Hoechst 33342 (bleu). Dans un ovule *Patl2*<sup>+/+</sup> de qualité optimale (image encadrée en gris), le fuseau prend une forme typique de tonneau et les chromosomes sont correctement alignés au centre du fuseau. Chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>, une augmentation des ovules morphologiquement anormaux (images encadrées en bleu) a été observée. b : fuseau de forme anormale, les chromosomes ne sont pas alignés sur le fuseau. c : fuseau absent, l'ovule ne contient pas de chromosome, il semble que l'intégralité du matériel génétique soit dans le globule polaire. d : fuseau de forme normale, mais l'ADN qui devrait se trouver dans le globule polaire est resté dans l'ovule. e : fuseaux multiples. f : globule polaire en cours d'extrusion.

B : analyse du taux de maturation des ovules *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>. Représentation des données : moyenne +/- déviation standard.

C : classification et quantification des anomalies des ovules *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>. « Chr » = Chromosomes. « GP » = Globule polaire.



**Figure 63 : Influence de l'absence de PATL2 sur la taille du fuseau méiotique.**

A partir de la reconstruction 3D des ovules, différentes mesures sont réalisées avec l'outil « 3D measurement » du logiciel Nis Element. Les images illustrent les paramètres mesurés (flèches bleues) : la longueur du fuseau, son diamètre et l'étalement des chromosomes sur le fuseau. Le diamètre du fuseau est estimé en moyennant deux mesures réalisées en région centrale. Certains fuseaux très anormaux n'ont pas pu être mesurés et ont été exclus de l'analyse. *Patl2*<sup>+/+</sup> : 5 femelles, 38 ovules dont 1 exclus. *Patl2*<sup>-/-</sup> : 6 femelles, 54 ovules dont 6 exclus. Représentation des données : moyenne +/- déviation standard. Analyse statistique : test de Mann-Whitney, échantillons non appariés. Les p-valeurs sont indiquées sur chaque graphique.

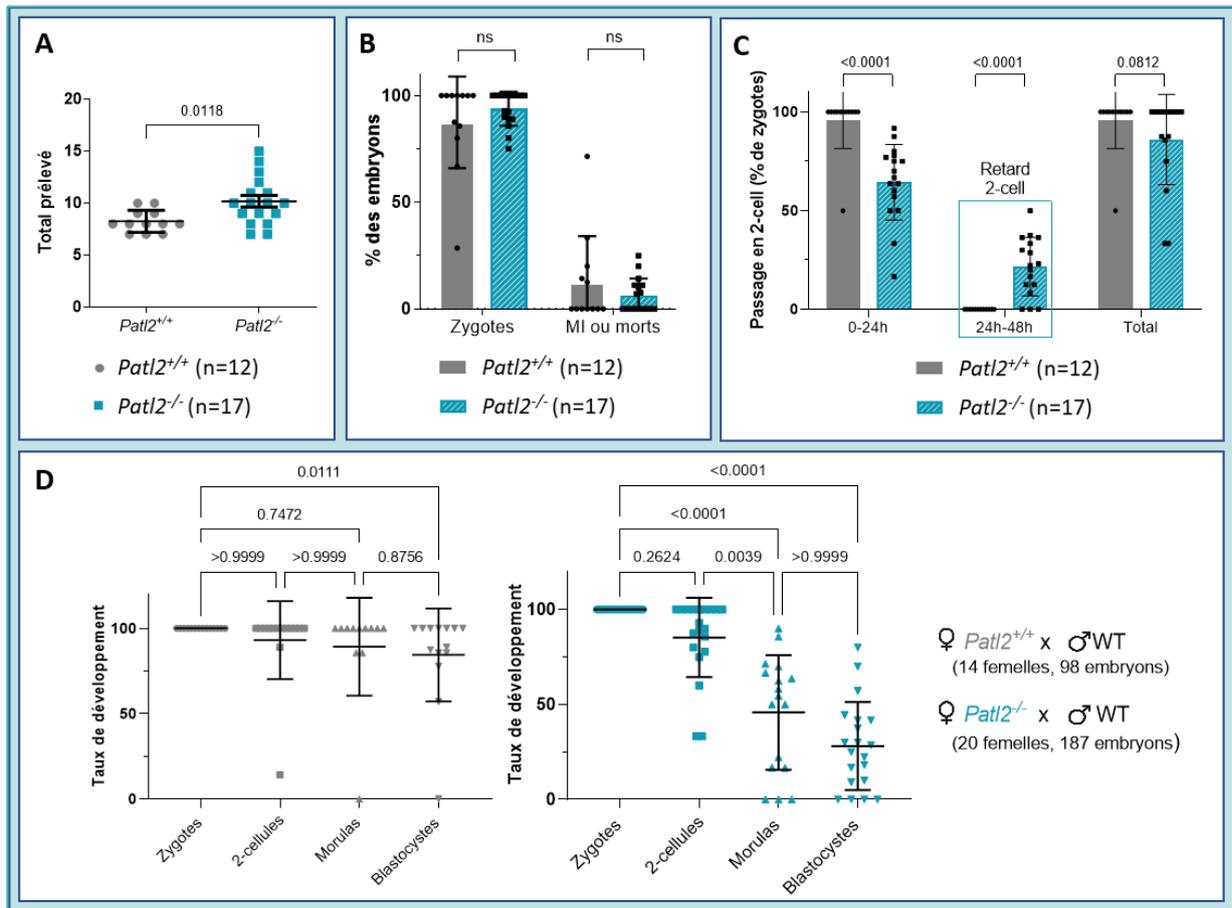
#### IV. L'absence de PATL2 perturbe fortement le développement embryonnaire

L'impact de l'absence de PATL2 sur la qualité embryonnaire est étudié dans la suite de l'étude. Pour cela, des femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> non stimulées sont mises en accouplement avec des mâles fertiles B6D2, les embryons sont prélevés au stade zygote et mis en culture dans du milieu KSOM jusqu'au stade blastocyste. Le suivi du développement des embryons est réalisé quotidiennement.

Par comparaison avec les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup>, le nombre total d'embryons et d'ovules prélevés chez les femelles et *Patl2*<sup>-/-</sup> non stimulées est augmenté (Figure 64.A). Cela suggère que, en ovulation naturelle, le nombre d'ovules par cycle est augmenté en l'absence de PATL2.

Chez les souris *Patl2*<sup>-/-</sup>, la présence d'embryons au stade 2-cellules indique que les ovules sont capables d'être fécondés et d'entamer leur première division. D'ailleurs, ce stade embryonnaire

est atteint dans les mêmes proportions que chez les souris *Patl2<sup>+/+</sup>*. L'analyse chronologique de cette première division montre qu'en moyenne 21,6 % des zygotes issus des femelles *Patl2<sup>-/-</sup>* atteignent le stade 2-cellules entre 24 et 48 h après leur prélèvement alors que l'ensemble des embryons issus des femelles *Patl2<sup>+/+</sup>* ayant atteint le stade 2-cellules ont réalisé leur première division dans les 24 h suivant leur prélèvement (**Figure 64.C**). Chez les souris, le stade 2-cellules est normalement obtenu environ 20 h après la fécondation, ce qui signifie que l'absence de PATL2 entraîne un retard de développement des embryons au stade 2-cellules. D'un point de vue morphologique, les embryons retardataires ne présentent pas d'anomalie flagrante au stade 2-cellules. Chez les femelles *Patl2<sup>+/+</sup>*, seuls 15 % des zygotes n'atteignent pas le stade blastocyste. En revanche, 72 % des zygotes issus des femelles *Patl2<sup>-/-</sup>* stoppent leur développement de manière prématurée, signifiant qu'en l'absence de PATL2, le développement embryonnaire préimplantatoire est fortement altéré (**Figure 64.D**).



**Figure 64 : L'absence de PATL2 est responsable d'une altération du développement embryonnaire préimplantatoire.**

A : comparaison du nombre d'ovules et d'embryons (vivants + morts) prélevés chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>. Représentation des données : moyenne +/- déviation standard. Analyse statistique : test de Student, échantillons non appariés.

B : représentation du pourcentage de zygotes et d'ovules immatures ou morts prélevés chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>. Représentation des données : moyenne +/- déviation standard. Analyse statistique : test de Mann-Whitney, échantillons non appariés.

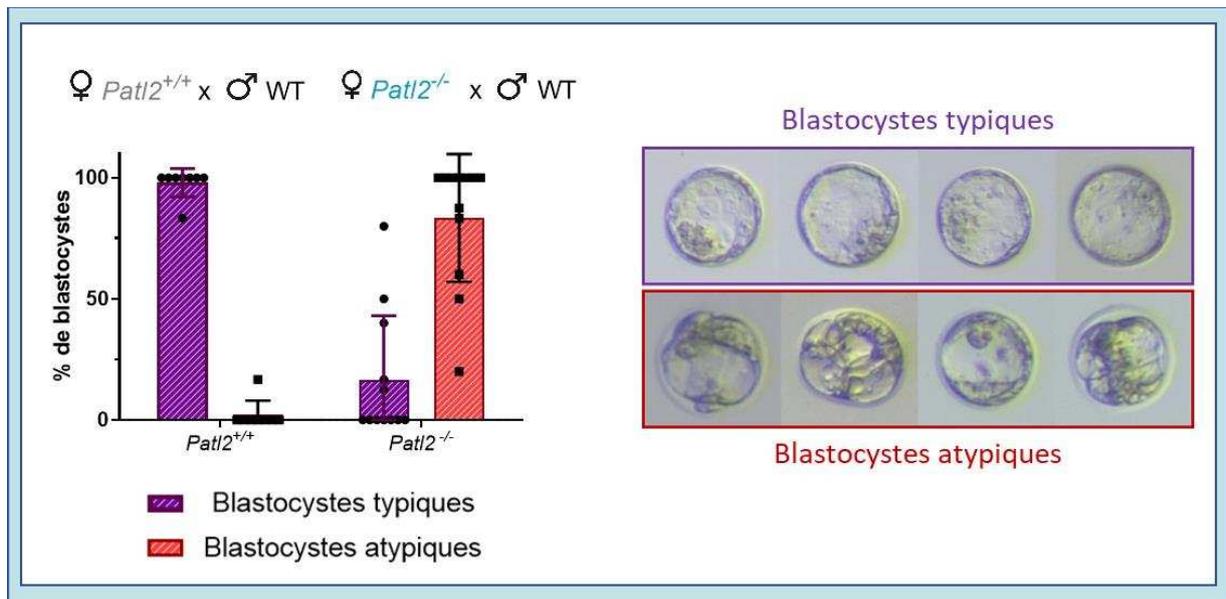
C : représentation du pourcentage de zygotes passés au stade 2-cellules dans les 24 h suivant le prélèvement (chronologie de développement normale) et entre 24 et 48 h après le prélèvement (retard de développement), chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>. Représentation des données : moyenne +/- déviation standard. Analyse statistique : test de Mann-Whitney, échantillons non appariés.

D : suivi du développement embryonnaire du stade zygote jusqu'au stade blastocyste, chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>. Représentation des données : moyenne +/- déviation standard. Analyse statistique : test de comparaison multiple de Dunn, échantillons non appariés.

Les p-valeurs sont représentées sur chaque graphique.

Au 5<sup>ème</sup> jour du développement, les embryons ayant atteint le stade blastocyste sont classés selon leur morphologie. La morphologie d'un blastocyste est dite typique si le blastocyste ne contient pas de blastomère exclu et est composé d'une masse cellulaire interne non fractionnée et d'un blastocœle unique et homogène. Chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>, 85 % des blastocystes obtenus

ont une morphologie atypique avec, par exemple, plusieurs masses cellulaires internes, plusieurs blastocœles ou une fragmentation excessive (Figure 65).



**Figure 65 : Anomalies morphologiques des blastocystes issus des femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>.**

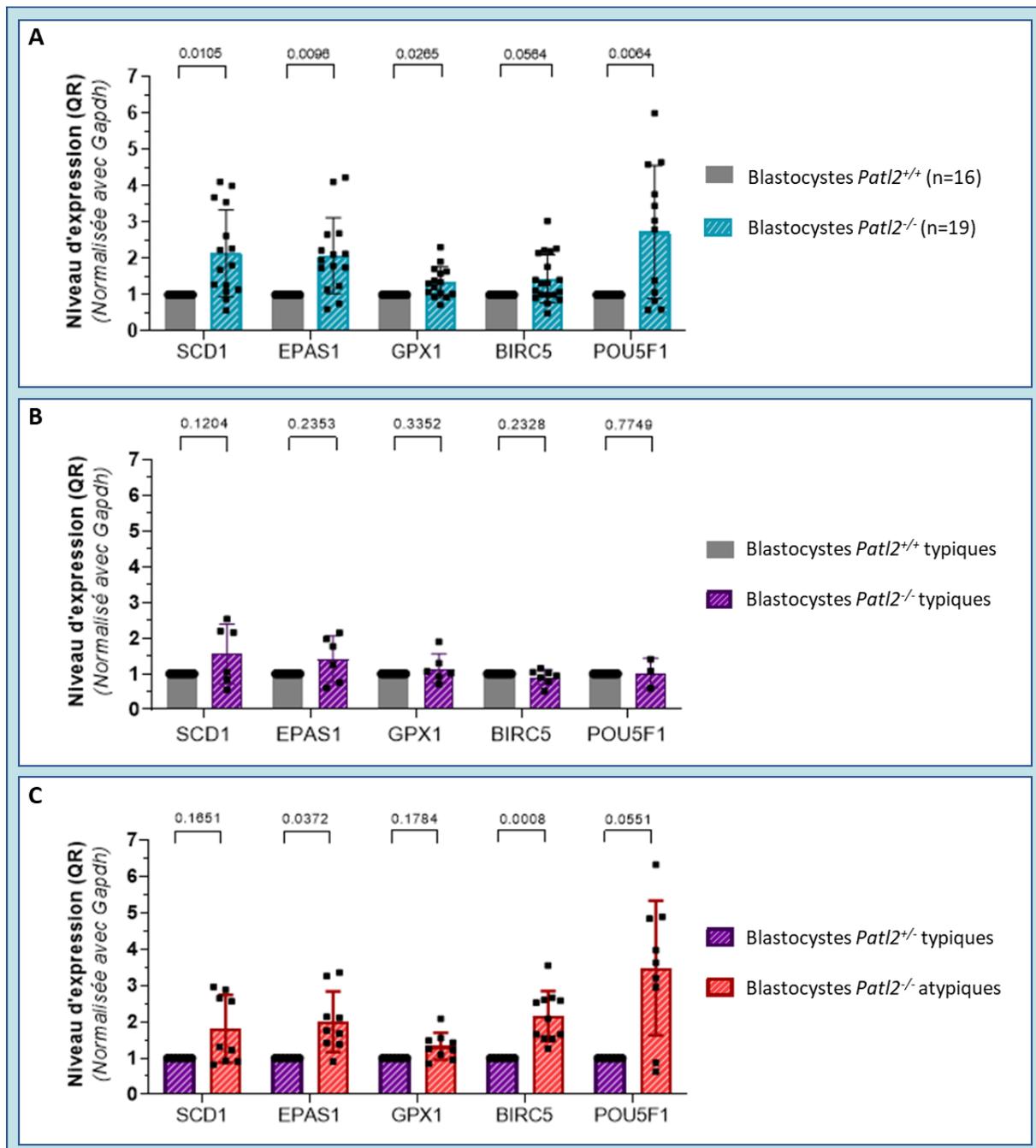
Classification des blastocystes issus des femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> en fonction de leur morphologie (typique ou atypique). Représentation des données : moyenne +/- déviation standard.

Afin de compléter l'analyse morphologique réalisée, l'expression de gènes importants pour le développement embryonnaire est étudiée dans les blastocystes issus de femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>. Cette analyse est réalisée par RT-qPCR sur blastocyste unique et en utilisant *Gapdh* en tant que gène de référence. A partir d'une étude bibliographique (voir chapitre 5.III.2 « *Etude du profil d'expression des gènes dans les embryons* »), 16 gènes d'intérêt, importants pour le développement embryonnaire et dont l'expression varie selon la qualité embryonnaire, ont été sélectionnés afin d'étudier leur expression dans les blastocystes de souris *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> : *Bax*, *Bcl2*, *Gpx1*, *Scd1*, *Slc2a1*, *Slc2a5*, *Hif1a*, *Epas1*, *Igf2*, *Pou5f1*, *Birc5*, *Dnmt3a*, *Phlda2*, *Efna4*, *Prl8a2* et *Tlr8*. Du fait d'une absence totale d'amplification, probablement liée à des sondes TaqMan défectueuses, les gènes *Prl8a2*, *Tlr8* et *Bcl2* ont été éliminés. La quantité de matériel génétique contenue dans un blastocyste unique étant réduite, la suite de l'analyse a été réalisée avec les 5 gènes d'intérêt les plus exprimés, soit *Scd1*, *Epas1*, *Birc5*, *Gpx1* et *Pou5f1*.

Gène	Nom complet	Protéine	Fonction
<i>Gapdh</i> (référence)	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	GAPDH	Phosphorylation oxydative du G3P en 1,3-BPG (glycolyse)
<i>Scd1</i>	Stearoyl-CoA Desaturase	SCD1	Synthèse des acides gras, <b>nécessaire à la formation des gouttelettes lipidiques dans les embryons.</b>
<i>Epas1</i>	Endothelial PAS domain protein 1	Hypoxia-Inducible Factor 2 Alpha (HIF2A)	Facteur de transcription, modifie l'expression de certains gènes en réponse au niveau d'oxygène. <b>Nécessaire à l'implantation.</b>
<i>Birc5</i>	Baculoviral IAP Repeat Containing 5	Survivine	Inhibiteur de l'apoptose, régule la prolifération cellulaire et notamment la <b>différenciation du trophoblaste.</b>
<i>Gpx1</i>	Glutathion Peroxidase 1	GPX1	Protection contre le stress oxydant.
<i>Pou5f1</i>	POU Class 5 Homeobox 1	Octamer-binding transcription factor 4 (OCT-4)	Marqueur de pluripotence, impliqué dans l'embryogénèse précoce, <b>nécessaire à la formation des blastocystes.</b>

**Tableau 6 : Sélection des gènes dont l'expression est utilisée pour évaluer la qualité des blastocystes de souris *Patl2*<sup>-/-</sup>.**

L'expression de 5 gènes importants pour le développement embryonnaire est tout d'abord étudiée dans les blastocystes issus de femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>, indépendamment de la morphologie des embryons. Parmi les 5 gènes étudiés, 4 gènes (*Scd1*, *Epas1*, *Gpx1* et *Pou5f1*) ont un niveau d'expression significativement augmenté (p-valeur < 0.05) dans les blastocystes issus des femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> et 3 (*Scd1*, *Epas1* et *Pou5f1*) ont un taux de changement supérieur ou égal à 2 (Figure 66.A). Cela met en évidence une dérégulation de l'expression de gènes importants pour le développement embryonnaire dans les blastocystes issus de femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>. De façon intéressante, la différence d'expression des gènes dérégulés s'efface lorsque seuls les blastocystes de morphologie typique sont étudiés (Figure 66.B), et s'amplifie dans l'analyse comparant les blastocystes morphologiquement typiques et ceux morphologiquement atypiques, issus des femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> (Figure 66.C). Notons que les blastocystes issus des femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> ont presque toujours une morphologie typique et qu'au moment de l'étude, aucun blastocyste de morphologie atypique n'avait été obtenu chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup>. Ces nouveaux résultats signifient que la dérégulation de l'expression des gènes précédemment observée est associée à la morphologie atypique des blastocystes.



**Figure 66 : Analyse du niveau d'expression de gènes importants pour le développement embryonnaire, dans les blastocystes issus des femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>.**

Les données sont analysées avec la méthode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  permettant de déduire une quantification relative (QR) de l'expression des gènes étudiés. Le gène de référence utilisé est *Gapdh*. Chaque point représente un blastocyste unique.

A : analyse des blastocystes issus des femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>, sans distinction morphologique.

B : analyse incluant exclusivement les blastocystes de morphologie typique, issus des femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>.

C : comparaison des blastocystes morphologiquement typiques et des blastocystes morphologiquement atypiques, issus des femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>.

Représentation des données : moyenne +/- déviation standard. Analyse statistique : test de Student, échantillons non appariés. Les p-values sont indiquées sur chaque graphique.

## V. Discussions

PATL2 est une protéine ovocytaire appartenant à la famille des protéines associées à la topoisomérase II (PAT). Chez la femme et la souris, l'absence de PATL2 est responsable d'échec de maturation ovocytaire, mais la sévérité du phénotype diffère chez ces deux espèces de Mammifères. En effet, les femmes affectées souffrent d'infertilité primaire, caractérisée par l'ovulation de gamètes majoritairement bloqués au stade GV ou atrétiques. Chez la souris, l'absence de PATL2 induit une sous-fertilité, les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> font moins de portées et ont moins de bébés par portée. Suite à une stimulation ovarienne, les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> produisent une proportion anormalement élevée d'ovules défectueux, et notamment des ovules immatures et/ou morphologiquement anormaux. De plus, le transcriptome des ovocytes GV et MII *Patl2*<sup>-/-</sup> est altéré (M. Christou-Kent et al., 2018).

Chez la souris, l'étude du profil d'expression de PATL2 au cours de la folliculogénèse démontre que PATL2 apparaît dans les ovocytes au stade de follicule primordial et atteint un pic d'expression au stade de follicule secondaire (M. Christou-Kent et al., 2018).

La première partie de mon travail de thèse consistait à étudier le profil d'expression de PATL2 dans les ovocytes et les embryons de souris, puis à réévaluer les conséquences de son absence sur la qualité ovocytaire et embryonnaire. Sachant que la stimulation ovarienne peut altérer la qualité et le profil d'expression des ovules et des embryons murins (voir le chapitre 6.II.2 « *La stimulation ovarienne* »), cette nouvelle étude de qualité est réalisée en ovulation naturelle.

### 1. PATL2 est une protéine ovocytaire dont la présence est fortement régulée chez la souris

Au cours de ce travail de thèse, le profil d'expression de PATL2 a été caractérisé à partir du stade ovocyte GV NSN et jusqu'au stade embryonnaire blastocyste. La quantification de PATL2 en termes de protéines a été réalisée en immunofluorescence et en Western Blot. Les résultats d'immunofluorescence indiquent que la protéine PATL2 est abondante dans les ovocytes GV et diminue progressivement au cours de la maturation ovocytaire, puis disparaît dans les embryons à partir du stade 2-cellules. Les expériences de RT-qPCR montrent que la quantité d'ARNm de *Patl2* est stable aux stades GV, MII et zygotes et devient nulle à partir du stade 2-cellules.

Ces résultats impliquent que la traduction de *Patl2* est régulée négativement au cours de la maturation ovocytaire et de la fécondation, et que les ARNm sont détruits pendant le stade zygote. D'ailleurs, *Patl2* n'est pas le seul ARN à être détruit pendant cette phase puisque la dégradation des ARNm ovocytaires suit un plan précis (Tora & Vincent, 2021). En effet, la dégradation des ARNm maternels commence à la reprise méiotique, période au cours de laquelle la moitié des ARNm polyadénylés disparaissent, soit du fait de leur déadénylation, soit du fait de leur dégradation (Bachvarova, 1985; Paynton, Rempel, & Bachvarova, 1988). Cette dégradation des ARNm maternels se poursuit dans les zygotes et les embryons au stade 2-cellules. Après la fécondation, 30 à 40 % des ARN totaux restants sont dégradés (Bachvarova, 1985). La reprise méiotique, la fécondation et l'EGA déclenchent chacune des vagues de dégradation des ARNm.

Cette purge progressive des ARNm maternels est d'ailleurs une condition nécessaire pour permettre au génome embryonnaire de prendre le contrôle de l'expression des gènes lors de l'EGA. La perturbation des vagues de dégradation de l'ARNm entrave le développement embryonnaire (Luong & Conti, 2019).

De plus, de nombreuses protéines maternelles sont dégradées juste avant l'activation du génome embryonnaire et leur dégradation est nécessaire à la réalisation correcte du processus d'EGA et à la formation d'embryons capables de se développer (Higuchi et al., 2018). Ces protéines sont majoritairement dégradées par autophagie et par le système ubiquitine-protéasome (Toralova, Kinterova, Chmelikova, & Kanka, 2020). Ainsi, la diminution des protéines PATL2 au cours du développement ovocytaire et embryonnaire n'est pas tant associée à la stabilité de la protéine, elle serait plutôt liée à une dégradation active de la protéine, puisque les protéines PATL2 écartées dans le globule polaire ne subissent pas cette dégradation. En effet, nous avons montré, par immunofluorescence, une rémanence de signal PATL2 dans certains embryons. L'absence d'ARNm de *Patl2* à partir du stade 2-cellules indique que ce signal résiduel n'est pas lié au maintien de la production de la protéine, mais plutôt à la persistance d'une protéine non dégradée. La forme et la taille du signal sont compatibles avec l'hypothèse que ce dernier corresponde à un reste du second globule polaire. En effet, le premier globule polaire est rapidement dégradé (dans les heures suivant son extrusion chez la souris (Miao et al., 2004)) mais le second globule polaire peut persister plusieurs jours. Il est d'ailleurs toujours présent dans 86 % des embryons murins au stade 16-cellules (Fabian, Cikos, Rehak, & Koppel, 2014). L'absence de colocalisation du signal PATL2 avec le Hoechst n'est pas incompatible avec l'hypothèse présentée puisque l'ADN du globule polaire se dégrade rapidement (Fabian et al., 2014).

La diminution des protéines PATL2 au cours de la maturation ovocytaire serait donc liée à la fois à une diminution de la traduction et à l'augmentation de la dégradation des protéines déjà présentes.

## 2. Effet de l'absence de PATL2 sur la maturation ovocytaire dans un modèle murin non stimulé

L'étude des conséquences de l'absence de PATL2 sur la qualité ovocytaire a été réalisée en absence de stimulation ovarienne en utilisant la lignée de souris génétiquement modifiées *Patl2*<sup>-/-</sup>.

Dans cette nouvelle étude, la proportion d'ovules immatures ovulés naturellement par les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> est similaire entre les deux génotypes, et aucun ovule bloqué au stade GV n'a été retrouvé chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>. Ces résultats contrastent avec les résultats précédemment retrouvés chez les patientes porteuses de la mutation du gène *PATL2* et chez les souris *Patl2*<sup>-/-</sup> hormonalement stimulées. En effet, chez la femme, la mutation du gène *PATL2* est responsable d'un blocage méiotique, principalement au stade GV. Aussi, chez les souris hormonalement stimulées, le pourcentage d'ovules immatures est fortement augmenté en l'absence de PATL2. Chez les souris, l'absence de la protéine induit, entre autres, une dérégulation du transcriptome ovocytaire, et cette dérégulation transcriptomique est probablement

responsable des défauts de maturation étudiés. En effet, l'expression de plusieurs gènes clés de la maturation ovocytes est modifiée. Parmi les gènes dérégulés, plusieurs codent pour des phosphatases (dont *Ppp1r14b*, *Ppp1r15a* et *Dusp1*) et leur dérégulation est susceptible de modifier l'état de phosphorylation du MPF. De plus, *Gatsl3* impliqué dans la voie de signalisation mTOR, ou encore *Fgf9* et *Cdc25a*, qui participent à la transition MI-MII, sont également dérégulés.

En absence de stimulation ovarienne, le taux de maturation ovocytaire est similaire chez les souris *Patl2<sup>+/+</sup>* et *Patl2<sup>-/-</sup>*. Il se pourrait donc que les dérégulations transcriptomiques précédemment retrouvées chez les femelles *Patl2<sup>-/-</sup>* soient exacerbées par la stimulation ovarienne, procédé connu pour modifier l'expression des gènes (Linke et al., 2013; Ozturk et al., 2016). Cependant, les données de maturation des ovules *Patl2<sup>+/+</sup>* et *Patl2<sup>-/-</sup>* ovulés naturellement doivent être analysées avec prudence car le pourcentage d'ovules immatures prélevés chez les femelles *Patl2<sup>+/+</sup>* et *Patl2<sup>-/-</sup>* varie fortement d'un individu à l'autre, allant de 0 à 100 %, et cela, indépendamment du génotype. Cette forte variation entre les individus se traduit par une déviation standard élevée (Figure 62.B). De plus, la proportion d'ovules immatures semble anormalement élevée (~70 %) chez les femelles *Patl2<sup>+/+</sup>*. Il est important de noter que l'étude de la qualité ovocytaire en ovulation naturelle présente certaines limites. En effet, en ovulation stimulée, l'ovulation est déclenchée par l'injection de HCG et les gamètes sont prélevés 12 à 14 h après cette injection. Cela permet d'obtenir une certaine homogénéité au sein des groupes dans lesquels la durée entre l'ovulation et le prélèvement des gamètes est stable. Dans l'expérience en ovulation naturelle, la femelle est considérée en œstrus lorsqu'un accouplement a eu lieu au cours de la nuit. Cette interprétation est basée sur la capacité des mâles à détecter les femelles en œstrus, notamment grâce à leur système olfactif particulièrement développé (Achiraman, Ponmanickam, Ganesh, & Archunan, 2010). Cependant, cette technique ne permet pas de contrôler l'heure de l'ovulation. Il est donc possible que les ovules dépourvus de globule polaire aient été prélevés de façon trop précoce ou trop tardive, hypothèse soutenue par la présence de globules polaires en cours d'extrusion (prélèvement précoce) ou dégradés (prélèvement tardif). En effet, une étude publiée en 2004 a montré que, chez la souris, 19,5 % des premiers globules polaires commencent à dégénérer au moment de l'ovulation et que 100 % des premiers globules polaires sont partiellement, voir entièrement dégradés 20 h après l'injection de HCG. Aussi, la dégradation du premier globule polaire est plus lente en maturation *in vitro* (Miao et al., 2004). L'hypothèse posée pourrait expliquer le taux d'ovules MI anormalement élevé chez les femelles *Patl2<sup>+/+</sup>*, et l'hétérogénéité du taux de maturation ovocytaire entre différents individus d'un même génotype pourrait être liée à une différence dans l'heure de l'ovulation. Cette hypothèse est d'ailleurs fortement soutenue par le fait que, lorsque les embryons sont prélevés au stade zygote, 90 % atteignent le stade 2-cellules chez les femelles *Patl2<sup>+/+</sup>* et *Patl2<sup>-/-</sup>*.

Les anomalies du fuseau méiotique et de l'alignement des chromosomes observées chez les femelles *Patl2<sup>-/-</sup>* stimulées sont retrouvées en ovulation naturelle, mais les proportions sont réduites. Aussi, les mesures du fuseau méiotique ne révèlent pas de différence en termes de longueur et de diamètre, seul l'étalement des chromosomes est augmenté dans les ovules *Patl2<sup>-/-</sup>*, et cette augmentation est probablement liée aux anomalies d'alignement des chromosomes. L'assemblage du fuseau méiotique est un processus impliquant l'action conjointe de nombreuses protéines, il est donc probable que la modification du transcriptome des ovocytes

GV et MII des souris *Patl2*<sup>-/-</sup> soit responsable des anomalies observées. Parmi les transcrits dérégulés en l'absence de PATL2, *Pygo1*, *Pak4* et *Cdc69* sont connus pour être impliqués dans la formation du fuseau. D'ailleurs, l'inhibition de PAK4 (P21 Protein (Cdc42/Rac)-Activated Kinase 4) chez la souris perturbe la dynamique des microtubules et compromet leur attachement sur les kinétochores. Cela qui favorise alors la formation de fuseaux anormaux sur lesquels les chromosomes sont mal alignés (Y. T. He et al., 2019).

### 3. Augmentation du nombre d'ovules chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>

D'après les résultats précédemment observés chez la femme et chez les souris hormonalement stimulées, l'absence de PATL2 ne semblait pas impacter le nombre d'ovules ovulés par cycle. Pourtant, en absence de stimulation ovarienne, le nombre de gamètes ovulés au cours d'un même cycle est augmenté chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>. Il serait intéressant d'étudier le nombre de follicules aux différents stades en fonction de l'âge des femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> et d'évaluer l'évolution de la fertilité de ces femelles en fonction de leur âge afin de savoir si l'absence de PATL2 est également associée à une diminution prématurée de la réserve ovarienne.

L'augmentation de l'ovulation chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> pourrait être liée à une dérégulation hormonale, et notamment une augmentation du taux de FSH qui favorise la croissance folliculaire et la sélection de plusieurs follicules dominants. D'ailleurs, par rapport aux espèces mono-ovulantes, le taux de FSH est augmenté chez les espèces pluri-ovulantes telles que la souris (Chaffin & Vandervoort, 2013). Cette hypothèse pourrait être vérifiée par la réalisation de dosages hormonaux dans le sang des souris *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> mais reste peu probable puisque PATL2 est absente dans l'hypothalamus et l'hypophyse. De plus, les dosages hormonaux réalisés chez les patientes porteuses de la mutation sont normaux. Ainsi, une autre explication de ce phénomène pourrait se trouver dans la dérégulation des transcrits observée dans les ovules *Patl2*<sup>-/-</sup>. Un des acteurs potentiels de ce phénomène pourrait être *Pgrmc1* (Progesterone Receptor Membrane Component 1) qui code pour un récepteur à la progestérone et dont l'expression est diminuée d'un facteur 2,27 et 2,86 dans les ovocytes GV et MII *Patl2*<sup>-/-</sup> respectivement (M. Christou-Kent et al., 2018). Dans les stades précoces de l'ovogenèse, qui se déroulent au cours de la vie fœtale, l'AMPc permet la progression méiotique entre les stades zygotènes et diplotènes de la prophase I (Y. Wang et al., 2015). Au cours de cette période, l'interaction entre la progestérone P4 et son récepteur PGRMC1 diminue le niveau d'AMPc et bloque la progression méiotique avant le stade dictyotène de la prophase I, diminue la prolifération des cellules de la granulosa et bloque la formation des follicules primordiaux. D'ailleurs, l'inhibition de *Pgrmc1* dans les ovaires de souris annule l'effet de la progestérone P4 et stimule la formation des follicules primordiaux (Guo et al., 2016). Chez la femme, la perte de fonction de PGRMC1 est responsable d'insuffisance ovarienne précoce (Mansouri et al., 2008). Ensemble, ces informations indiquent que la sous-expression de *Pgrmc1* retrouvée dans les ovocytes GV et MII des souris *Patl2*<sup>-/-</sup> pourrait accélérer le développement des follicules primordiaux et stimuler les phases précoces de la première division méiotique. Cette dérégulation pourrait donc favoriser l'augmentation du nombre d'ovules prélevés chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>. Une troisième hypothèse serait une altération des points de contrôles méiotiques chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>, chez qui les ovules anormaux ne seraient pas écartés.

#### 4. Effet de l'absence de PATL2 sur le développement embryonnaire

Afin d'étudier l'impact de l'absence de PATL2 sur la qualité embryonnaire, les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> non stimulées sont accouplées avec des mâles fertiles, puis les embryons sont collectés au stade zygote et cultivés jusqu'au stade blastocyste. Le taux de zygotes prélevés n'est pas différent chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> et est proche de 90 % (87,3 % et 93,7 % chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> respectivement). En suggérant que ces zygotes ont été formés à partir d'ovules fécondés au stade MII, ces résultats indiquent que le taux de maturation des ovocytes *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> est similaire, confirmant l'observation réalisée précédemment. De plus, ces résultats indiquent que l'élévation du pourcentage d'ovules au stade MI, observée dans l'étude de qualité ovocytaire, est liée à l'impossibilité de contrôler l'heure de l'ovulation, et confirme l'hypothèse posée.

En étudiant le développement des embryons prélevés, j'ai observé que près d'un quart (22,4 %) des zygotes issus des femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> atteignent le stade 2-cellules 24 à 48 h après leur prélèvement, sans présenter d'anomalie morphologique majeure. Ce retard de développement pourrait être lié à un retard de maturation ovocytaire, particulièrement lors que la reprise de la seconde division méiotique. Dans cette expérience, l'heure de la fécondation est inconnue et le retard ne peut être quantifié. La réalisation de fécondation *in vitro* et d'un suivi du développement embryonnaire en microscopie en temps réel permettrait de mieux caractériser ce retard de développement. En plus du retard au stade 2-cellules, le développement jusqu'au stade blastocyste est fortement altéré chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> et la plupart des blastocystes formés ont une morphologie atypique. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce défaut, et notamment l'augmentation du taux d'aneuploïdie et la dérégulation de transcrits importants pour le développement embryonnaire.

##### 4.a. Augmentation du taux d'aneuploïdie

Les expériences d'immunofluorescence réalisées sur les ovules *Patl2*<sup>-/-</sup> ont rapporté des anomalies chromosomiques et certains déséquilibres pourraient avoir lieu entre l'ovule et le globule polaire. Ces anomalies pourraient induire la formation d'embryons aneuploïdes incapables de poursuivre leur développement, ce qui expliquerait (au moins en partie), l'arrêt prématuré des embryons. Des expériences de FISH pourraient être réalisées pour tester cette hypothèse. Cependant, chez l'Humain, l'aneuploïdie ne semble pas être associée à des retards de développement au stade 2-cellules. D'après une méta-analyse réalisées à partir de 58 articles, les retards observés chez les embryons aneuploïdes apparaissent à partir du stade 8-cellules (Bamford et al., 2022). De même, la corrélation entre les défauts morphologiques et l'aneuploïdie reste difficile à établir, même si certains travaux montrent que les blastocystes aneuploïdes ont moins souvent une morphologie optimale (47 % des blastocystes euploïdes et 32 % des blastocystes aneuploïdes) (Minasi et al., 2016).

##### 4.b. La dérégulation des transcrits synthétisés pendant la maturation ovocytaire impacte le développement embryonnaire

L'altération du développement embryonnaire pourrait également être liée aux dérégulations transcriptionnelles observées dans les ovocytes *Patl2*<sup>-/-</sup>. En effet, de manière surprenante, plusieurs gènes ayant un rôle plus tardif dans le développement embryonnaire sont

significativement sous-exprimés dans les ovocytes *Patl2*<sup>-/-</sup>, incluant le gène soumis à empreinte maternelle *Phlda2*, mais aussi les gènes *Efna*, *Cstb*, *Prl8a2*, *Crabp2* et *Tlr8*. Aussi, les blastocystes obtenus à partir d'ovules dépourvus de PATL2 présentent une dérégulation de l'expression de plusieurs gènes importants pour le développement embryonnaire (*Scd1*, *Epas1*, *Gpx1*, *Birc5* et *Pou5f1*) et cette dérégulation est associée aux défauts morphologiques des blastocystes *Patl2*<sup>-/-</sup>. SCD1 est une protéine impliquée dans le métabolisme lipidique et qui régule la formation des gouttelettes lipidiques, source d'énergie essentielle au développement des embryons. Sa délétion dans les zygotes de souris altère la formation des blastocystes et induit des dommages au niveau de la masse cellulaire interne (Niu et al., 2023). GPX1 est une enzyme qui, en catalysant la réduction du peroxyde d'hydrogène, protège les cellules du stress oxydant. L'ajout de cryoprotectant ou d'antioxydant dans le milieu de vitrification des embryons induit une augmentation de l'expression de *Gpx1* dans ces embryons et améliore leur survie à la décongélation (Castillo-Martin, Bonet, Morato, & Yeste, 2014; Martinez-Rodero et al., 2022). *Epas1* code pour la protéine HIF2A, un facteur de transcription nécessaire à l'implantation des embryons (L. Matsumoto et al., 2018). *Birc5* code pour la survivine, un inhibiteur de l'apoptose nécessaire au développement embryonnaire préimplantatoire murin et bovin (Kawamura et al., 2003; S. Y. Park et al., 2007). Enfin, *Pou5f1* code pour OCT-4, un facteur de pluripotence fortement exprimé dans les blastocystes et qui régule la différenciation de la masse cellulaire interne en épiblaste et en endoderme primitif (Le Bin et al., 2014). Son absence dans les zygotes de bovin induit un arrêt du développement embryonnaire préimplantatoire au stade morula (Daigneault, Rajput, Smith, & Ross, 2018).

Les gènes étudiés ont été sélectionnés à partir d'articles ayant montré que l'expression de ces gènes tend à augmenter dans les embryons morphologiquement de meilleure qualité ou dans des embryons cultivés dans des conditions favorables (Cebrian-Serrano et al., 2013; Cordova et al., 2014; Jeon et al., 2008; Moreira et al., 2006). L'augmentation de l'expression de *Birc5* et de *Gpx1* pourraient être associées à une bonne capacité de l'embryon à se défendre contre l'apoptose ou le stress oxydant, signe de bonne qualité embryonnaire. Notons tout de même que des contre-exemples existent dans la littérature puisque l'augmentation de *Birc5* a été observée dans des embryons bovins après vitrification, processus également associé à une augmentation de l'apoptose (S. Y. Park et al., 2006). De la même manière, chez des souris présentant une pathologie de type endométrieuse, connue pour être une source de stress oxydant, l'expression de *Gpx1* est augmentée dans l'utérus (Guan et al., 2022). Ces exemples illustrent l'importance d'analyser des résultats en fonction du contexte. Ici, l'augmentation de l'expression de *Scd1*, *Epas1*, *Gpx1*, *Birc5* et *Pou5f1* dans les blastocystes issus des femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> n'est pas, à elle seule, un signe de bonne ou de mauvaise qualité embryonnaire. Le message clé est que l'absence de PATL2 dans les ovules entraîne une perturbation transcriptomique dans les blastocystes, soit à un stade de développement où PATL2 n'est plus présente. Il semblerait donc que l'absence de PATL2 induise une dérégulation d'un ou de plusieurs acteurs intermédiaires, avec probablement une dérégulation de l'activation du génome embryonnaire et donc d'une dérégulation transcriptomique dans les embryons. De plus, il n'est pas exclu que *Gapdh*, utilisé comme gène de référence, soit également perturbé, ce qui influencerait les résultats. Il serait donc intéressant de faire une étude transcriptomique plus approfondie.

Notons également que la dérégulation de l'expression des gènes étudiés n'affecte pas tous les embryons de manière homogène puisque certains blastocystes issus des femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> sont

morphologiquement normaux et ne présentent pas de dérégulation de l'expression des gènes étudiés. Il semblerait donc que des mécanismes de compensation ou de réparation efficaces soient mis en place dans certains ovules ou embryons, et permettent la formation de blastocystes typiques. Il est d'ailleurs légitime de penser que ces blastocystes morphologiquement typiques pourraient poursuivre leur développement et donner des individus viables, puisque la lignée de souris *Patl2*<sup>-/-</sup> est partiellement fertile.

#### 4.c. Expériences complémentaires

Des expériences complémentaires seraient intéressantes à réaliser à partir des embryons obtenus à partir des femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> :

- Evaluation du niveau d'apoptose dans les embryons puisque l'augmentation de l'expression de *Birc5* pourrait être associée à une augmentation de l'apoptose.
- Réaliser le ratio entre le nombre de cellules de la masse cellulaire interne et le nombre de cellules du trophoblaste dans les blastocystes. Sachant que, chez la souris, *Pou5f1* est exprimé uniquement dans les cellules de la masse interne (Kirchhof et al., 2000), une modification du nombre de ces cellules pourrait induire modification de l'expression de *Pou5f1*.
- Réaliser des expériences d'immunofluorescence sur les blastocystes, et notamment sur les blastocystes morphologiquement atypiques. Les cellules de la masse cellulaire interne et les cellules du trophoblaste pourraient être observées par des marquages de OCT4 et de CDX2.
- Analyser les embryons ayant arrêté leur développement, par exemple, par des études d'aneuploïdie ou d'observation de micronoyaux.

## VI. Conclusions des travaux de la 1<sup>ère</sup> partie

Plusieurs informations importantes ressortent de cette première partie de résultats.

D'une part, j'ai confirmé que l'absence de PATL2 est responsable de troubles de la fertilité dont la sévérité diffère chez la femme et chez la souris. En effet, les souris *Patl2*<sup>-/-</sup> peuvent produire des ovules au stade MII pouvant être fécondés et former un embryon en développement. D'ailleurs, le taux d'ovules *Patl2*<sup>-/-</sup> dont la qualité est sévèrement impactée est relativement faible et la plupart de ces ovules peuvent être fécondés. De plus, la proportion de zygotes formée est égale chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>. Cependant, en l'absence de PATL2, le développement embryonnaire est fortement altéré, les embryons subissent un retard de développement au stade 2-cellules, un arrêt prématuré et la majorité des blastocystes obtenue présente des anomalies morphologiques et des dérégulations de l'expression de gènes importants pour le développement embryonnaire. Il semblerait donc que les anomalies ovocytaires observées n'expliquent qu'une partie de la baisse de fertilité des femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>. Cette observation, associée au fait que PATL2 soit toujours présente dans les zygotes de souris alors que son orthologue xPAT1A disparaît lors de la GVBD, suggère que, chez les Mammifères, PATL2 reste important plus longtemps et pourrait jouer un rôle dans la fécondation et/ou le développement embryonnaire précoce. Ce type d'évolution a d'ailleurs été observé dans la famille des « Y-Box Proteins » à laquelle la protéine ovocytaire MSY2 appartient (J. Yu, Hecht, & Schultz, 2001).

D'autre part, dans cette nouvelle étude de qualité ovocytaire réalisée en ovulation naturelle, les défauts observés chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> semblent moins sévères que les défauts précédemment observés sur des ovules collectés après stimulation ovarienne.

Ce travail a donc soulevé deux nouvelles questions :

- Quel est l'impact de la stimulation ovarienne dans un modèle de mauvaise qualité ovocytaire ?
- Chez les Mammifères, la fonction de PATL2 est-elle maintenue après la GVBD ?

---

## 2<sup>ème</sup> partie : impact de la stimulation ovarienne dans le modèle de mauvaise qualité ovocytaire *Patl2*<sup>-/-</sup>

---

### I. Contexte

La stimulation ovarienne est un procédé couramment utilisé pour contrôler le moment de l'ovulation et augmenter le nombre d'ovules. Pour cela, des gonadotrophines sont administrées pour stimuler la croissance simultanée de plusieurs follicules et maintenir leur développement jusqu'à leur maturité. Chez la souris, l'effet néfaste de la stimulation ovarienne sur la qualité des ovules et des embryons est bien documenté. En effet, la stimulation ovarienne augmente, entre autres, les anomalies du fuseau méiotique (Kalthur et al., 2016; Van Blerkom & Davis, 2001), les retards et les arrêts du développement embryonnaire préimplantatoire (Ertzeid & Storeng, 2001; Kalthur et al., 2016), et perturbe le profil d'expression des ovules et des embryons (Linke et al., 2013; Ozturk et al., 2016) (voir le chapitre 6.II.2 : « *La stimulation ovarienne* »). Ce type d'anomalies ayant été retrouvé chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>, nous cherchons ici, à étudier l'impact de la stimulation ovarienne sur ce modèle de mauvaise qualité ovocytaire.

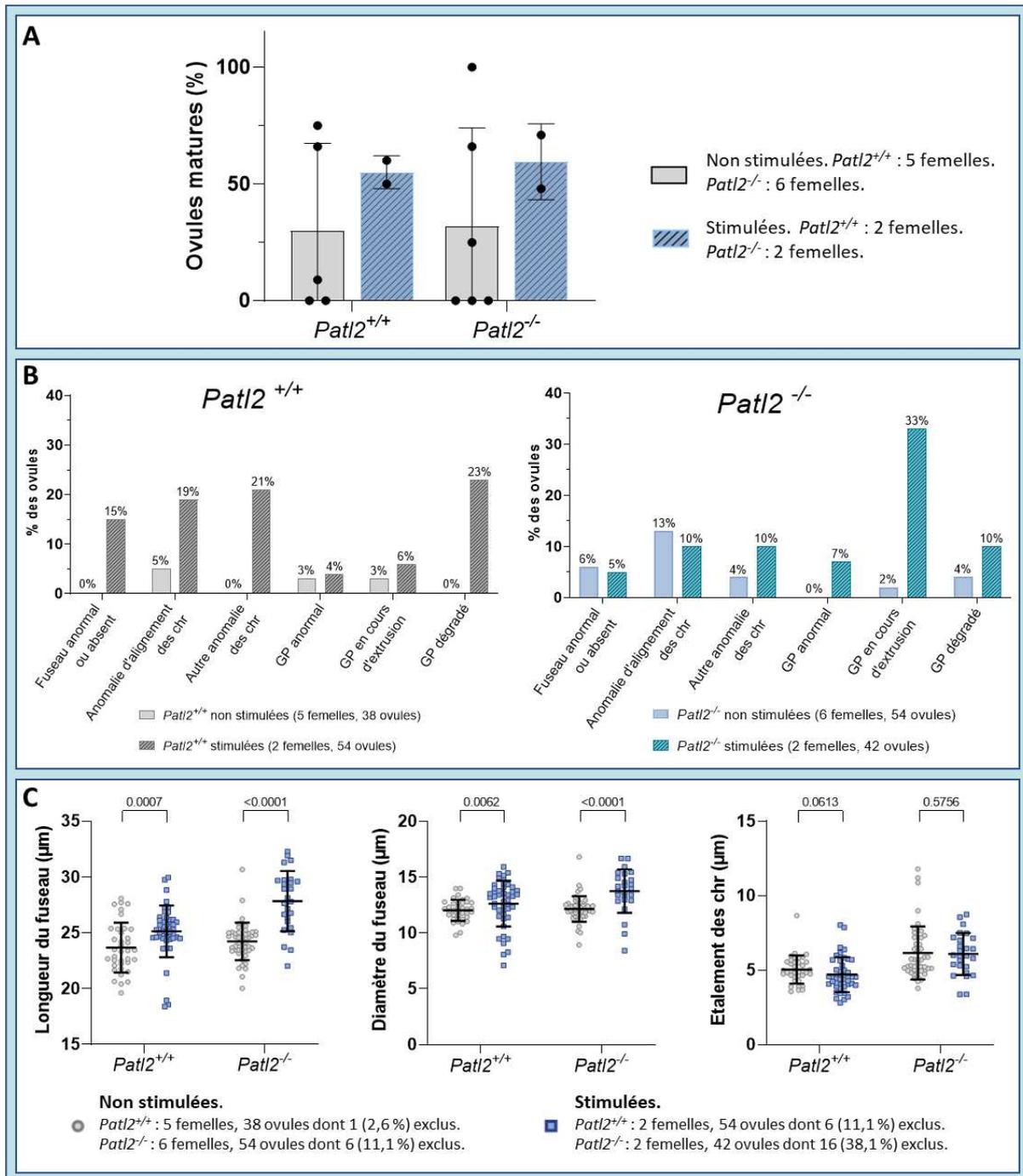
### II. La stimulation ovarienne aggrave certains défauts ovocytaires, particulièrement chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup>

L'étude de qualité ovocytaire, précédemment réalisée sur les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> non stimulées, est répétée avec la même lignée de souris dont l'ovulation est hormonalement stimulée avec du PMSG et de l'HCG.

Comme indiqué dans la partie n°1, le taux d'ovules collectés au stade MII en absence de stimulation ovarienne est équivalent chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> (55,0 % et 59,5 % respectivement). En réponse à l'administration d'hormones, le pourcentage d'ovules collectés au stade MII est toujours équivalent chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> mais ce dernier est augmenté par rapport aux données en absence de stimulation ovarienne (**Figure 67.A**).

En ce qui concerne les anomalies morphologiques, le pourcentage d'ovules avec un fuseau anormal ou absent, des anomalies chromosomiques ou un globule polaire dégradé, est fortement augmenté lorsque l'ovulation des femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> est hormonalement stimulée. Chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>, la stimulation ovarienne n'impacte pas le pourcentage de fuseaux anormaux ou absents, ni l'alignement des chromosomes sur le fuseau. En revanche, les anomalies du globule polaire sont fortement augmentées, et notamment les globules polaires en cours d'extrusion (**Figure 67.B**).

Les mesures du fuseau méiotique ont également été réalisées sur les ovules collectés après stimulation ovarienne. La proportion d'ovules *Pat12<sup>+/+</sup>* et *Pat12<sup>-/-</sup>* ayant un fuseau trop anormal pour être mesuré est fortement augmentée puisque 11,1% des ovules *Pat12<sup>+/+</sup>* et 38,1 % des ovules *Pat12<sup>-/-</sup>* ont été exclus de l'analyse, alors qu'ils n'étaient que 2,6 et 11,1 % respectivement, en absence de stimulation ovarienne. De plus, les résultats révèlent une augmentation de la longueur et du diamètre du fuseau, aussi bien chez les femelles *Pat12<sup>+/+</sup>* que chez les femelles *Pat12<sup>-/-</sup>*. En revanche, l'étalement des chromosomes sur le fuseau des ovules *Pat12<sup>+/+</sup>* et *Pat12<sup>-/-</sup>* n'est pas impacté par la stimulation ovarienne (**Figure 67.C**).



**Figure 67 : la stimulation ovarienne altère la morphologie des ovules *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>.**

A : analyse du taux de maturation des ovules *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> ovulés naturellement ou après une stimulation ovarienne. Représentation des données : moyenne +/- déviation standard.

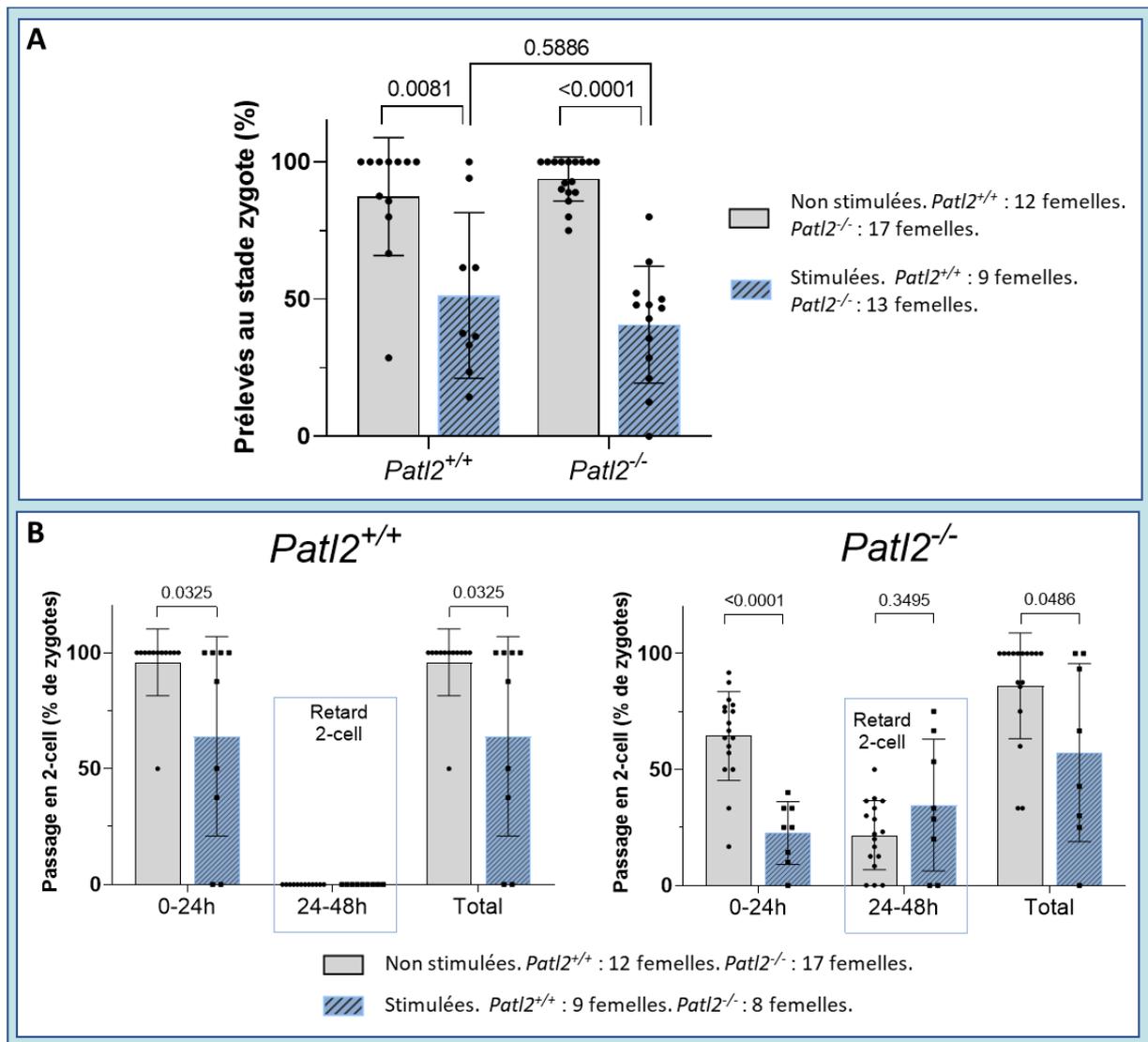
B : classification et quantification des anomalies des ovules *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> ovulés naturellement ou après une stimulation ovarienne. « Chr » = Chromosomes. « GP » = Globule polaire.

C : mesures de la taille du fuseau méiotique et de l'étalement des chromosomes sur ce dernier, sur des ovules *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> ovulés naturellement ou après une stimulation ovarienne. Certains fuseaux méiotiques très anormaux n'ont pas pu être mesurés et ont été exclus de l'analyse. *Patl2*<sup>+/+</sup> non stimulées : 5 femelles, 38 ovules dont 1 exclus. *Patl2*<sup>+/+</sup> stimulées : 2 femelles, 54 ovules dont 6 exclus. *Patl2*<sup>-/-</sup> non stimulées : 6 femelles, 54 ovules dont 6 exclus. *Patl2*<sup>-/-</sup> stimulées : 2 femelles, 42 ovules dont 16 exclus. Analyse statistique : test de Mann-Whitney, échantillons non appariés. Les p-valeurs sont indiquées sur chaque graphique.

### III. La stimulation ovarienne altère le développement embryonnaire des femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>

Chez les souris *Patl2*<sup>+/+</sup>, le pourcentage d'embryons collectés au stade zygote passe de 87,3 à 51,3 % lorsque les femelles sont stimulées. Cette diminution est davantage marquée chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> puisqu'en absence de stimulation ovarienne, 93,7 % des embryons sont collectés au stade zygote contre seulement 40,7 % après une stimulation. De plus, les embryons collectés au stade zygotes sont retrouvés dans les mêmes proportions chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> stimulées et *Patl2*<sup>-/-</sup> stimulées (**Figure 68.A**).

En absence de stimulation ovarienne, un retard de développement des embryons au stade 2-cellules avait été observé chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>. Ce retard de développement embryonnaire, toujours absent chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup>, est retrouvé dans les mêmes proportions chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> stimulées (**Figure 68.B**).



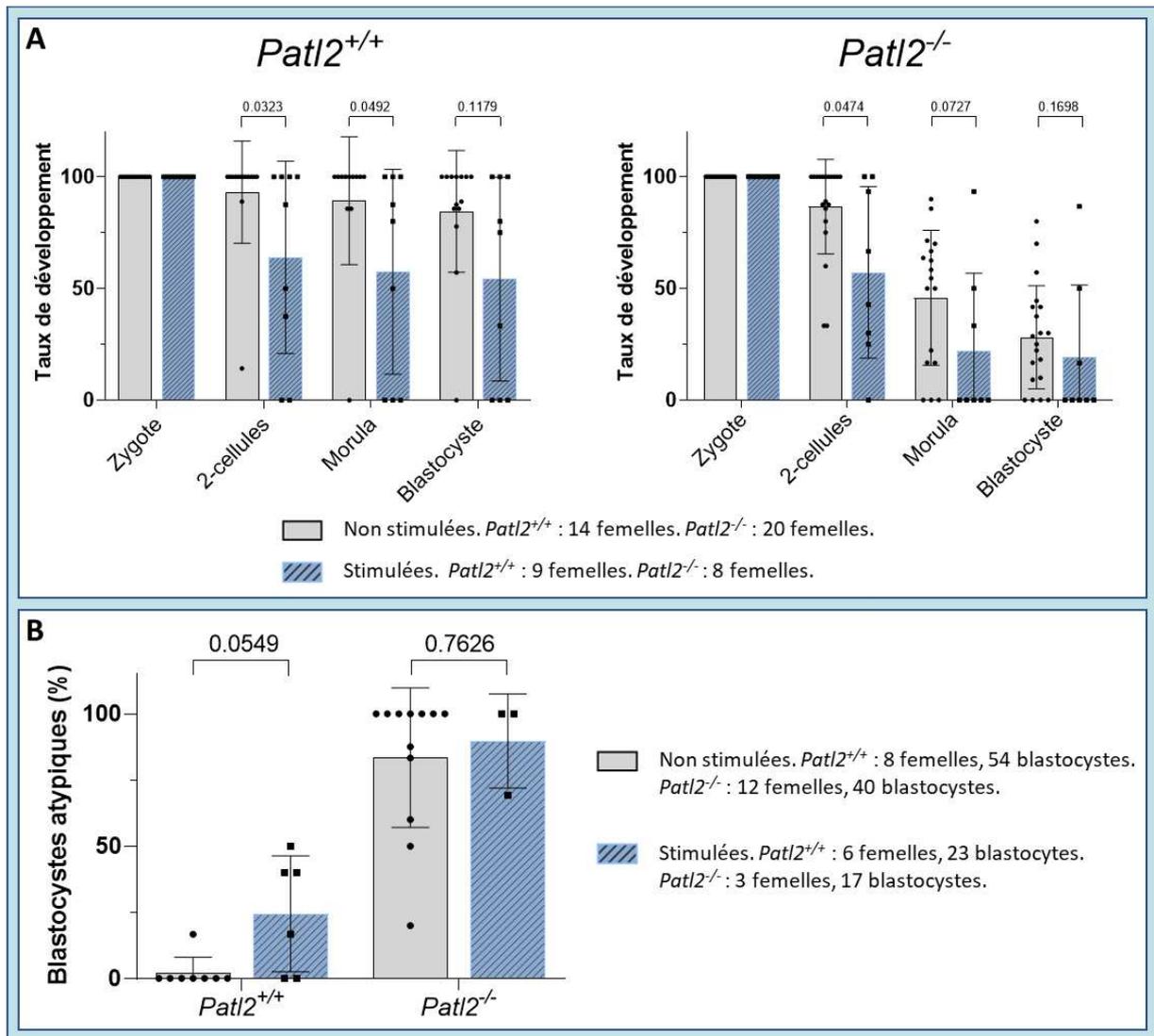
**Figure 68 : la stimulation ovarienne influence le développement des embryons issus des femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>, dès le stade 2-cellules.**

A : représentation du pourcentage de zygotes prélevés chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> avec ou sans stimulation ovarienne. Représentation des données : moyenne +/- déviation standard. Analyse statistique : test de Mann-Whitney, échantillons non appariés.

B : représentation du pourcentage de zygotes passés au stade 2-cellules dans les 24 h suivant le prélèvement (chronologie de développement normale) et entre 24 et 48 h après le prélèvement (retard de développement), chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> avec ou sans stimulation ovarienne. Représentation des données : moyenne +/- déviation standard. Analyse statistique : test de Mann-Whitney, échantillons non appariés.

Le suivi du développement des embryons entre le stade zygote et le stade blastocyste révèle que, chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>, le pourcentage de zygotes qui n'atteignent pas le stade 2-cellules est augmenté lorsque l'ovulation est stimulée hormonalement. En effet, chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup>, le pourcentage de zygotes qui atteignent le stade 2-cellules passe de 93,1 % à 63,8 % lorsque l'ovulation est hormonalement stimulée. Ce pourcentage passe de 86,5 à 57,2 chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>. Le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste, fortement altéré chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>, l'est davantage lorsque les femelles sont stimulées (seuls 19,2 %

des zygotes atteignent le stade blastocyste), mais les p-valeurs restent supérieures à 0,05. Le développement jusqu'au stade blastocyste est également perturbé par la stimulation ovarienne chez les femelles *Patl2<sup>+/+</sup>*. En effet, le pourcentage de zygotes atteignant le stade blastocyste passe de 84,5 % chez les femelles *Patl2<sup>+/+</sup>* non stimulées à 54,3 % après une stimulation. De façon intéressante, chez les femelles *Patl2<sup>+/+</sup>*, la plupart des embryons qui passent le stade 2-cellules atteignent le stade blastocyste (84,9 % chez les femelles stimulées, 93,08 % en absence de stimulation). Ce n'est pas le cas chez les femelles *Patl2<sup>-/-</sup>* mais le pourcentage d'embryons en 2-cellules qui atteignent le stade blastocyste est équivalent chez les femelles *Patl2<sup>-/-</sup>* stimulées (33,5 %) et non stimulées (32,47 %) (**Figure 69.A**). Enfin, en l'absence de PATL2, le taux de blastocystes présentant une morphologie atypique reste très élevé en présence de stimulation ovarienne (89,7 %). Ces anomalies, occasionnelles chez les femelles *Patl2<sup>+/+</sup>* non stimulées (2,1 %), deviennent relativement importantes (24,4 %) après une stimulation ovarienne (**Figure 69.B**).



**Figure 69 : la stimulation ovarienne perturbe le développement embryonnaire préimplantatoire chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>.**

A : suivi du développement embryonnaire du stade zygote jusqu'au stade blastocyste, chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> avec ou sans stimulation ovarienne. Représentation des données : moyenne +/- déviation standard. Analyse statistique : test de Mann-Whitney, échantillons non appariés.

B : analyse morphologique des blastocystes issus des femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> stimulées et non stimulées. Représentation des données : moyenne +/- déviation standard. Analyse statistique : test de Mann-Whitney, échantillons non appariés.

#### IV. Discussions

Dans la première partie de ma thèse, j'ai étudié l'impact de l'absence de PATL2 sur la qualité d'ovules et d'embryons de souris obtenus en ovulation naturelle. J'ai pu mettre en évidence que l'absence de PATL2 est responsable de défauts ovocytaires modérés, puisque la majorité des ovules sont capables d'être fécondés et de se développer jusqu'au stade 2-cellules. Cependant, l'absence de PATL2 est responsable de défauts embryonnaires majeurs, caractérisés par un retard

de développement au stade 2-cellules et une forte diminution au taux de blastocystes formés. De plus, lorsque les embryons issus des femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> atteignent le stade blastocyste, la majorité de ces blastocystes présentent d'importants défauts morphologiques, associés à une dérégulation de l'expression de gènes importants pour le développement embryonnaire. Ces observations soulignent l'importance de PATL2 après la fécondation.

Dans cette étude, les défauts ovocytaires et embryonnaires observés en l'absence de PATL2 semblent moins sévères que les défauts précédemment observés sur des ovules et des embryons collectés après une stimulation ovarienne. Afin de confirmer cette observation et d'approfondir le sujet, j'ai étudié l'impact de la stimulation ovarienne sur la qualité des ovules et des embryons issus des femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>.

## 1. Impact de la stimulation ovarienne sur la qualité ovocytaire et embryonnaire chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>

### 1.a. La stimulation ovarienne altère la qualité des ovules *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>

L'impact de la stimulation ovarienne sur la maturation ovocytaire est étudié par l'observation du premier globule polaire, sur des ovules *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> collectés 12 à 14 h après l'injection de HCG. Au cours de l'étude réalisée en ovulation naturelle, nous avons été surpris d'observer un taux de maturation similaire chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>. Ce résultat est à nouveau observé lorsque l'ovulation est stimulée hormonalement puisque 55 % et 59 % des ovules issus des femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> sont collectés au stade MII. Chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> stimulées, ce taux de maturation est cohérent avec les données publiées en 2018. En revanche, le taux d'ovules *Patl2*<sup>+/+</sup> collectés au stade MII est diminué par rapport aux données publiées en 2018 et dans lesquelles 75 % des ovules collectés étaient au stade MII (M. Christou-Kent et al., 2018). Aussi, suite à une stimulation ovarienne, les anomalies du fuseau méiotique et de la position des chromosomes sont davantage augmentées chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup>. Enfin, les mesures du fuseau méiotique indiquent que la stimulation ovarienne entraîne une augmentation de la longueur et du diamètre du fuseau des ovules *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>, mais ne modifie pas l'étalement des chromosomes sur le fuseau. Il se pourrait que l'impact de la stimulation ovarienne sur l'étalement des chromosomes soit caché par l'exclusion des ovules trop anormaux pour être mesurés. En effet, chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>, 38,1 % des ovules obtenus après une stimulation ovarienne n'ont pas pu être mesurés, soit 3,4 fois plus que chez les femelles non stimulées.

### 1.b. La stimulation ovarienne perturbe le développement embryonnaire des femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>

En absence de stimulation ovarienne, nous avons noté une importante différence du taux de maturation entre les expériences sur ovules et celles sur embryons, et expliqué que cette différence était probablement liée à l'impossibilité de contrôler l'heure de l'ovulation en absence de stimulation ovarienne. Cette hypothèse est confortée par les résultats obtenus en ovulation stimulée : chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> stimulées, le pourcentage d'ovules prélevés au stade MII et le pourcentage d'embryons prélevés au stade zygote sont équivalents et proches de 50 %.

Le pourcentage d'embryons prélevés au stade zygote est fortement diminué lorsque les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> sont stimulées, signifiant que la stimulation ovarienne altère la capacité

des ovocytes à maturer et/ou à être fécondés. Notons cependant que la variabilité inter-individus est importante, information soulignée par une déviation standard élevée.

En absence de stimulation ovarienne, un retard de développement des embryons au stade 2-cellules était observé exclusivement chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>. Cette caractéristique est également retrouvée en présence de stimulation ovarienne et reste spécifique des femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>. Ce retard de développement observé est donc lié uniquement à l'absence de PATL2. La stimulation ovarienne est associée à un arrêt du développement embryonnaire préimplantatoire dès le stade 2-cellules chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et à une aggravation des défauts précédemment observés chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>. Aussi, la production de blastocystes morphologiquement anormaux par les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> était exceptionnelle en absence de stimulation ovarienne (2 %) et devient relativement fréquent lorsque ces souris sont stimulées (25 %). La variation inter-individus est cependant, ici aussi, élevée. Chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>, la production de blastocystes avec une morphologie atypique reste très élevée. Il existe donc une accumulation de défauts ; ceux liés à l'absence de PATL2 et ceux engendrés par la stimulation ovarienne.

Ensemble, ces résultats confirment les données de la littérature qui indiquent que la stimulation ovarienne impacte négativement la qualité des ovules des souris *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>. Cette altération de la qualité ovocytaire se traduit par des anomalies de formation du fuseau méiotique et de l'alignement des chromosomes et par une diminution de la compétence développementale de ovules. En effet, la capacité des ovules à soutenir le développement d'un embryon est diminuée dès le stade 2-cellules et continue à s'altérer jusqu'au stade blastocyste. Bien que ceci n'ait pas été étudié ici, il est probable que le profil transcriptomique des blastocystes obtenus soit perturbé.

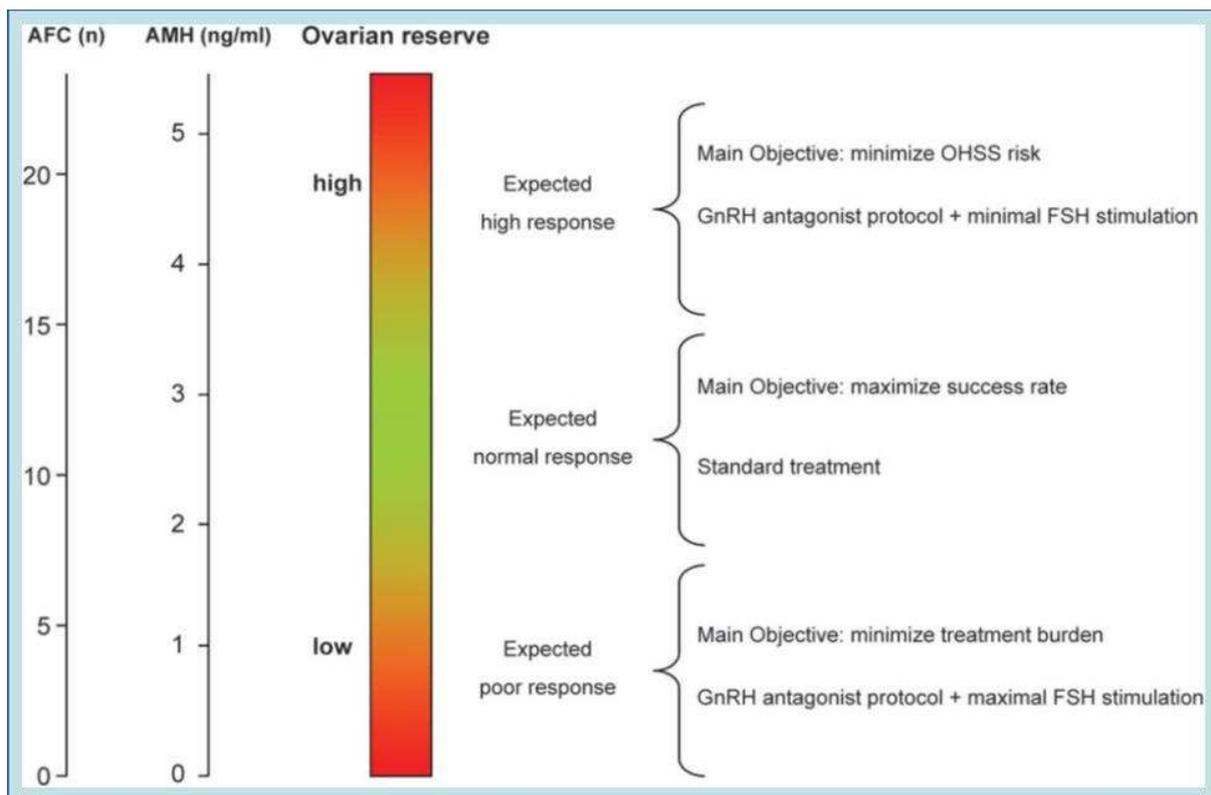
L'altération de la qualité ovocytaire et embryonnaire des femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> était attendue mais l'intensité des anomalies des femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> est surprenante. En revanche, nous ne sommes pas surpris de voir que les défauts observés chez les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> sont aggravés.

## 2. Amélioration des protocoles de stimulation

Bien que l'impact négatif de la stimulation ovarienne soit plus difficile à étudier chez les femmes, ces résultats questionnent sur l'utilisation de la stimulation chez les femmes bénéficiant d'une aide médicale à la procréation et dont la qualité ovocytaire est déjà altérée.

Extrapoler les résultats de qualité ovocytaire et embryonnaire des souris *Patl2*<sup>-/-</sup> stimulées, en disant que la stimulation ovarienne pourrait aggraver la qualité des ovules des patientes mutées, serait un dangereux raccourci, notamment à cause des différences de phénotype entre les patientes mutées et les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup>, mais aussi à cause des différences intrinsèques aux deux espèces. En effet, la souris est une espèce pluri-ovulante avec un cycle de 4 à 5 jours en moyenne, la femme est mono-ovulante avec un cycle d'environ 28 jours. Il est tout de même important de se questionner quant à l'impact de la stimulation ovarienne chez les femmes dont la qualité ovocytaire est déjà altérée, et chercher des solutions pour maximiser leurs chances de produire des ovules capables de se développer. C'est pour cela que les pratiques actuelles vont dans le sens d'une personnalisation des protocoles de stimulation ovarienne chez les femmes, notamment chez les femmes souffrantes d'un syndrome des ovaires polykystiques ou les femmes qui répondent mal à la stimulation ovarienne (Casarini et al., 2016).

Un exemple de protocole de stimulation personnalisé utilise des indicateurs de réserve ovarienne (notamment l'AMH) pour anticiper la réponse des femmes à la stimulation hormonale, et ainsi adapter le protocole de stimulation. Chez les femmes avec une forte réserve ovarienne et à risque de faire un syndrome d'hyper-stimulation ovarienne (syndrome de gravité variable, lié à une réponse excessive aux gonadotrophines et caractérisé par une augmentation de la taille des ovaires, une vasodilatation et une libération excessive de liquide dans la cavité abdominale), la dose de FSH administrée est réduite. A l'inverse, une dose de FSH plus élevée est préconisée pour les femmes avec une réserve ovarienne réduite (La Marca et al., 2010), (Figure 70).



**Figure 70 : Personnalisation du protocole de stimulation ovarienne en fonction de la réserve ovarienne chez la femme.**

Le protocole de stimulation est adapté en fonction de la réserve ovarienne de la femme, déterminée à partir du nombre de follicules antraux (AFC : antral follicle count) et du taux d'hormone anti-müllérienne (AMH). Chez les femmes avec une réserve ovarienne élevée, à risque de faire un syndrome d'hyper-stimulation, la dose de FSH utilisée est réduite. Les femmes avec une réserve ovarienne faible risquent de ne pas répondre à la stimulation, et reçoivent une dose de FSH plus élevée. Figure d'après (La Marca et al., 2010).

Chez la souris, le protocole standard de stimulation ovarienne est rarement adapté, il repose sur l'administration de PMSG et de HCG et ne prend pas en compte le stade du cycle œstral de la femelle au moment de la stimulation. En 2016, Ayumi Hasegawa et ses collègues ont publié un protocole de stimulation ovarienne chez la souris sur 6 jours. Dans ce protocole, deux injections de progestérone sont réalisées aux jours 1 et 2 et permettent de synchroniser le cycle œstral des souris. Les souris reçoivent ensuite deux injections d'anti-inhibine (jours 3 et 4) suivie d'une injection de HCG au jour 6. Ce protocole permet d'augmenter le nombre d'ovules ovulés par

femelle tout en conservant un très bon taux de fécondation (Hasegawa et al., 2016). Ce protocole pourrait permettre de réduire le nombre d'animaux utilisés pour les expériences afin de mieux répondre à la règle des « 3R », fondement d'une démarche éthique qui vise à Réduire, Remplacer et Raffiner les expériences utilisant des animaux. Cette adaptation du protocole de stimulation ovarienne chez la souris serait intéressante à tester sur la lignée *Patl2*<sup>-/-</sup> afin de comparer la qualité des ovules *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> obtenus avec le protocole de stimulation standard et avec ce nouveau protocole.

### 3. Evolution phénotypique des lignées murines utilisées en recherche biomédicale

#### 3.a. Stimulation ovarienne et nombre d'ovules ovulés

La comparaison du nombre d'ovules ovulés en ovulation naturelle et en ovulation stimulée n'est pas pertinente puisque la stimulation ovarienne est réalisée dans le but d'augmenter le nombre d'ovules ovulés au cours d'un même cycle. Cependant, certains résultats obtenus à partir de la lignée *Patl2* sont importants à noter. Dans l'étude publiée en 2018, la stimulation ovarienne permettait d'obtenir en moyenne 20 ovules par femelle *Patl2*<sup>+/+</sup> ou *Patl2*<sup>-/-</sup>. Dans l'étude réalisée en absence de stimulation ovarienne, chaque femelle ovulait en moyenne 8,2 (*Patl2*<sup>+/+</sup>) ou 10,2 (*Patl2*<sup>-/-</sup>) ovules par cycle. Enfin, dans l'étude présentée ci-dessus, le nombre moyen d'ovules ovulés par les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> stimulées était de 7, soit inférieur au nombre d'ovules ovulés naturellement. La variation du nombre d'ovules ovulés par les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup> fait partie d'un ensemble de variations observées dans cette lignée de souris transgéniques.

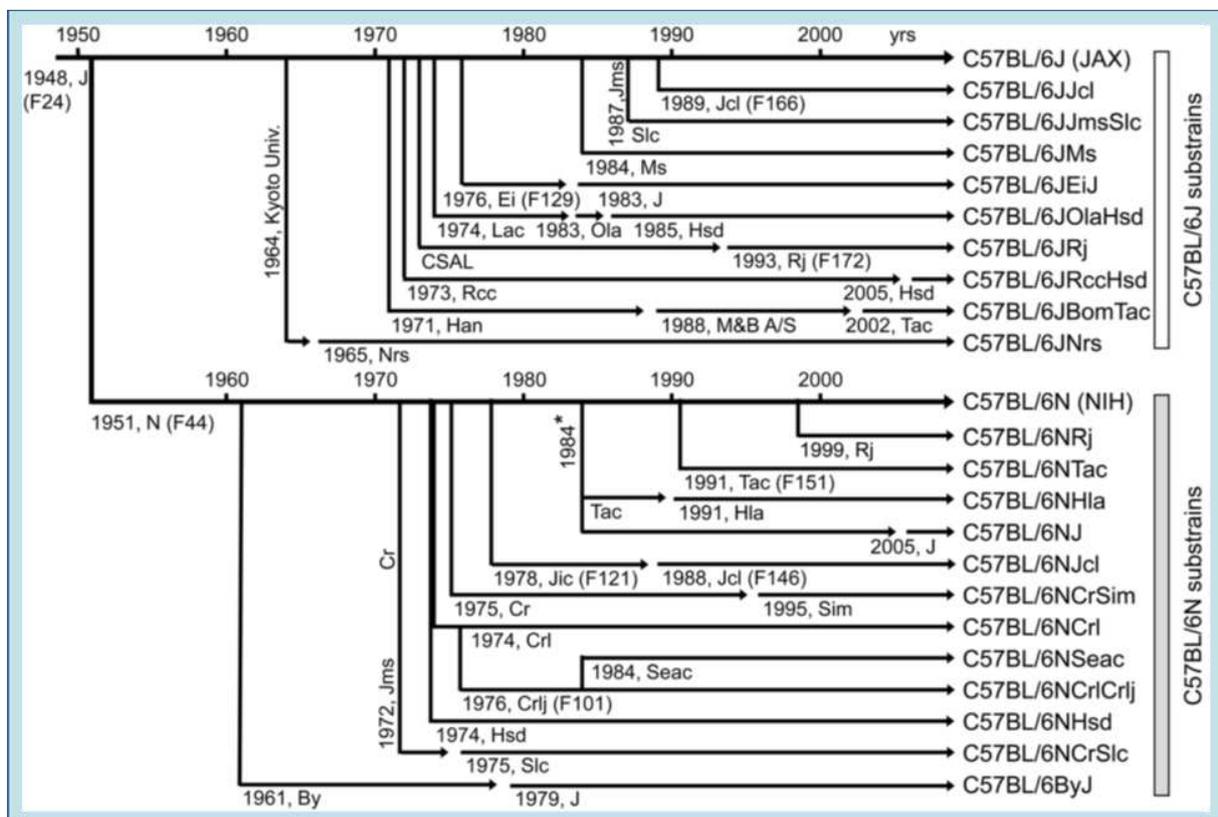
#### 3.b. La dérive de la lignée de souris transgéniques *Patl2*

Au cours du temps, la fertilité des femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> ou *Patl2*<sup>-/-</sup> a diminué, perturbant la reproduction naturelle des souris ainsi que la réalisation des expériences. Lors de ces expériences, j'ai remarqué une augmentation de la proportion des ovules dépourvus de globule polaire, une diminution du nombre d'ovules ovulés par femelle, et un arrêt du développement embryonnaire préimplantatoire. D'ailleurs, l'obtention de blastocystes est devenue rare, y compris avec les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup>, et l'étude de l'impact de la stimulation ovarienne sur le modèle de souris *Patl2*<sup>-/-</sup> n'a pas pu être terminée. Aussi, il est impossible de dire si les défauts ovocytaires et embryonnaires observés chez les femelles hormonalement stimulées sont liés à la dérive phénotypique ou à la stimulation ovarienne. D'ailleurs, certaines anomalies observées dans cette étude, et notamment chez les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> stimulées, sont probablement liées à la dérive phénotypique. De plus, les fortes variabilités inter-individus observées ont probablement été accentuées par cette dérive. De façon surprenante, les femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> semblent avoir été touchées avant les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> mais il se pourrait que les anomalies engendrées par la dérive de la lignée aient été confondues avec les anomalies liées à l'absence de PATL2.

#### 3.c. La dérive génétique chez les souris de laboratoire

L'impossibilité de reproduire des résultats expérimentaux publiés est une difficulté majeure dans le domaine de la recherche biomédicale. Multifactoriel, ce manque de reproductibilité peut être lié à des différences d'environnement du laboratoire, des modifications, mêmes subtiles, des protocoles expérimentaux, des variations dépendantes des expérimentateurs, ou encore des changements de lignées cellulaires ou animales.

Les souris utilisées en laboratoire sont des êtres vivants qui évoluent au cours de leur vie, mais aussi d'une génération à l'autre, notamment via l'apparition de mutations aléatoires. De ce fait, deux populations consanguines isolées l'une de l'autre, vont petit à petit accumuler des mutations entraînant une variabilité dans les deux populations. Ce phénomène, appelé dérive génétique, est responsable, en partie, du manque de reproductibilité des résultats en recherche biomédicale. D'après l'entreprise Charles River, spécialisée dans l'élevage et la vente d'animaux de laboratoire, toute lignée séparée de la lignée parentale par 20 générations doit être considérée comme une sous-lignée, suspectée ou reconnue comme différente de la lignée parentale. Il existe d'ailleurs de nombreuses sous-lignées C57BL/6. Elles proviennent d'une lignée ancestrale, la lignée C57BL établie en 1921 puis séparée en 1937, formant les sous-lignées C57BL/10 et C57BL/6. En 1948, la sous-lignée C57BL/6 a été envoyée au laboratoire Jackson, puis en 1951, elle a été envoyée à l'institut national de la santé. De cette façon, deux nouvelles sous-lignées sont apparues : les sous-lignées C57BL/6J et C57BL/6N. Il existe aujourd'hui plusieurs milliers de sous-lignées C57BL/6 et leur nombre est en perpétuel augmentation, notamment du fait de leur utilisation dans la génération de lignées murines transgéniques (Mekada & Yoshiki, 2021).



**Figure 71 : L'arbre généalogique des souris de laboratoire C57BL/6.**

Représentation des principales sous-lignées de souris C57BL/6J et C57BL/6N. Figure d'après (Mekada & Yoshiki, 2021).

Bien que les variations génétiques apparaissant au fur et à mesure des générations passent souvent inaperçues, deux sous-lignées peuvent avoir des différences de phénotypes qui impactent la reproductibilité des résultats, voir conduisent à la publication de conclusions erronées. Dans une étude publiée en 2009 et réalisée à partir d'une lignée murine transgénique *Siae*<sup>-/-</sup> sur fond génétique C57BL/6 mal caractérisé, les auteurs pensaient que le gène *Siae* (Sialic acid Acetyl

Esterase) participait au développement des lymphocytes B (Cariappa et al., 2009). Or, après avoir été croisée avec une souris de fond génétique C57BL/6J, la lignée *Siae*<sup>-/-</sup> a perdu son phénotype. En réalité, le phénotype initialement observé était engendré par un variant du gène *Dock2*, présent dans une sous-lignée C57BL/6N, issue des laboratoires Harlan, et nommée C57BL/6NHsd (Mahajan et al., 2016). Cet exemple souligne à quel point le fond génétique des lignées murines est important. D'ailleurs, de nombreuses différences phénotypiques ont été rapportées entre les différentes sous-lignées C57BL/6, et notamment dans les comportements addictifs (Warden et al., 2020), les régulations métaboliques (Nemoto, Kubota, & Ohno, 2022) et le fonctionnement du système immunitaire (J. Y. Choi et al., 2017). Les différences phénotypiques des sous-lignées C57BL/6 ont fait l'objet d'une revue publiée en 2021 (Mekada & Yoshiki, 2021).

### 3.d. Que faire face à la dérive génétique des souris de laboratoire ?

La dérive génétique est un phénomène naturel impossible à arrêter. Différentes actions peuvent cependant être mises en place pour limiter ses effets. Cela inclus une grande rigueur dans la gestion de la colonie, en particulier si cette dernière est transgénique, ainsi qu'un rafraîchissement régulier des lignées (toutes les 5 à 10 générations). Ce rafraîchissement est réalisé par « back-cross », c'est-à-dire en croisant une souris issue de la lignée à rafraîchir avec un individu extérieur à la colonie, avec un fond génétique parfaitement caractérisé et correspondant au fond génétique initial de la lignée à rafraîchir. De plus, la cryopréservation de spermatozoïdes ou d'embryons lorsque la colonie est saine est primordial. Cela permet de régénérer une colonie touchée par une dérive génétique mais aussi d'éviter la perte d'une lignée, par exemple suite à un contexte sanitaire difficile ou une erreur humaine. Cette technique présente aussi l'avantage de conserver une lignée provisoirement non utilisée et de Réduire le nombre d'individus utilisées, respectant ainsi la règle d'éthique des « 3R ».

Il est probable que l'altération du phénotype reproducteur de lignée *Pat12* soit liée à une dérive génétique, qui pourrait être induite par la sélection d'allèles spécifiques (la lignée est créée sur un fond génétique non pur), ou bien par l'apparition de nouvelles mutations génétiques. Faute de cryopréservation de la lignée, la réalisation de back-cross successifs est le seul recours permettant de poursuivre l'étude des souris *Pat12*<sup>-/-</sup>. Sachant que la durée de gestation est d'environ 3 semaines et que la maturité sexuelle est atteinte à 6 semaines chez les femelles et 8 semaines chez les mâles (prenons une moyenne de 7 semaines), chaque back-cross nécessite en moyenne 10 semaines. Malheureusement, les back-cross de la lignée *Pat12*<sup>-/-</sup> entrepris pour tenter de restaurer le phénotype initial n'ont pas pu être réalisés dans le temps imparti par la fin de la thèse.

---

## 3<sup>ème</sup> partie : Mise en place d'une stratégie visant à évaluer l'importance de PATL2 après la GVBD

---

### I. Contexte

PATL2 est une protéine ovocytaire dont l'importance dans la croissance ovocytaire a déjà été démontrée. xPAT1A, son orthologue chez le xénope, est exprimé dans les ovocytes GV et disparaît lors de la GVBD. Dans la première partie de mon travail de thèse réalisée sur le modèle murin, j'ai confirmé l'expression de PATL2 dans les ovocytes GV et j'ai observé que, contrairement à xPAT1A, PATL2 persiste dans les zygotes et ne disparaît qu'à partir du stade 2-cellules. J'ai également montré que l'absence de PATL2 induit la formation d'ovules parfois anormaux, présentant des défauts du fuseau méiotique et de l'alignement des chromosomes sur le fuseau. Ces anomalies ne concernent qu'une partie des ovules produits et la majorité des ovules ovulés par les femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> peuvent être fécondés et initier la formation d'un embryon. Pourtant, 70 % de ces embryons n'atteignent pas le stade blastocyste, et parmi les 30 % de blastocystes formés, 85 % sont morphologiquement anormaux. Une modification de l'expression de gènes importants pour le développement embryonnaire a également été mise en évidence dans les blastocystes de morphologie atypique.

A partir de ces résultats, il est possible d'émettre l'hypothèse que la fonction de PATL2 a évolué chez la souris (et plus généralement chez les Mammifères) et que PATL2 reste importante après la GVBD, dans le maintien de transcrits nécessaire au développement précoce de l'ovocyte. Afin de valider ou d'infirmer cette hypothèse, j'ai évalué deux stratégies expérimentales.

La première propose de supprimer PATL2 dans les ovocytes au stade GV, de les faire maturer *in vitro*, puis de les féconder afin de suivre le développement des embryons. Une partie des ovules MII obtenus après maturation *in vitro* pourra être utilisée pour observer le fuseau méiotique en immunofluorescence. De plus, la qualité des blastocystes obtenus pourra être évaluée sur des critères morphologiques et par l'étude de l'expression des gènes *Scd1*, *Epas1*, *Birc5*, *Gpx1* et *Pou5f1*. La suppression de PATL2 sera réalisée par injection de morpholinos permettant d'inhiber sa traduction, la diminution de PATL2 sera vérifiée par immunofluorescence en utilisant la lignée de souris PATL2-HA.

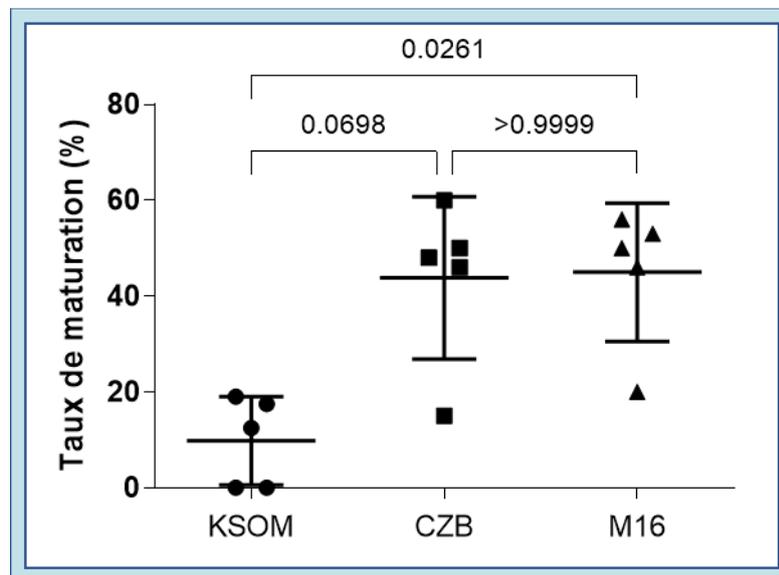
La seconde stratégie propose d'injecter l'ARNm de PATL2 dans des ovules *Patl2*<sup>-/-</sup> au cours d'une ICSI puis à suivre le développement des embryons. La qualité des blastocystes obtenus sera évaluée avec la méthode décrite précédemment.

## II. Stratégie n°1 : suppression de PATL2 dans les ovocytes GV

### 1. Utilisation du milieu M16 pour faire maturer les ovocytes *in vitro*

La mise en place de cette stratégie nécessite plusieurs mises au point préalables, la première étant la mise au point de la maturation *in vitro*. Afin de maximiser le nombre d'ovocytes maturant jusqu'au stade MII, trois milieux de maturation ont été testés : le KSOM, le CZB et le M16.

Par rapport aux milieux CZB et M16, le taux de maturation des ovocytes est significativement diminué dans le milieu KSOM. Les milieux CZB et M16 montrent des résultats équivalents en termes de maturation ovocytaire (43,8 et 45,0 % respectivement) (Figure 72). Pour des raisons pratiques internes au laboratoire, la maturation ovocytaire *in vitro* a été réalisée dans le milieu M16.

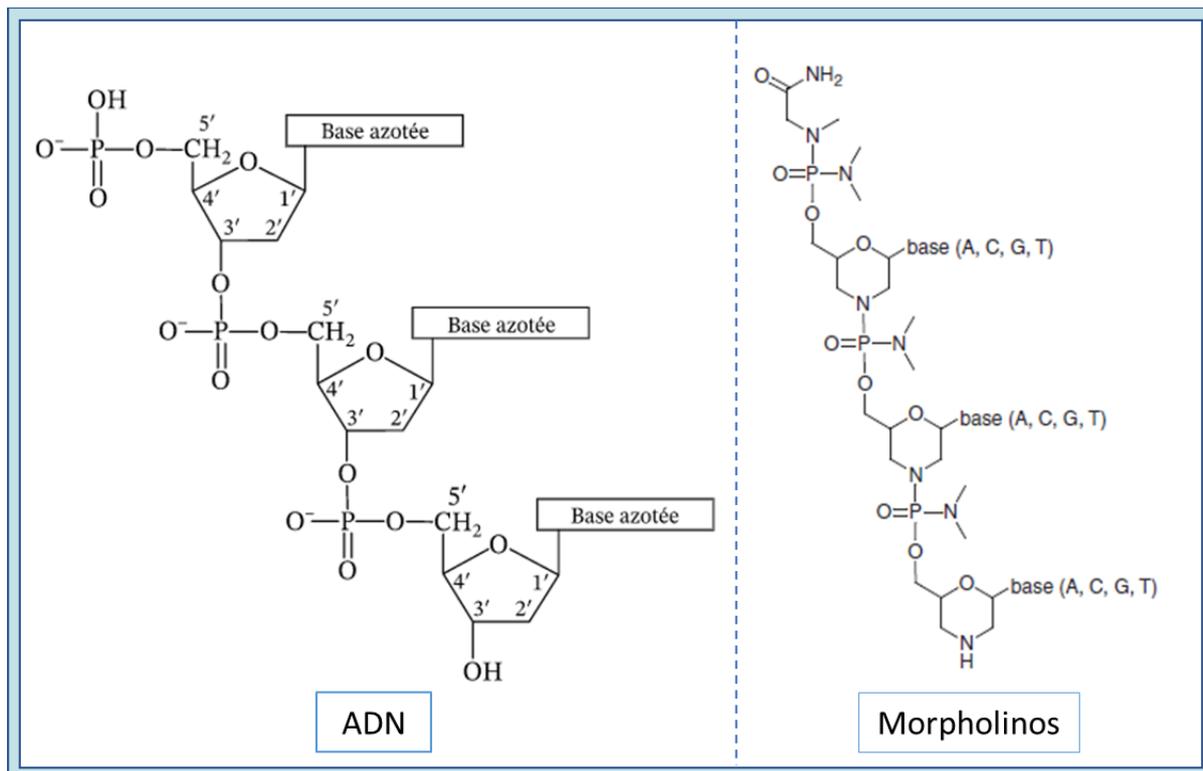


**Figure 72 : Optimisation de la maturation ovocytaire *in vitro* : choix du milieu de culture.**

Les ovocytes au stade GV sont préparés et séparés de leurs cellules folliculaires dans du milieu M2 supplémenté avec de la cilostamide 1  $\mu$ M. Les ovocytes sont ensuite soigneusement lavés dans le milieu de maturation (KSOM, CZB ou M16) dépourvu de cilostamide, puis incubés pendant 16 h à 37 °C + 5 % CO<sub>2</sub>. Pour chaque milieu de maturation testé, le taux de maturation est déterminé par la présence du premier globule polaire.

### 2. L'injection de morpholinos dans les ovocytes ne permet pas de supprimer PATL2

Les morpholinos sont des oligonucléotides synthétiques, habituellement d'une longueur de 25 bases azotées, et utilisés pour inhiber l'expression d'un gène. En se fixant sur l'ARN cible par complémentarité de séquence, les morpholinos forment un encombrement stérique qui bloque la fixation de protéines régulatrices. Ils agissent donc en bloquant l'épissage du pré-ARN ou en inhibant la traduction.

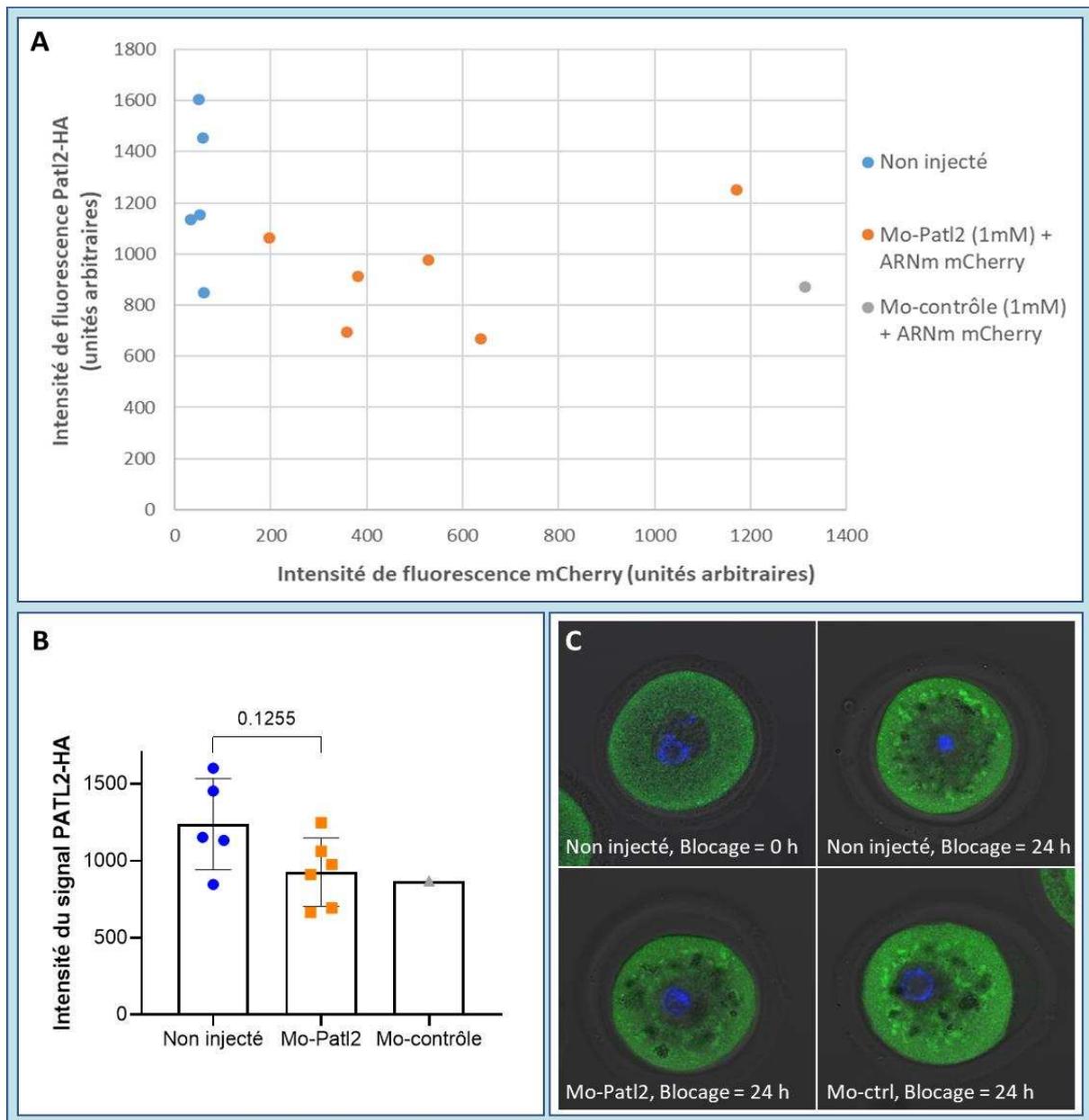


**Figure 73 : Comparaison de la structure de l'ADN et des morpholinos.**

Les morpholinos sont des oligonucléotides capables de se fixer sur les molécules d'ARNm par complémentarité de séquence et en formant un encombrement stérique qui empêche la production de la protéine. Leur structure diffère de celle de l'ADN (ici représenté simple brin) car ils sont formés d'un cycle morpholine à la place du désoxyribose. Les cycles morpholines des morpholinos sont reliés entre eux par des groupements phosphorodiamidates, présents à la place des groupements phosphates retrouvés sur l'ADN. Contrairement à l'ADN qui est chargé négativement, les morpholinos sont électriquement neutres. Figure modifiée à partir de (Moulton, 2017).

Avant de poursuivre l'expérimentation consistant à comparer le taux de maturation *in vitro* des ovocytes traités avec les morpholinos-contrôle et les morpholinos-Patl2, j'ai vérifié la suppression de PATL2 dans les ovocytes injectés avec les morpholinos-Patl2.

Dans les ovocytes injectés avec les morpholinos et l'ARNm mCherry, le signal fluorescent correspondant à la production de mCherry permet de vérifier que les ovocytes analysés ont bien été injectés. Malgré une légère diminution du signal PATL2-HA dans les ovocytes injectés avec les morpholinos-PATL2, l'intensité de fluorescence reste élevée, signifiant que la protéine PATL2-HA reste abondante (Figure 74.A.B). Dans ovocytes GV non injectés et non bloqués, la répartition du signal PATL2-HA est homogène et l'espace périvitellin est réduit. Cependant, après 24 h de blocage, la répartition du signal PATL2-HA devient hétérogène et l'espace périvitellin est augmenté (Figure 74.C). En plus de rendre les mesures d'intensité de fluorescence imprécises, ces modifications morphologiques sont le signe d'une souffrance ovocytaire importante.



**Figure 74 : Evaluation de l'efficacité des morpholinos par quantification de PATL2-HA en immunofluorescence.**

Des ovocytes PATL2-HA au stade GV sont co-injectés avec de l'ARNm *mCherry* 20 ng/μL et des morpholinos 1 mM (morpholinos-Patl2 ou morpholinos-contrôle) puis bloqués pendant 24 h dans du milieu M16 supplémenté avec 1 μM de cilostamide. Une immunofluorescence est ensuite réalisée, PATL2-HA est marquée avec un anticorps anti-HA (vert), l'ADN est marqué avec du Hoechst 33342 (bleu). « Mo » = morpholinos. « Ctrl » = contrôle.

A : Quantification de l'intensité de fluorescence PATL2-HA (ordonnée) et mCherry (abscisse) dans des ovocytes non injectés (bleu), injectés avec les morpholinos-PATL2 + ARNm *mCherry* (orange) ou injectés avec les morpholinos-contrôle + ARNm *mCherry* (gris).

B : Comparaison de l'intensité de fluorescence PATL2-HA dans des ovocytes non injectés, injectés avec les morpholinos-PATL2 ou injectés avec les morpholinos-contrôle.

C : Observation de la répartition du signal PATL2-HA et de la morphologie des ovocytes analysés. Remarque : les intensités de fluorescence sont mesurées dans les zones où la répartition du signal est homogène.

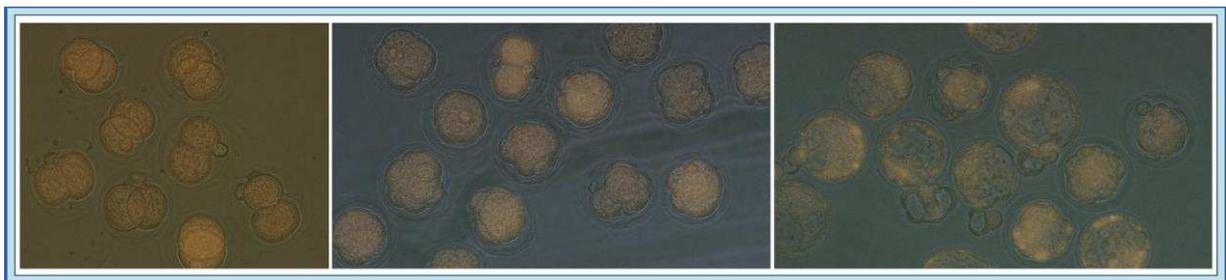
Du fait de la persistance de PATL2 malgré l'utilisation des morpholinos et de la souffrance ovocytaire engendrée par les contraintes techniques, la première stratégie envisagée semble trop complexe à mettre en place. Afin de pallier les problèmes rencontrés, une seconde stratégie a été adoptée.

### III. Stratégie n°2 : Rétablissement de PATL2 dans des ovules *Patl2*<sup>-/-</sup>

L'objectif de cette seconde stratégie repose sur le rétablissement de la production de la protéine PATL2 dans les ovules *Patl2*<sup>-/-</sup>, par l'injection d'ARNm codant pour PATL2. Du fait des difficultés rencontrées dans la réalisation de microinjection d'ovocytes au stade GV, l'injection d'ARNm *Patl2* a été réalisée dans des ovules MII au cours d'une ICSI. L'injection simultanée d'ARNm codant pour mCherry permet de vérifier l'efficacité de l'injection. Après avoir vérifié l'innocuité de mCherry sur le développement embryonnaire, ce dernier a été comparé dans les deux conditions étudiées : 1 : ovule MII *Patl2*<sup>-/-</sup> fécondé et injecté avec l'ARNm *Patl2* + ARNm *mCherry*. 2 : ovule MII *Patl2*<sup>-/-</sup> fécondé et injecté avec l'ARNm *mCherry* seul.

1. L'ARNm *mCherry* synthétisé *in vitro* et injecté dans des ovules, permet la production d'une protéine fluorescence non toxique pour le développement embryonnaire

L'observation de fluorescence dans le spectre correspondant à mCherry dans les embryons injectés avec 20 ng/μL d'ARNm codant pour mCherry permet de vérifier que l'ARNm est bien traduit en protéines fonctionnelles (Figure 75). De plus, des blastocystes sont obtenus dans les mêmes proportions que le groupe contrôle, signifiant que mCherry ne perturbe pas le développement embryonnaire et peut être utilisé comme marqueur d'injection.

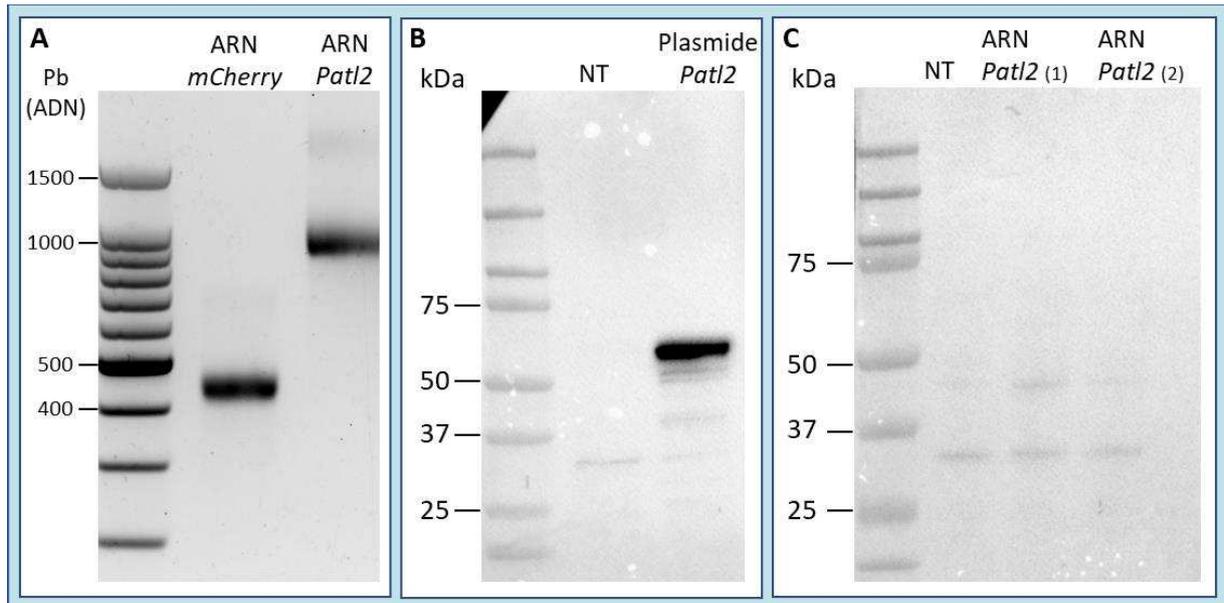


**Figure 75 : Vérification de l'innocuité de mCherry sur le développement embryonnaire préimplantatoire.**

Des ovules sont fécondés par ICSI au cours de laquelle l'ARNm *mCherry* est injecté à 20 ng/μL. Le développement des embryons et leur fluorescence sont suivis jusqu'au stade blastocyste. Un groupe contrôle, composé d'ovules fécondés par ICSI et n'ayant pas reçu d'ARNm, est réalisé. Excitation maximale = 587 nm. Emission maximale = 610 nm.

2. L'ARNm *Patl2* synthétisé *in vitro* et inséré dans des cellules HEK-293T ne permet pas la production d'une protéine détectable en Western Blot

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de visualiser des bandes uniques et non étendues pour les ARNm *mCherry* et *Patl2* (Figure 76.A). Le Western Blot sur extraits protéiques de cellules HEK-293T transfectées avec le plasmide codant pour PATL2 montre une bande intense à environ 60 kDa, absente dans l'échantillon protéique de cellules HEK-293T non transfectées (Figure 76.B). Cette bande à 60 kDa n'est pas retrouvée lorsque les cellules HEK-293T sont transfectées avec de l'ARNm *Patl2* (Figure 76.C).



**Figure 76 : Analyse de l'ARNm *Patl2* sur gel d'agarose et par Western Blot sur extraits protéiques de cellules HEK-293T transfectées.**

A : dépôts des ARNm *mCherry* et *Patl2* (500 ng) sur un gel d'agarose 1,5 %. Le marqueur de taille associé est un marqueur ADN (Promega G210A). « Pb » = paires de bases. Taille *mCherry* attendue = 900 nucléotides. Taille *Patl2* attendue = 1600 nucléotides.

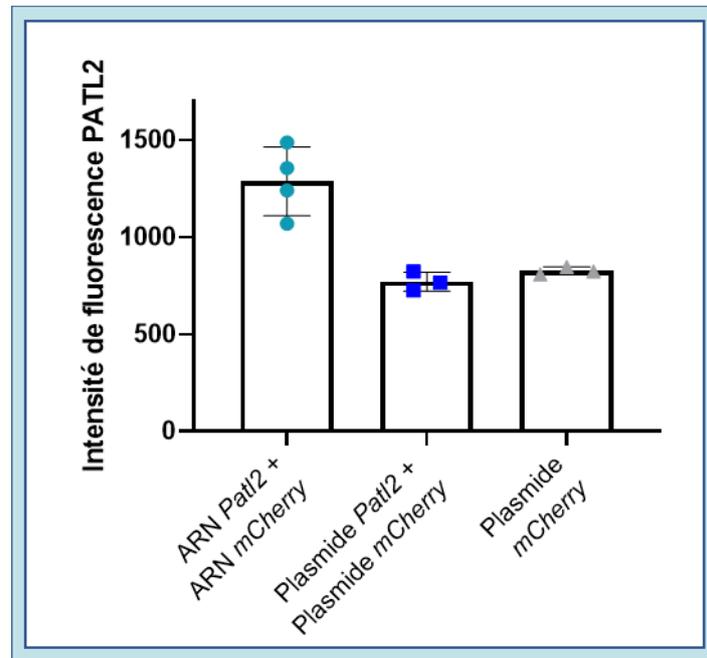
B : Western Blot sur extrait protéique de cellules HEK-293T transfectées avec le plasmide *Patl2*. PATL2-DDK est détectée avec l'anticorps anti-DDK origine TA50011-1 dilué au 1/1000<sup>e</sup>.

C : Western Blot sur extrait protéique de cellules HEK-293T transfectées avec deux échantillons d'ARNm *Patl2*. L'ARNm *Patl2* (1) est produit avec le kit Biolabs, l'ARNm *Patl2* (2) est produit avec les kits Cellscript. PATL2-DDK est détectée avec l'anticorps anti-DDK origine TA50011-1 dilué au 1/1000<sup>e</sup>.

Masse moléculaire PATL2-DDK attendu = 59,7 kDa. NT = extrait protéique de cellules HEK-293T non transfectées.

3. L'ARNm *Patl2* synthétisé *in vitro* et injecté dans des ovules ne permet pas la production de protéine détectable en immunofluorescence

Les embryons obtenus après l'injection du plasmide *Patl2* + plasmide *mCherry* présentent une intensité de fluorescence équivalente aux embryons ayant reçu uniquement le plasmide *mCherry*, utilisés comme contrôle. En revanche, lorsque les embryons ont reçu de l'ARNm *Patl2* + ARNm *mCherry*, le signal fluorescent correspondant à PATL2-DDK est légèrement augmenté (Figure 77.B).



**Figure 77 : Production de protéines PATL2 à partir d'acides nucléiques injectés au cours d'une ICSI.**

Des ovules sont fécondés par ICSI au cours de laquelle des acides nucléiques sont injectés. Plusieurs conditions sont testées : injection ARN *Patl2* 50 ng/ $\mu$ l + ARN *mCherry* 20 ng/ $\mu$ l +/-, injection plasmide *Patl2* 50 ng/ $\mu$ l + plasmide *mCherry* 50 ng/ $\mu$ l, injection plasmide *mCherry* 50 ng/ $\mu$ l seul. La production de protéines PATL2 est détectée par immunofluorescence au stade 2-cellules, avec un anticorps anti-DDK (Sigma-Aldrich, F3165) dilué au 1/500<sup>e</sup>.

#### IV. Discussions

L'objectif de cette deuxième partie de thèse était d'évaluer l'importance de PATL2 après la GVBD. Pour cela, deux stratégies ont été mises en place. La première stratégie visait à supprimer PATL2 dans les ovocytes au stade GV par l'injection de morpholinos, puis étudier la capacité des ovocytes à maturer *in vitro*, à être fécondés et à former des embryons. La seconde stratégie consistait à injecter de l'ARNm codant pour la protéine PATL2 dans les ovules MII *Patl2*<sup>-/-</sup> au cours d'une ICSI, puis à étudier la compétence développementale des embryons ainsi formés.

## 1. Difficultés rencontrées dans la suppression transitoire de PATL2 dans les ovocytes GV

Afin de mettre en place la première stratégie, j'ai cherché à optimiser le protocole de maturation ovocytaire *in vitro*. Pour cela, plusieurs milieux de maturation ont été testés et les meilleurs taux de maturation étaient obtenus avec les milieux CZB et M16. Dans la littérature, les taux de maturation *in vitro* chez la souris varient fortement d'un article à l'autre puisque le pourcentage de MII obtenus est compris entre 25 et 100 % (Kim et al., 2011; H. S. Lee et al., 2010; Rostami et al., 2021). Nos résultats (environ 45 % de maturation) sont donc dans la moyenne. Au cours de ces expériences, aucune sélection des ovocytes GV utilisés n'avait été réalisée. Notons que les taux de maturation auraient pu être améliorés en ne sélectionnant que les ovocytes GV SN, mais cela nécessite de marquer l'ADN, par exemple avec du Hoechst (Borsuk & Kubiak, 2018).

Il existe différentes méthodes permettant de réduire la quantité d'une protéine ciblée ; la technologie de l'interférence à l'ARN et l'utilisation des morpholinos sont les deux méthodes les plus souvent utilisées. L'interférence à l'ARN est un mécanisme naturellement utilisé par les cellules pour réguler l'expression des gènes, mais se défendre contre les pathogènes. Ce mécanisme utilise des petits ARNs interférents (small interfering RNA ou siRNA), doubles brins, non-codants, d'une vingtaine de nucléotides. Alors qu'un des deux brins, dit passager, est dégradé, l'autre brin, dit guide, est incorporé au complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complexes). La reconnaissance d'un ARN cible par le complexe RISC, et par complémentarité de séquence avec le brin guide, induit la dégradation de l'ARN ciblé. Les morpholinos sont des oligonucléotides synthétiques, qui, en se fixant sur l'ARN ciblé par complémentarité de séquence, empêchent la fixation de protéines régulatrices, inhibant ainsi l'épissage du pré-ARNm ou la traduction de l'ARNm.

Le point clé à prendre en compte dans l'utilisation de ce type de technologie est l'effet « hors-cible », connu sous le nom « off-target », qui correspond à l'observation d'un effet qui n'est pas engendré par l'inhibition de l'expression du gène ciblé. L'effet « hors-cible » peut être occasionné par l'interaction de l'agent inséré (par exemple le siRNA ou le morpholino) avec une cible non spécifique, par exemple une autre séquence d'ARN ou bien une protéine (Summerton, 2007). L'effet « hors-cible » est un inconvénient majeur des siRNA qui ont tendance à activer la protéine kinase PKR (dsRNA-dependent protein kinase) et les récepteurs TLR3, TLR7 et TLR8 (Toll-Like Receptor). La PKR et les TLR reconnaissent les acides nucléiques viraux ce qui induit l'activation des voies de signalisation à l'origine de la production d'interférons. L'activation de ces voies de signalisation par les siRNA est donc susceptible d'induire un effet « hors-cible » important et potentiellement mortel pour les cellules (Robbins, Judge, & MacLachlan, 2009; Sledz, Holko, de Veer, Silverman, & Williams, 2003).

Dans cette étude, j'ai choisi de supprimer PATL2 avec des morpholinos car la stabilité de ces molécules leur confère une meilleure résistance aux nucléases que les siRNA, leur durée d'action est ainsi augmentée. De plus, l'absence de charge des morpholinos réduit leur capacité d'interaction avec les protéines (de nombreuses interactions entre des protéines et des acides nucléiques se font pas l'intermédiaire d'interactions électrostatiques), ce qui diminue l'effet « hors-cible » (Moulton, 2017).

L'injection de morpholinos dans les ovocytes GV a été réalisée dans le but d'inhiber la traduction de *Patl2*. Après 24 h de blocage, temps nécessaire à l'action des morpholinos, j'ai observé que les ovocytes marqués en immunofluorescence avaient une répartition du signal hétérogène et une augmentation de l'espace périvitellin. Ces modifications morphologiques sont signe de souffrance ovocytaire et risquent de réduire considérablement la capacité des ovocytes à murer *in vitro*. Puisque ces signes de souffrance sont également observés dans les ovocytes non injectés et bloqués pendant 24 h, ils sont probablement liés au temps de blocage. L'impact de l'injection seule sur la souffrance ovocytaire n'a pas été évalué. Il faudrait, pour cela, injecter des ovocytes et réaliser le même type d'immunofluorescence, en absence de blocage.

La quantification de PATL2-HA a été réalisée en mesurant l'intensité du signal correspondant. L'hétérogénéité du signal rend les mesures imprécises, elles sont donc réalisées dans des zones où le signal est homogène. Malgré une légère diminution du signal PATL2-HA dans les ovocytes injectés avec les morpholinos-*Patl2*, la quantité de protéines PATL2 reste élevée. De plus, l'intensité du signal PATL2-HA n'est pas davantage diminuée lorsque l'intensité du signal mCherry est augmenté (Figure 74.A). Cela suggère que l'augmentation de la quantité de morpholinos injectée ne permet pas d'optimiser la suppression de PATL2.

L'injection de morpholinos dans les ovocytes au stade GV n'a pas permis de supprimer PATL2 de manière efficace. Cette observation pourrait s'expliquer par une stabilité importante de la protéine PATL2. En effet, les morpholinos inhibent la production des protéines en agissant au niveau de l'ARN, mais n'ont pas d'impact sur les protéines déjà produites. Si cette hypothèse est vraie, l'injection de siRNA n'aurait pas permis de supprimer PATL2. Une alternative serait donc la méthode du Trim-Away qui permet d'induire la dégradation d'une protéine ciblée par un anticorps, par le système ubiquitine-protéasome (Clift et al., 2017).

Dans le cas où nous aurions réussi à supprimer PATL2 dans les ovocytes au stade GV, la suite de l'étude consistait à faire de la maturation ovocytaire *in vitro* puis de la fécondation *in vitro*. Des tests de fécondation *in vitro*, réalisés à partir d'ovocytes GV injectés avec de l'ARNm *mCherry*, bloqués pendant 20 h puis maturés *in vitro*, n'ont pas permis d'obtenir d'embryon. Une accumulation des spermatozoïdes au niveau de la zone pellucide avait été observée, suggérant que le vieillissement des ovules au cours de l'expérience rendait la zone pellucide impénétrable pour les spermatozoïdes, nécessitant une adaptation du protocole. De ce fait, l'obtention des embryons aurait dû être réalisée par parthénogenèse ou par fécondation en ICSI.

## 2. Difficultés à exprimer une protéine à partir d'ARNm ou d'ADN plasmidique injecté dans les ovules

### 2.a. L'ARNm *mCherry* injecté est produit en protéine

La seconde stratégie mise en place consistait à restaurer la production de PATL2 dans les ovules *Patl2*<sup>-/-</sup> en y injectant de l'ARNm au cours d'une ICSI. L'injection, dans les ovules, d'ARNm *mCherry* synthétisé *in vitro*, permet la production d'une protéine fluorescente, signifiant que l'ARNm est efficacement traduit en protéine. De plus, les ovules injectés se développent

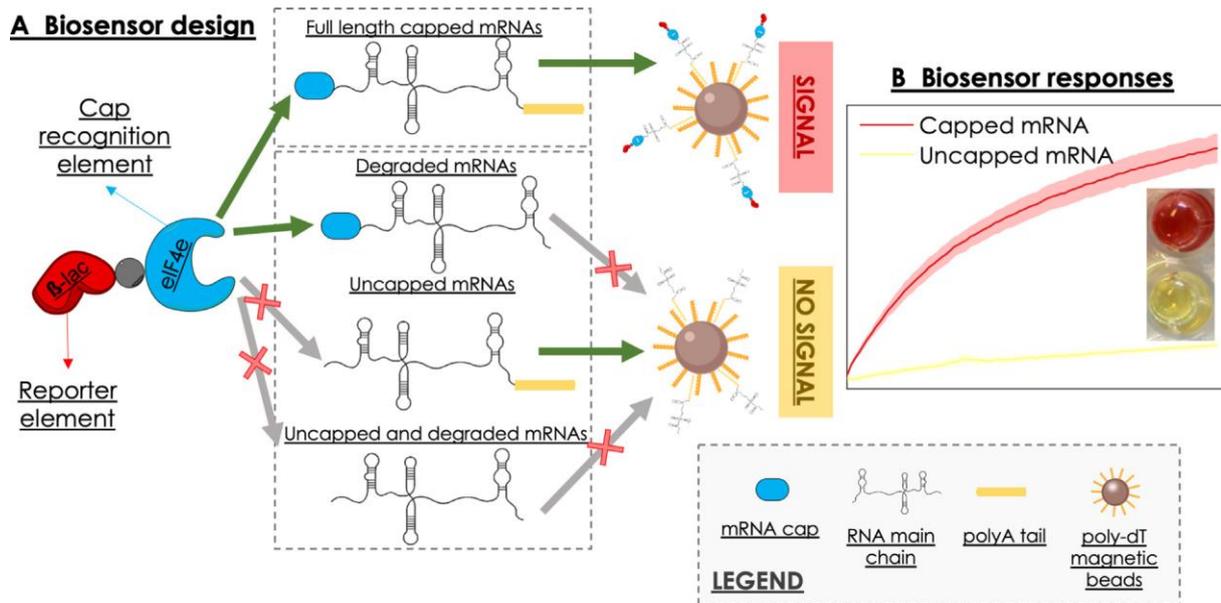
jusqu'au stade blastocyste dans les mêmes proportions que les ovules n'ayant pas reçu d'ARNm, prouvant ainsi l'innocuité de *mCherry* à la concentration utilisée (20 ng/ $\mu$ l).

### 2.b. Validation des outils moléculaires permettant de suivre l'expression de *PATL2*

L'efficacité de l'ARNm *Patl2* est plus difficile à étudier car la protéine produite n'est pas fluorescente. Afin de vérifier l'intégrité de l'ARNm, 500 ng sont tout d'abord déposés sur un gel d'agarose (Figure 76.A). La présence d'une bande unique et non étendue est encourageante car elle suggère que l'ARNm n'est pas dégradé. Faute de marqueur de taille moléculaire pour ARN, la taille de l'ARNm *Patl2* peut seulement être comparée avec celle de *mCherry* que nous savons efficace. Sachant que l'ARNm *mCherry* contient environ 900 nucléotides, la position de la bande *Patl2* par rapport à la bande *mCherry* est compatible avec la taille attendue de *Patl2* (1600 nucléotides).

La production de protéine *PATL2*-DDK à partir d'ADN et d'ARNm est ensuite comparée par Western Blot, à partir d'extraits protéiques de cellules HEK-293T ayant été transfectées avec l'ADN *Patl2* (Figure 76.B) ou avec l'ARNm *Patl2* (deux lots d'ARNm produits avec deux kits différents) (Figure 76.C) et avec un anticorps anti-DDK. Lorsque les cellules HEK-293T sont transfectées avec l'ADN *Patl2*, le Western Blot révèle une bande intense à environ 60 kDa. Cette bande étant absente dans l'extrait protéique de cellules HEK-293T non transfectées et compatible avec la taille attendue de *PATL2* (59.7 kDa), cela suggère que la production de protéine à partir d'ADN est efficace. En revanche, la bande à 60 kDa n'est pas retrouvée lorsque les cellules HEK-293T sont transfectées avec l'ARNm *Patl2* suggérant que la protéine *PATL2* n'est pas produite. Les bandes de faibles intensités, observées vers 35 kDa, correspondent probablement à une fixation non spécifique des anticorps.

La production de protéines *PATL2* à partir du plasmide suggère que l'ADN plasmidique peut être transcrit puis traduit par les cellules HEK-293T. En revanche, la production de protéines à partir d'ARNm semble inefficace, malgré la synthèse d'ARNm avec deux kits différents. Sachant que la queue poly(A) est un élément essentiel à la traduction des ARNm en protéines, il serait intéressant de vérifier l'efficacité de l'ajout de la queue poly(A) en déposant les ARN sur un gel d'agarose avant et après l'étape de polyadénylation. Environ 150 résidus de type adénosine sont supposés être ajoutés. De plus, une méthode permettant de vérifier la qualité de la coiffe et de la queue poly(A) a été publiée en 2020 (Moya-Ramirez, Bouton, Kontoravdi, & Polizzi, 2020). Cette méthode permet d'attraper les ARNm polyadénylés avec des billes magnétiques composées de plusieurs désoxythymidines et sur lesquelles se fixe la queue poly(A) des ARNm testés. Aussi, la coiffe des ARNm est reconnue par une protéine chimère composée de EIF4E (protéine qui se reconnaît la coiffe des ARNm lors de l'initiation de la traduction) et d'un élément rapporteur, la  $\beta$ -lactamase. L'hydrolyse du nitrocefine par la  $\beta$ -lactamase forme un composé coloré pouvant être détecté par une mesure d'absorbance à 492 nm. Le niveau d'absorbance est alors proportionnel à la quantité d'ARNm correctement coiffés et correctement polyadénylés (Figure 78).



**Figure 78 : Méthode permettant la détection des ARNm correctement coiffés et correctement polyadénylés.**

Les ARNm correctement polyadénylés sont captés par des billes magnétiques composées de plusieurs désoxythymidines. La coiffe de ces ARNm est détectée par une protéine chimère composée de EIF4E et de  $\beta$ -lactamase. Ainsi, la fixation de EIF4E sur les ARNm correctement coiffés peut être détectée par l'ajout du substrat de la  $\beta$ -lactamase et la formation d'un composé coloré. Figure d'après (Moya-Ramirez et al., 2020).

### 2.c. Expression de PATL2 hétérologue dans les ovules

La production de protéines PATL2 à partir de l'ADN et de l'ARNm a également été étudiée par injection des acides nucléiques dans des ovules suivie d'une immunofluorescence. Sachant que la transcription est inactive dans les ovules MII et jusqu'à l'EGA, les embryons injectés avec de l'ADN sont fixés au stade 2-cellules tardif (environ 30 h après l'ICSI) ou au stade blastocyste.

La détection de l'expression de PATL2 se fait en immunofluorescence, avec un anticorps anti-tag (DDK). Nous avons testé deux anticorps anti-tag (DDK), un anticorps de chez Origène et un anticorps de chez Sigma-Aldrich, mais les marquages obtenus sont non spécifiques puisque les embryons ayant reçu uniquement l'ADN mCherry, et ayant été marqués avec un anticorps anti-DDK, fluorescent de façon relativement importante. Malheureusement nous n'avons pas trouvé un anticorps spécifique ne donnant pas de marquage sur les ovocytes non injectés.

Les embryons ayant reçu l'ADN *Patl2*, et étudiés au stade 2-cellules, fluorescent de manière semblable au contrôle, suggérant que la protéine PATL2 n'est pas produite, ou que le signal est marqué dans le signal non spécifique. Il se pourrait aussi que ces embryons aient été fixés de manière trop précoce par rapport à la reprise de la transcription. Dans les embryons injectés avec de l'ADN et fixés au stade blastocyste, les signaux correspondant à PATL2-DDK mais également à mCherry sont très faibles, résultat probablement lié à une dilution du signal au cours des mitoses.

En revanche, l'intensité de fluorescence correspondant au signal PATL2-DDK est légèrement augmentée lorsque les embryons ont reçu de l'ARNm *Patl2*. Il se pourrait qu'une petite quantité

de protéine PATL2 ait été produite, mais ce résultat nécessite d'être confirmé, d'autant plus que ces ARNm ne donnent pas de protéines dans les cellules HEK-293T.

Ensemble, les résultats décevants obtenus lors de la mise en place de la stratégie n°2 démontrent l'importance de vérifier la spécificité des anticorps utilisés et l'efficacité de production d'une protéine à partir d'ADN ou d'ARNm. Les expériences sur cellules HEK-293T transfectées soutiennent que ces cellules sont capables de produire la protéine PATL2 à partir de l'ADN, mais pas à partir d'ARNm. Bien que plus encourageantes, les expériences sur les embryons injectés ne permettent pas de certifier que les ADN et ARNm Patl2 permettent de produire la protéine. Plusieurs mises au point pourraient être réalisées afin d'améliorer la production de protéine PATL2.

Tout d'abord, la production de l'ARNm pourrait être optimisée de façon à améliorer sa traduction. Pour cela, il est possible de moduler l'étape de transcription *in vitro* ou l'étape de polyadénylation. Il est notamment possible d'allonger la queue poly(A) en augmentant le temps de réaction ou la quantité d'enzyme poly(A) polymérase. Les thérapies basées sur l'utilisation des ARN sont en pleine expansion, ces résultats montrent à quels points la synthèse d'ARN est une étape cruciale.

Par la suite, il est nécessaire d'optimiser la production de la protéine, ainsi que sa détection. Les concentrations d'ADN et d'ARNm injectés dans les ovules pourraient être augmentées, et l'immunofluorescence réalisée au stade 4-cellules. Par rapport aux embryons fixés au stade 2-cellules, les embryons fixés au stade 4-cellules auraient plus de temps pour produire la protéine. Ceci est d'autant plus important pour les embryons injectés avec de l'ADN puisque l'ADN ne sera transcrit qu'à partir de l'EGA. De plus, l'utilisation des embryons au stade 4-cellules permettrait d'éviter les problèmes de diminution du signal au cours du temps, rencontrés au stade blastocyste.

## V. Conclusion des travaux de la 3<sup>ème</sup> partie

Si les stratégies proposées semblaient plutôt faciles, leur mise en œuvre nécessite de nombreux contrôles. J'ai rencontré plusieurs difficultés, tant biologiques que méthodologiques, qui ne m'ont pas permis d'aller au bout de ces expériences. Ces difficultés sont ici livrées, afin de permettre aux lecteurs intéressés par ces techniques, de prendre connaissance des défis à surmonter lors de ce type d'expériences.

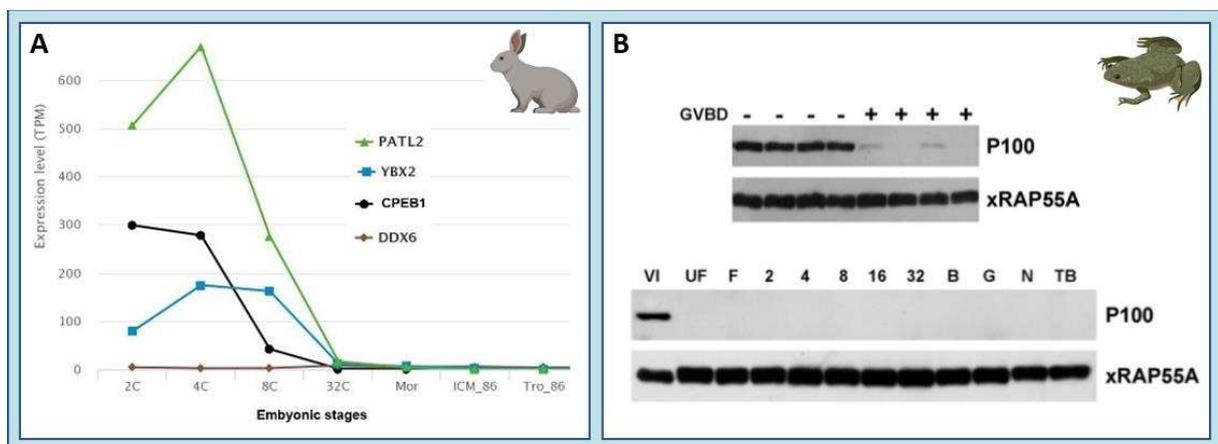
# Discussion générale & perspectives

Dans cette étude, nous avons montré que PATL2 est une protéine ovocytaire indispensable à la maturation ovocytaire et à au développement embryonnaire préimplantatoire chez la souris. Son absence chez la souris est responsable d'anomalies de maturation ovocytaire, de retard de développement embryonnaire au stade 2-cellules et induit la formation de blastocystes morphologiquement anormaux dont l'expression de gènes importants pour le développement embryonnaire est altérée. Nous avons également montré que PATL2 persiste jusqu'au stade zygote chez la souris, et disparaît dans les embryons au stade 2-cellules, c'est-à-dire lors de l'EGA majeure.

## I. Comparaison du profil d'expression de *Patl2* chez les Vertébrés

Afin de mieux comprendre ce qui régle la disparition de PATL2, j'ai étudié le profil d'expression de PATL2 chez deux espèces de Vertébrés très éloignées au niveau phylogénétique : le lapin et le xénope.

Dans les embryons de lapin, espèce dont l'EGA est tardive (entre 4 et 8-cellules), l'expression de *Patl2* (ARNm) est maximale au stade 4-cellules et s'éteint au stade 32-cellules. De façon intéressante, l'expression de xPAT1A (P100) (protéines) chez le xénope suit un profil différent puisque la protéine est abondante dans les ovocytes, disparaît lors de la GVBD et reste absente dans les embryons (Y. Nakamura et al., 2010) (Figure 79).



**Figure 79 : Différences du profil d'expression de PATL2/P100 chez le lapin et chez le xénope.**

A : quantification des transcrits *Patl2*, *Ybx2*, *Cpeb1* et *Ddx6* dans les embryons de lapin, entre les stades 2-cellules et blastocystes. Les transcrits *Patl2* sont très abondants au stade 4-cellules et disparaissent au stade 32-cellules. Données de RNAseq non publiées, produites par Véronique Duranthon, grâce à un financement du Labex Revive (ANR-10-LABX-73).

B : abondance des protéines P100 dans les ovocytes et embryons de xénope, étudiée par Western Blot. L'orthologue de PATL2, abondante dans les ovocytes immatures, disparaît lors de la GVBD. Figure d'après (Y. Nakamura et al., 2010).

Ces résultats indiquent que, chez les Mammifères, PATL2 est protégée des vagues de dégradation des ARNm et des protéines survenant lors de la GVBD et de la fécondation, suggérant une fonction plus tardive de la protéine. Chez les espèces dont l'EGA est plus tardive, il est

nécessaire de conserver les transcrits maternels pendant plus longtemps. Il se pourrait que PATL2 participe à la stabilisation de ces transcrits maternels, les protégeant ainsi des différentes vagues de dégradation.

## II. Caractérisation de la fonction de PATL2 chez les Vertébrés

Chez le xénope, xPAT1A forme un complexe avec CPEB1, Xp54 (DDX6) et xRAP55 (LSM14) et participe à réguler la traduction de la Cycline B1 et de C-MOS, protéines clés de la maturation ovocytaire, dont la traduction dépend de CPEB1 (Han et al., 2017; Y. Nakamura et al., 2010). Chez la souris, des expériences d'immunofluorescence ont montré que PATL2 ne colocalise pas avec CPEB1 ni avec DDX6 et que les transcrits *Cpeb1*, *Ddx6* et *c-Mos* ne sont pas dérégulés dans les ovocytes GV et MII déficients en PATL2 (M. Christou-Kent et al., 2018). Ces résultats, associés aux différences temporelles d'expression de PATL2/xPAT1A chez la souris et le xénope, suggèrent que la fonction de PATL2 a évolué chez les Mammifères, classe dans laquelle PATL2 resterait importante après la fécondation, et fonctionnerait de manière indépendante, ou partiellement indépendante, de CPEB1.

Dans un article publié en 2021, une équipe de chercheurs a reproduit, chez la souris, une des mutations *PATL2* identifiées chez la femme, la mutation p.Tyr217Asn (Cao et al., 2021). Pour cela, ils ont injecté de l'ARNm codant pour la protéine modifiée, dans des ovocytes de souris. Après avoir montré que l'injection de cet ARNm modifié dans les ovocytes GV altère leur capacité à maturer *in vitro*, les auteurs ont affirmé que la mutation inhibe la dégradation de PATL2, induisant une accumulation de la protéine. De manière surprenante, l'injection d'ARNm *Patl2* non muté en concentration élevée (1000 ng/μl) ne perturbe pas la maturation des ovocytes, mais ce point n'est pas discuté par les auteurs. Ces derniers ont également déclaré que PATL2 inhibe la traduction de C-MOS, une protéine impliquée dans l'activation de la voie de signalisation des MAP kinases. D'ailleurs, les effets de la mutation de PATL2 pourraient être partiellement contrebalancés par l'ajout d'un activateur de MAP kinases au cours de la maturation *in vitro*, ce qui constituerait une solution thérapeutique pour les femmes touchées par la mutation p.Tyr217Asn. Dans l'expérience citée, la régulation de la traduction de C-MOS par PATL2 été étudiée dans des ovocytes au stade GV, dans lesquels la maturation méiotique est inhibée par un inhibiteur de phosphodiesterases, la milrinone. Sachant que la production de protéines C-MOS débute à partir de la GVBD (Han et al., 2017), aucun signal n'aurait dû être obtenu. Il serait donc intéressant de reproduire l'expérience sur des ovocytes après la GVBD. De plus, plusieurs contrôles de cette publication sont imprécis ou absents (« contrôle négatif », « contrôle normal ») et la quantité d'ARNm injectée dans les ovocytes n'est pas contrôlée, notamment lors des injections d'ARNm *Gfp* fusionné avec l'extrémité 3'UTR de *c-Mos* (Cao et al., 2021). De ce fait, l'implication de PATL2 dans la régulation de la traduction de *c-Mos* nécessite d'être confirmée. Nous savons que les transcrits *c-Mos* ne sont pas dérégulés dans les ovocytes GV et MII *Patl2*<sup>-/-</sup> (M. Christou-Kent et al., 2018) mais la quantification de C-MOS en termes de protéines n'a pas été étudiée. Il serait donc intéressant de comparer la quantité de C-MOS par Western Blot ou immunofluorescence, dans des ovules MII issus des femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>.

La fonction de PATL2 reste donc mal comprise chez les Mammifères et des expériences complémentaires permettraient de mieux la caractériser.

- Afin d'étudier le rôle de PATL2 dans le contrôle de la traduction, une étude protéomique pourrait être réalisée sur des ovocytes (GV et MII) et des embryons (zygotes et 2-cellules) issus de femelles *Patl2*<sup>+/+</sup> et *Patl2*<sup>-/-</sup>.
- Les ARNm spécifiquement ciblés par PATL2 pourraient être identifiés par immunoprécipitation d'ARN (RIP, RNA ImmunoPrecipitation) suivi de séquençage d'ARN. Cette technique permet de précipiter des complexes ribonucléoprotéiques dans lesquels la protéine d'intérêt est ciblée avec un anticorps (Gagliardi & Matarazzo, 2016). Elle serait donc réalisée à partir de la lignée PATL2-HA, avec un anticorps anti-HA. A partir des ARNm identifiés, une séquence consensus dans la région 3'UTR des ARNm ciblés par PATL2 pourrait être recherchée afin de savoir si PATL2 régule ces ARNm en se fixant sur une séquence spécifique.
- Chez le xénope, xPAT1A forme un complexe avec CPEB1, Xp54 (DDX6) et xRAP55 (LSM14). Les partenaires potentiels de PATL2 chez la souris pourraient être identifiés par coimmunoprécipitation de PATL2 suivi d'une analyse protéomique.

### III. Limites du modèle utilisé

L'objectif de cette thèse était d'étudier la fonction moléculaire de PATL2 afin de mieux comprendre la pathogénie de l'infertilité liée à l'absence de PATL2 chez la femme.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont été réalisés à partir d'une lignée de souris génétiquement modifiée (*Patl2*<sup>-/-</sup>), dans laquelle l'exon 7 du gène *Patl2* a été supprimé, induisant un décalage du cadre de lecture. La mutation générée chez la souris reproduit une mutation identifiée chez la femme, à l'origine de la formation d'un codon stop dans l'exon 6. Le matériel biologique des patientes n'étant pas disponible, il n'a pas été vérifié si le variant produit induit la formation d'une protéine tronquée ou une absence totale de protéine du fait de la dégradation de l'ARN non-sens (M. Christou-Kent et al., 2018). Notons que les conséquences d'une absence totale de protéine pourraient être légèrement différentes que les conséquences d'une protéine tronquée, et des variations phénotypiques pourraient avoir lieu entre les deux situations. Cela pourrait expliquer que les phénotypes reproducteurs liés à l'absence de PATL2 ne sont pas complètement identiques chez l'Humain et la souris. De plus, l'étude d'une pathologie humaine à partir du modèle murin présente parfois certaines limites puisqu'il existe des différences majeures entre le système reproducteur de la femme et celui de la souris. Par exemple, la souris est une espèce pluri-ovulante alors que la femme ovule, en général, un ovule unique à chaque cycle. Le moment de l'EGA représente une autre différence importante puisque l'EGA se déroule entre les stades 4 et 8-cellules chez la femme et entre le zygote et le stade 2-cellules chez la souris. Ces différences entre l'Humain et la souris peuvent expliquer les différences phénotypiques observées en l'absence de PATL2 chez la femme et la souris, et montrent que la souris est un modèle imparfait.

Cependant, cette différence de phénotype a permis de mettre en évidence l'importance de PATL2 dans l'embryon, ce qui n'avait pas été envisagé chez la femme, chez qui les ovules sont tous inaptes à la fécondation (M. Christou-Kent et al., 2018). Il serait intéressant d'évaluer l'importance de PATL2 entre la fécondation et l'EGA en modifiant la fenêtre temporelle d'expression de PATL2, dans un modèle animal dont la temporalité de l'EGA ressemble à celle de la femme, par exemple le lapin.

Les différences phénotypiques retrouvées en l'absence de PATL2 chez la femme et la souris ne sont pas inédites. Chez l'humain, l'absence de AURKC est responsable d'infertilité masculine totale avec un phénotype de macrocéphalie (Dieterich et al., 2007). En revanche, l'absence de cette protéine chez la souris induit un phénotype moins sévère puisque les mâles (et les femelles) sont sous-fertiles (Kimmins et al., 2007; Schindler, Davydenko, Fram, Lampson, & Schultz, 2012).

#### IV. Utilisation du modèle murin *Patl2*<sup>-/-</sup> dans la recherche de nouveaux marqueurs de qualité ovocytaire et embryonnaire

Comme abordé dans l'introduction, la recherche de marqueurs prévisionnels de bonne ou mauvaise qualité ovocytaire ou embryonnaire est un enjeu majeur en assistance médicale à la procréation. En effet, évaluer la qualité d'un ovule ou d'un embryon de manière précoce est un élément essentiel dans le choix du ou des embryons à réimplanter. Améliorer la sélection des embryons à réimplanter est un défi immense puisque cela permettrait de maximiser les chances de grossesse tout en réimplantant un embryon unique, et ainsi limiter les grossesses multiples, plus risquées. De plus, l'amélioration des taux de réussite en FIV et en ICSI permettrait de limiter le nombre de procédures invasives subies par les patientes, qui doivent supporter la stimulation ovarienne, la ponction des ovules puis la réimplantation embryonnaire.

Le modèle murin *Patl2*<sup>-/-</sup>, fortement sous-fertile mais tout de même compatible avec la production d'une descendance viable, représente une opportunité considérable dans la découverte de nouveaux marqueurs de qualité ovocytaire et embryonnaire. Sachant que les ovules issus des femelles *Patl2*<sup>-/-</sup> sont majoritairement de mauvaise qualité, ces gamètes pourraient être fécondés, puis le développement des embryons pourrait être suivi en microscopie en temps réel jusqu'au stade blastocyte. Les blastocystes obtenus seraient alors analysés individuellement sur des critères morphologiques et transcriptomiques, puis les résultats de ces analyses seraient corrélés avec les données morpho-cinétiques apportées par la microscopie en temps réelle. Cette double analyse pourrait ainsi aboutir à l'identification de nouveaux marqueurs de la qualité ovocytaire et embryonnaire. Au cours de ma thèse, j'ai d'ailleurs participé au développement d'une nouvelle stratégie de microscopie 3D (la microscopie par tomographie à diffraction d'intensité) pour étudier le développement des embryons en temps réel (Pierre et al., 2022).

---

## Autres travaux de thèse

---

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité de travailler sur des projets annexes m'ayant permis de développer davantage de compétences.

J'ai participé au développement d'outils microscopiques permettant l'évaluation de la qualité ovocytaire et embryonnaire de manière peu invasive. Ce projet, réalisé en collaboration avec l'équipe de physiciens du CEA-Leti de Grenoble, leader dans le domaine des micro et nano-technologies, repose sur l'utilisation de vidéo microscopie holographique avec reconstruction 3D. Une partie du travail réalisé au cours de ce projet a fait l'objet d'une publication (Pierre et al., 2022). Dans une seconde partie non publiée, j'ai participé à la mise au point d'un modèle de visualisation des vagues calciques chez la souris.

J'ai également travaillé sur un modèle de souris transgéniques dans lequel les taux de transmission de l'allèle muté ne suivent pas les lois de Mendel. Afin d'étudier le mécanisme en jeu, j'ai réalisé des biopsies de globules polaires et tenté une mise au point de PCR sur ces échantillons (données non publiées).

J'ai encadré une étudiante en stage de Master 1 s'intéressant au rôle des phospholipases A2 dans l'expansion des blastocystes et leur éclosion. Pour cela, l'expansion des blastocystes et leur éclosion étaient évalués en présence d'inhibiteurs spécifiques de phospholipases A2 sécrétées (données non publiées).

J'ai, de plus, participé à la rédaction de plusieurs publications du laboratoire, en commençant par m'intéresser aux protéines régulatrices des ARNm dans l'ovocyte (M. Christou-Kent et al., 2020), puis à un variant ZP1 identifié dans la même cohorte que celle ayant permis d'identifier *PATL2* (Loeuillet et al., 2022). J'ai réalisé une étude bibliographique visant à comparer les taux d'aneuploïdie spermatique chez l'homme et le chimpanzé (Guyot et al., 2021). J'ai contribué à la rédaction d'un article ayant montré que le traitement des spermatozoïdes de souris avec la phospholipase A2, groupe X (PLA2G10) permet d'améliorer les taux de fécondation *in vitro* et que cet effet est lié à l'activité enzymatique de la phospholipase mais aussi à sa fixation sur son récepteur PLA2R1 (Abi Nahed et al., 2022). J'indique finalement cette publication d'avril 2022 dans laquelle ma participation a été mineure (gestion des souris) (G. Martinez et al., 2022).

# 3D time-lapse imaging of mouse embryo using intensity diffraction tomography embedded inside a deep learning framework

WILLIAM PIERRÉ,<sup>1,\*</sup> LIONEL HERVÉ,<sup>1,\*\*</sup> CHIARA PAVIOLO,<sup>1</sup> ONDREJ MANDULA,<sup>1</sup> VINCENT REMONDIÈRE,<sup>1</sup> SOPHIE MORALES,<sup>1</sup> SERGEI GRUDININ,<sup>2</sup> PIERRE F RAY,<sup>3</sup> MAGALI DHELLEMMES<sup>3</sup>, CHRISTOPHE ARNOULT<sup>3</sup> AND CÉDRIC ALLIER,<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CEA - LETI/DTBS/LSIV, Grenoble, France

<sup>2</sup>Univ. Grenoble Alpes, CNRS, Grenoble INP, LJK, 38000 Grenoble, France

<sup>3</sup>Univ. Grenoble Alpes, INSERM U1209, CNRS UMR 5309, Institute for Advanced Biosciences, Team Genetics Epigenetics and Therapies of Infertility, 38000 Grenoble, France.

\*[William.pierre@cea.fr](mailto:William.pierre@cea.fr)

\*\*[lionel.herve@cea.fr](mailto:lionel.herve@cea.fr)

## Abstract:

We present a compact 3D diffractive microscope that can be inserted directly in a cell incubator for long-term observation of developing organisms. Our setup is particularly simple and robust, since it does not include any moving parts and is compatible with commercial cell culture containers. It has been designed to image large specimens ( $> 100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$ ) with subcellular resolution. The sample's optical properties (refractive index and absorption) are reconstructed in 3D from intensity only images recorded with different illumination angles, produced by a LED array. The reconstruction is performed using the Beam Propagation Method (BPM) embedded inside a deep learning network where the layers encode the optical properties of the object. This deep neural network is trained for a given multi-angle intensity acquisition. After training, the weights of the neural network deliver the 3D distribution of the optical properties of the sample. The effect of spherical aberrations due to the sample holder/air interfaces are taken into account in the forward model. Using this approach, we performed time-lapse 3D imaging of pre-implantation mouse embryos over 6 days. Images of embryos from a single cell (low-scattering regime) to the blastocyst stage (highly scattering regime) were successfully reconstructed. Due to its subcellular resolution, our system can provide quantitative information on the embryos' development and viability. Hence, this technology opens novel opportunities for 3D label-free live-cell imaging of whole embryos or organoids over long observation times.

## 1. Introduction

The study of small living organisms, from unicellular organisms to small animal models such as *Caenorhabditis elegans* [1] including also organoids and preimplantation embryos, requires imaging in three dimensions on a broad range of length scales, from micrometer to study subcellular structures to millimeter to analyse whole organisms.

Suitable microscopy techniques should be able to resolve structures not only laterally but also in the axial direction, a property named optical sectioning. Fluorescence based techniques such as confocal, two-photon or light-sheet microscopy possess this capability and are widely used to study thick samples. However, labelling specimen with fluorescent dyes or proteins is an invasive process, which may not be possible or suitable for some applications. Moreover, the use of fluorescence poses other issues such as phototoxicity [2], because detecting sufficient fluorescence signal requires relatively high excitation intensities and limited observation time, since fluorophores are prone to photobleaching [3].

These limitations can be circumvented by exploiting a contrast due to light diffraction instead

OPTICAL  
PUBLISHING GROUP  
Formerly OSA

Review

# Diversity of RNA-Binding Proteins Modulating Post-Transcriptional Regulation of Protein Expression in the Maturing Mammalian Oocyte

Marie Christou-Kent <sup>1,2</sup> , Magali Dhellemmes <sup>1,2</sup>, Emeline Lambert <sup>1,2</sup>, Pierre F. Ray <sup>1,2,3</sup> and Christophe Arnoult <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Université Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France; marie.cck@gmail.com (M.C.-K.); magali.dhellemmes@univ-grenoble-alpes.fr (M.D.); emeline.lambert@univ-grenoble-alpes.fr (E.L.); PRay@chu-grenoble.fr (P.F.R.)

<sup>2</sup> Institute for Advanced Biosciences INSERM U1209, CNRS UMR5309, F-38000 Grenoble, France

<sup>3</sup> CHU de Grenoble, UM GI-DPI, F-38000 Grenoble, France

\* Correspondence: christophe.arnoult@univ-grenoble-alpes.fr; Tel.: +33-(0)4-76-63-74-08

Received: 2 February 2020; Accepted: 3 March 2020; Published: 9 March 2020



**Abstract:** The oocyte faces a particular challenge in terms of gene regulation. When oocytes resume meiosis at the end of the growth phase and prior to ovulation, the condensed chromatin state prevents the transcription of genes as they are required. Transcription is effectively silenced from the late germinal vesicle (GV) stage until embryonic genome activation (EGA) following fertilisation. Therefore, during its growth, the oocyte must produce the mRNA transcripts needed to fulfil its protein requirements during the active period of meiotic completion, fertilisation, and the maternal-to zygote-transition (MZT). After meiotic resumption, gene expression control can be said to be transferred from the nucleus to the cytoplasm, from transcriptional regulation to translational regulation. Maternal RNA-binding proteins (RBPs) are the mediators of translational regulation and their role in oocyte maturation and early embryo development is vital. Understanding these mechanisms will provide invaluable insight into the oocyte's requirements for developmental competence, with important implications for the diagnosis and treatment of certain types of infertility. Here, we give an overview of post-transcriptional regulation in the oocyte, emphasising the current knowledge of mammalian RBP mechanisms, and develop the roles of these mechanisms in the timely activation and elimination of maternal transcripts.

**Keywords:** developmental competence; fertilisation; mRNA; oocyte maturation; translation

## 1. Introduction

For correct and timely function, each cell regulates the expression of its genes to suit its specific protein requirements at any given moment. A cell's requirements differ according to cell type and depend on an interaction of extracellular and intrinsic cues. A cell can execute gene regulation at a number of stages along the protein production pathway: (1) At the transcription level, via transcription factors and chromatin accessibility, (2) at the mRNA level by controlling the processing, translation, and degradation of transcripts, and (3) at the protein level, where protein activity can be modulated via post-translational modifications and degradation.

The most prominent form of regulation for the majority of genes is executed at the level of transcriptional control [1]. The binding of transcription factors is influenced by epigenetic factors including DNA methylation, the histone composition of the nucleosome, and histone modifications. Transcription factors bind to accessible DNA regulatory sequences upstream of the gene near the site of transcription initiation through DNA-binding motifs and act as switches, turning on or off

# A recurrent *ZP1* variant is responsible for oocyte maturation defect with degenerated oocytes in infertile females

Corinne Loeuillet<sup>1</sup>  | Magali Dhellemmes<sup>1</sup> | Caroline Cazin<sup>1,2,3</sup>  |  
Zine-Eddine Kherraf<sup>1,2</sup> | Selima Fourati Ben Mustapha<sup>4</sup> | Raoudha Zouari<sup>4</sup> |  
Nicolas Thierry-Mieg<sup>5</sup>  | Christophe Arnoult<sup>1</sup> | Pierre F. Ray<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup>INSERM U1209, CNRS UMR 5309, Institute for Advanced Biosciences, Team Genetics Epigenetics and Therapies of Infertility, Univ. Grenoble Alpes, Grenoble, France

<sup>2</sup>CHU Grenoble Alpes, UM GI-DPI, Grenoble, France

<sup>3</sup>Département de Génétique Moléculaire, Laboratoire Eurofins Biomnis, Lyon, France

<sup>4</sup>Polyclinique les Jasmins, Centre d'Aide Médicale à la Procréation, Centre Urbain Nord, Tunis, Tunisia

<sup>5</sup>CNRS, UMR5525, TIMC, Univ. Grenoble Alpes, Grenoble, France

## Correspondence

Corinne Loeuillet, INSERM U1209, CNRS UMR 5309, Institute for Advanced Biosciences, Team Genetics Epigenetics and Therapies of Infertility, Univ. Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France.  
Email: [corinne.loeuillet@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:corinne.loeuillet@univ-grenoble-alpes.fr)

## Funding information

Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Numbers: MASFLAGELLA (ANR-19-CE17-0014), FLAGEL-OME (ANR-19-CE17-0014); Inserm-Bettencourt Foundation; INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale)

## Abstract

A female factor is present in approximately 70% of couple infertility, often due to ovulatory disorders. In oocyte maturation defect (OMD), affected patients have a primary infertility with normal menstrual cycles but produce no oocyte, degenerated (atretic) or abnormal oocytes blocked at different stages of maturation. Four genes have so far been associated with OMD: *PATL2*, *TUBB8*, *WEE2*, and *ZP1*. In our initial study, 6 out of 23 OMD subjects were shown to carry the same *PATL2* homozygous loss of function variant and one patient had a *TUBB8* truncating variant. Here, we included four additional OMD patients and reanalyzed all 27 subjects. In addition to the seven patients with a previously identified defect, five carried the same deleterious homozygous *ZP1* variant (c.1097G>A; p.Arg366Gln). All the oocytes from *ZP1*-associated patients appeared shriveled and dark indicating that the abnormal *ZP1* protein induced oocyte death and degeneration. Overall *ZP1*-associated patients had degenerated or absent oocytes contrary to *PATL2*-associated subjects who had immature oocytes blocked mainly at the germinal vesicle stage. In this cohort of North African OMD patients, whole exome sequencing permitted to diagnose 44% of the patients studied and to identify a new frequent *ZP1* variant.

## KEYWORDS

infertility, OMD, oocytes, zona pellucida

## 1 | INTRODUCTION

Human infertility is defined as the inability to conceive a child after 1 year of unprotected intercourse and both male and female causes are equally described. Genetic factors are described in several types of female infertilities, including Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), Premature Ovarian Failure or oocyte maturation defects (OMD).<sup>1</sup> Women with OMD usually have normal menstrual cycles and

hormonal levels but upon in vitro fertilization they present variable defects in oocyte maturation leading to absent, immature, atretic or unfertilizable eggs. Within the ovaries, oocytes are arrested at prophase of meiosis I until their recruitment in the pool of growing follicles, leading to the production of a fully-grown Germinal Vesicle (GV) oocyte. This latter is sensitive to hormonal stimulation, leading to meiosis resumption characterized by the GV breakdown (GVBD) and the extrusion of the first polar body, giving rise to fully mature eggs,

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2022 The Authors. *Clinical Genetics* published by John Wiley & Sons Ltd.



Article

# FISH and Chimps: Insights into Frequency and Distribution of Sperm Aneuploidy in Chimpanzees (*Pan troglodytes*)

Charlotte Guyot <sup>1,†</sup>, Marlène Gandula <sup>1,†</sup>, Wendy Noordermeer <sup>2</sup>, Céline François-Brazier <sup>2</sup>, Rosemary Moigno <sup>2</sup>, Julien Bessonnat <sup>3</sup>, Sophie Brouillet <sup>4</sup>, Magali Dhellemmes <sup>5</sup>, Marie Bidart <sup>5</sup>, Christophe Arnoult <sup>5,6</sup>, Véronique Satre <sup>1,5</sup>, Charles Coutton <sup>1,5</sup> and Guillaume Martinez <sup>1,5,\*</sup>

- <sup>1</sup> Hôpital Couple-Enfant, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, UM de Génétique Chromosomique, 38000 Grenoble, France; cguyot2@chu-grenoble.fr (C.G.); mgandula@chu-grenoble.fr (M.G.); vsatre@chu-grenoble.fr (V.S.); ccoutton@chu-grenoble.fr (C.C.)
- <sup>2</sup> Le PAL, Saint-Pourçain-sur-Besbre, 03290 Dompierre-sur-Besbre, France; wendynoordermeer@lepal.com (W.N.); cfrancois-brazier@hotmail.fr (C.F.-B.); rosemaryveto@lepal.com (R.M.)
- <sup>3</sup> Hôpital Couple-Enfant, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, Centre Clinique et Biologique d'Assistance Médicale à la Procréation, Centre D'étude Et De Conservation Des Œufs Et Du Sperme Humains (CECOS), 38000 Grenoble, France; jbessonnat@chu-grenoble.fr
- <sup>4</sup> Université de Montpellier, EmbryoPluripotency, DEFE, INSERM 1203, Hôpital Arnaud de Villeneuve, CHRU Saint-Eloi, 80 Avenue Augustin Fliche, CEDEX 05, 34295 Montpellier, France; s-brouillet@chu-montpellier.fr
- <sup>5</sup> Genetic Epigenetic and Therapies of Infertility, Institute for Advanced Biosciences INSERM U1209, CNRS UMR5309, 38000 Grenoble, France; magali.dhellemmes@univ-grenoble-alpes.fr (M.D.); mbidart@chu-grenoble.fr (M.B.); christophe.arnoult@univ-grenoble-alpes.fr (C.A.)
- <sup>6</sup> Station de Primatologie, UPS 846, CNRS, 13790 Rousset, France
- \* Correspondence: gmartinez@chu-grenoble.fr
- † Equally contributed.



**Citation:** Guyot, C.; Gandula, M.; Noordermeer, W.; François-Brazier, C.; Moigno, R.; Bessonnat, J.; Brouillet, S.; Dhellemmes, M.; Bidart, M.; Arnoult, C.; et al. FISH and Chimps: Insights into Frequency and Distribution of Sperm Aneuploidy in Chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 10383. <https://doi.org/10.3390/ijms221910383>

Academic Editor: Pilar Coy

Received: 2 September 2021

Accepted: 24 September 2021

Published: 27 September 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Numerical chromosomal aberrations in sperm are considered to be a major factor in infertility, early pregnancy loss and syndromes with developmental and cognitive disabilities in mammals, including primates. Despite numerous studies in human and farm animals, the incidence and importance of sperm aneuploidies in non-human primate remains mostly undetermined. Here we investigated the incidence and distribution of sperm aneuploidy in chimpanzees (*Pan troglodytes*), the species closest to human. We identify evolutionary conserved DNA sequences in human and chimpanzee and selected homologous sub-telomeric regions for all chromosomes to build custom probes and perform sperm-FISH analysis on more than 10,000 sperm nuclei per chromosome. Chimpanzee mean autosomal disomy rate was  $0.057 \pm 0.02\%$ , gonosomes disomy rate was 0.198% and the total disomy rate was 1.497%. The proportion of X or Y gametes was respectively 49.94% and 50.06% for a ratio of 1.002 and diploidy rate was 0.053%. Our data provide for the first time an overview of aneuploidy in non-human primate sperm and shed new insights into the issues of aneuploidy origins and mechanisms.

**Keywords:** chromosome; cytogenetic; infertility; non-human primate; reproduction; spermatozoa

## 1. Introduction

The number of species at risk of extinction is currently nearly 1000 times the normal rate of extinction through evolution [1,2]. Primates are not spared and ~75% of species have declining populations worldwide [3]. To support species conservation and prevent inbreeding depression, new approaches have emerged incorporating genetics and/or reproductive biology technologies [4]. For instance, a genetic approach using non-invasively collected samples of a population allows an accurate characterization of its size, dynamics, dispersion distance and gene flow, but also the determination of group membership, movements, and relatedness at individual scale [5,6]. Active genetic management of fragmented populations is then achievable. Genetic diversity can be introduced by individual relocation or via medically assisted reproduction techniques (ART), predominantly vaginal or



Article

# Treatment of Mouse Sperm with a Non-Catalytic Mutant of PLA2G10 Reveals That PLA2G10 Improves In Vitro Fertilization through Both Its Enzymatic Activity and as Ligand of PLA2R1

Roland Abi Nahed <sup>1,2</sup>, Magali Dhellemmes <sup>1,2</sup>, Christine Payré <sup>3</sup>, Emilie Le Blévec <sup>1,2</sup>, Jean-Philippe Perrier <sup>1,2</sup>, Sylviane Hennebicq <sup>1,2,4</sup>, Jessica Escoffier <sup>1,2</sup>, Pierre F. Ray <sup>1,2,5</sup>, Corinne Loeuillet <sup>1,2</sup>, Gérard Lambeau <sup>3</sup> and Christophe Arnoult <sup>1,2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Université Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France; rolandabinahed@gmail.com (R.A.N.); magali.dhellemmes@univ-grenoble-alpes.fr (M.D.); emilie.leblevec@gmail.com (E.L.B.); christophe.arnoult@cnrs.fr (J.-P.P.); shennebicq@chu-grenoble.fr (S.H.); jessica.escoffier@univ-grenoble-alpes.fr (J.E.); pray@chu-grenoble.fr (P.F.R.); corinne.loeuillet@univ-grenoble-alpes.fr (C.L.)
- <sup>2</sup> Institute for Advanced Bioscience, INSERM 1209, CNRS UMR 5309, F-38700 La Tronche, France
- <sup>3</sup> Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Université Côte d'Azur, CNRS, Valbonne Sophia Antipolis, F-06560 Valbonne, France; payre@ipmc.cnrs.fr (C.P.); lambeau@ipmc.cnrs.fr (G.L.)
- <sup>4</sup> CHU de Grenoble, Centre d'AMP-CECOS, CS1021, F-38000 Grenoble, France
- <sup>5</sup> CHU de Grenoble, UF de Biochimie et Génétique Moléculaire, F-38000 Grenoble, France
- \* Correspondence: christophe.arnoult@univ-grenoble-alpes.fr; Tel.: +33-476-637-408



**Citation:** Abi Nahed, R.; Dhellemmes, M.; Payré, C.; Le Blévec, E.; Perrier, J.-P.; Hennebicq, S.; Escoffier, J.; Ray, P.F.; Loeuillet, C.; Lambeau, G.; et al. Treatment of Mouse Sperm with a Non-Catalytic Mutant of PLA2G10 Reveals That PLA2G10 Improves In Vitro Fertilization through Both Its Enzymatic Activity and as Ligand of PLA2R1. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8033. <https://doi.org/10.3390/ijms23148033>

Academic Editors: Elisabetta Baldi, Lara Tamburrino and Sara Marchiani

Received: 12 June 2022

Accepted: 18 July 2022

Published: 21 July 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The group X secreted phospholipase A2 (PLA2G10) is present at high levels in mouse sperm acrosome. The enzyme is secreted during capacitation and amplifies the acrosome reaction and its own secretion via an autocrine loop. PLA2G10 also improves the rate of fertilization. In in vitro fertilization (IVF) experiments, sperm from *Pla2g10*-deficient mice produces fewer two-cell embryos, and the absence of PLA2G10 is rescued by adding recombinant enzymes. Moreover, wild-type (WT) sperm treated with recombinant PLA2G10 produces more two-cell embryos. The effects of PLA2G10 on mouse fertility are inhibited by sPLA<sub>2</sub> inhibitors and rescued by products of the enzymatic reaction such as free fatty acids, suggesting a role of catalytic activity. However, PLA2G10 also binds to mouse PLA2R1, which may play a role in fertility. To determine the relative contribution of enzymatic activity and PLA2R1 binding in the profertility effect of PLA2G10, we tested H48Q-PLA2G10, a catalytically-inactive mutant of PLA2G10 with low enzymatic activity but high binding properties to PLA2R1. Its effect was tested in various mouse strains, including *Pla2r1*-deficient mice. H48Q-PLA2G10 did not trigger the acrosome reaction but was as potent as WT-PLA2G10 to improve IVF in inbred C57Bl/6 mice; however, this was not the case in OF1 outbred mice. Using gametes from these mouse strains, the effect of H48Q-PLA2G10 appeared dependent on both spermatozoa and oocytes. Moreover, sperm from C57Bl/6 *Pla2r1*-deficient mice were less fertile and lowered the profertility effects of H48Q-PLA2G10, which were completely suppressed when sperm and oocytes were collected from *Pla2r1*-deficient mice. Conversely, the effect of WT-PLA2G10 was not or less sensitive to the absence of PLA2R1, suggesting that the effect of PLA2G10 is polymodal and complex, acting both as an enzyme and a ligand of PLA2R1. This study shows that the action of PLA2G10 on gametes is complex and can simultaneously activate the catalytic pathway and the PLA2R1-dependent receptor pathway. This work also shows for the first time that PLA2G10 binding to gametes' PLA2R1 participates in fertilization optimization.

**Keywords:** in vitro fertilization; sperm; capacitation; acrosome reaction; PLA2G10; PLA2R1

# Oligogenic heterozygous inheritance of sperm abnormalities in mouse

Guillaume Martinez<sup>1,2\*</sup>, Charles Coutton<sup>1,2</sup>, Corinne Loeuillet<sup>1</sup>, Caroline Cazin<sup>1,3</sup>, Jana Muroňová<sup>1</sup>, Magalie Boguenet<sup>1</sup>, Emeline Lambert<sup>1</sup>, Magali Dhellemmes<sup>1</sup>, Geneviève Chevalier<sup>1</sup>, Jean-Pascal Hograindleur<sup>1</sup>, Charline Vilpreux<sup>1</sup>, Yasmine Neirijnck<sup>4</sup>, Zine-Eddine Kherraf<sup>1,3</sup>, Jessica Escoffier<sup>1</sup>, Serge Nef<sup>4</sup>, Pierre F Ray<sup>1,3</sup>, Christophe Arnoult<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup>Institute for Advanced Biosciences, INSERM, CNRS, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France; <sup>2</sup>UM de Génétique Chromosomique, Hôpital Couple-Enfant, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France; <sup>3</sup>UM GI-DPI, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France; <sup>4</sup>Department of Genetic Medicine and Development, University of Geneva Medical School, Genève, Switzerland; <sup>5</sup>Station de Primatologie, UPS 846, CNRS, Rousset, France

**Abstract** Male infertility is an important health concern that is expected to have a major genetic etiology. Although high-throughput sequencing has linked gene defects to more than 50% of rare and severe sperm anomalies, less than 20% of common and moderate forms are explained. We hypothesized that this low success rate could at least be partly due to oligogenic defects – the accumulation of several rare heterozygous variants in distinct, but functionally connected, genes. Here, we compared fertility and sperm parameters in male mice harboring one to four heterozygous truncating mutations of genes linked to multiple morphological anomalies of the flagellum (MMAF) syndrome. Results indicated progressively deteriorating sperm morphology and motility with increasing numbers of heterozygous mutations. This first evidence of oligogenic inheritance in failed spermatogenesis strongly suggests that oligogenic heterozygosity could explain a significant proportion of asthenoteratozoospermia cases. The findings presented pave the way to further studies in mice and man.

**\*For correspondence:**  
 gmartinez@chu-grenoble.fr (GM);  
 christophe.arnoult@univ-grenoble-alpes.fr (CA)

**Competing interest:** The authors declare that no competing interests exist.

**Funding:** See page 18

**Received:** 08 November 2021

**Preprinted:** 16 November 2021

**Accepted:** 07 April 2022

**Published:** 22 April 2022

**Reviewing Editor:** Jean-Ju Chung, Yale University, United States

© Copyright Martinez et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

## Editor's evaluation

This study provides insights into the detrimental effect of accumulative heterozygous mutations on sperm abnormalities. By breeding a series of knockout strains known to cause multiple flagellar defects, the authors demonstrated that such variations at two (digenic) or more loci (oligogenic) can contribute to sperm abnormalities in the head. These findings are significant in that they implicate oligogenic inheritance as a possible cause of unexplained male infertility.

## Introduction

Infertility is a major health concern affecting 15% of couples of reproductive-age worldwide (*Mascarenhas et al., 2012; Boivin et al., 2007*). The infertility burden has increased globally for both genders in the past 30 years (*Sun et al., 2019*), and now affects approximately 50 million couples worldwide (*Datta et al., 2016*). Infertility is broadly treated by assisted reproductive technologies (ART), and today the number of individuals who were conceived by ART is close to 0.1% of the total world population, with over 8 million children already born following in vitro fertilization (IVF). Currently, ART is estimated to account for 1–6% of births in most countries (*Faddy et al., 2018*), with over 2.5 million

# Références Bibliographiques

- Abe, H. (2007). A Non-invasive and Sensitive Method for Measuring Cellular Respiration with a Scanning Electrochemical Microscopy to Evaluate Embryo Quality. *Journal of Mammalian Ova Research*, 24(3), 70-78. doi:10.1274/jmor.24.70
- Abi Nahed, R., Dhellemmes, M., Payre, C., Le Blevec, E., Perrier, J. P., Hennebicq, S., . . . Arnoult, C. (2022). Treatment of Mouse Sperm with a Non-Catalytic Mutant of PLA2G10 Reveals That PLA2G10 Improves In Vitro Fertilization through Both Its Enzymatic Activity and as Ligand of PLA2R1. *Int J Mol Sci*, 23(14). doi:10.3390/ijms23148033
- Abu-Halima, M., Hausler, S., Backes, C., Fehlmann, T., Staib, C., Nestel, S., . . . Keller, A. (2017). Micro-ribonucleic acids and extracellular vesicles repertoire in the spent culture media is altered in women undergoing In Vitro Fertilization. *Sci Rep*, 7(1), 13525. doi:10.1038/s41598-017-13683-8
- Abu-Halima, M., Khaizaran, Z. A., Ayeshe, B. M., Fischer, U., Khaizaran, S. A., Al-Battah, F., . . . Meese, E. (2020). MicroRNAs in combined spent culture media and sperm are associated with embryo quality and pregnancy outcome. *Fertil Steril*, 113(5), 970-980 e972. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.12.028
- Achiraman, S., Ponmanickam, P., Ganesh, D. S., & Archunan, G. (2010). Detection of estrus by male mice: synergistic role of olfactory-vomeronasal system. *Neurosci Lett*, 477(3), 144-148. doi:10.1016/j.neulet.2010.04.051
- Ackert, C. L., Gittens, J. E., O'Brien, M. J., Eppig, J. J., & Kidder, G. M. (2001). Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Dev Biol*, 233(2), 258-270. doi:10.1006/dbio.2001.0216
- Acuna-Gonzalez, R. J., Olvera-Valencia, M., Lopez-Canales, J. S., Lozano-Cuenca, J., Osorio-Caballero, M., & Flores-Herrera, H. (2021). MiR-191-5p is upregulated in culture media of implanted human embryo on day fifth of development. *Reprod Biol Endocrinol*, 19(1), 109. doi:10.1186/s12958-021-00786-1
- Aguilar, J., Motato, Y., Escriba, M. J., Ojeda, M., Munoz, E., & Meseguer, M. (2014). The human first cell cycle: impact on implantation. *Reprod Biomed Online*, 28(4), 475-484. doi:10.1016/j.rbmo.2013.11.014
- Ajayi, A. F., & Akhigbe, R. E. (2020). Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertil Res Pract*, 6, 5. doi:10.1186/s40738-020-00074-3
- Ajduk, A., Illozue, T., Windsor, S., Yu, Y., Seres, K. B., Bomphrey, R. J., . . . Zernicka-Goetz, M. (2011). Rhythmic actomyosin-driven contractions induced by sperm entry predict mammalian embryo viability. *Nat Commun*, 2, 417. doi:10.1038/ncomms1424
- Akarsu, C., Caglar, G., Vicdan, K., Sozen, E., & Biberoglu, K. (2009). Smooth endoplasmic reticulum aggregations in all retrieved oocytes causing recurrent multiple anomalies: case report. *Fertil Steril*, 92(4), 1496 e1491-1496 e1493. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.06.048
- Al-Zubaidi, U., Liu, J., Cinar, O., Robker, R. L., Adhikari, D., & Carroll, J. (2019). The spatio-temporal dynamics of mitochondrial membrane potential during oocyte maturation. *Mol Hum Reprod*, 25(11), 695-705. doi:10.1093/molehr/gaz055
- Alazami, A. M., Awad, S. M., Coskun, S., Al-Hassan, S., Hijazi, H., Abdulwahab, F. M., . . . Alkuraya, F. S. (2015). TLE6 mutation causes the earliest known human embryonic lethality. *Genome Biol*, 16, 240. doi:10.1186/s13059-015-0792-0
- Alfieri, J. A., Martin, A. D., Takeda, J., Kondoh, G., Myles, D. G., & Primakoff, P. (2003). Infertility in female mice with an oocyte-specific knockout of GPI-anchored proteins. *J Cell Sci*, 116(Pt 11), 2149-2155. doi:10.1242/jcs.00430
- Alikani, M., Calderon, G., Tomkin, G., Garrisi, J., Kokot, M., & Cohen, J. (2000). Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum Reprod*, 15(12), 2634-2643. doi:10.1093/humrep/15.12.2634
- Alpha Scientists in Reproductive, M., & Embryology, E. S. I. G. o. (2011). The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod*, 26(6), 1270-1283. doi:10.1093/humrep/der037

- Alvarez, C., Taronger, R., Garcia-Garrido, C., & Gonzalez de Merlo, G. (2008). Zygote score and status 1 or 2 days after cleavage and assisted reproduction outcome. *Int J Gynaecol Obstet*, *101*(1), 16-20. doi:10.1016/j.ijgo.2007.10.021
- Andersen, C. Y., Schmidt, K. T., Kristensen, S. G., Rosendahl, M., Byskov, A. G., & Ernst, E. (2010). Concentrations of AMH and inhibin-B in relation to follicular diameter in normal human small antral follicles. *Hum Reprod*, *25*(5), 1282-1287. doi:10.1093/humrep/deq019
- Anderson, S. H., Glassner, M. J., Melnikov, A., Friedman, G., & Orynbayeva, Z. (2018). Respiriometric reserve capacity of cumulus cell mitochondria correlates with oocyte maturity. *J Assist Reprod Genet*, *35*(10), 1821-1830. doi:10.1007/s10815-018-1271-9
- Aoki, F., Hara, K. T., & Schultz, R. M. (2003). Acquisition of transcriptional competence in the 1-cell mouse embryo: requirement for recruitment of maternal mRNAs. *Mol Reprod Dev*, *64*(3), 270-274. doi:10.1002/mrd.10227
- Arakane, F., King, S. R., Du, Y., Kallen, C. B., Walsh, L. P., Watari, H., . . . Strauss, J. F., 3rd. (1997). Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *J Biol Chem*, *272*(51), 32656-32662. doi:10.1074/jbc.272.51.32656
- Araki, E., Itoi, F., Honnma, H., Asano, Y., Oguri, H., & Nishikawa, K. (2018). Correlation between the pronucleus size and the potential for human single pronucleus zygotes to develop into blastocysts : 1PN zygotes with large pronuclei can expect an embryo development to the blastocyst stage that is similar to the development of 2PN zygotes. *J Assist Reprod Genet*, *35*(5), 817-823. doi:10.1007/s10815-018-1137-1
- Arias, M. E., Risopatron, J., Sanchez, R., & Felmer, R. (2015). Intracytoplasmic sperm injection affects embryo developmental potential and gene expression in cattle. *Reprod Biol*, *15*(1), 34-41. doi:10.1016/j.repbio.2014.11.001
- Assou, S., Haouzi, D., Mahmoud, K., Aouacheria, A., Guillemin, Y., Pantesco, V., . . . Hamamah, S. (2008). A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study. *Mol Hum Reprod*, *14*(12), 711-719. doi:10.1093/molehr/gan067
- Atkins, C. M., Nozaki, N., Shigeri, Y., & Soderling, T. R. (2004). Cytoplasmic polyadenylation element binding protein-dependent protein synthesis is regulated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurosci*, *24*(22), 5193-5201. doi:10.1523/JNEUROSCI.0854-04.2004
- Avella, M. A., Xiong, B., & Dean, J. (2013). The molecular basis of gamete recognition in mice and humans. *Mol Hum Reprod*, *19*(5), 279-289. doi:10.1093/molehr/gat004
- Ayache, J., Benard, M., Ernoult-Lange, M., Minshall, N., Standart, N., Kress, M., & Weil, D. (2015). P-body assembly requires DDX6 repression complexes rather than decay or Ataxin2/2L complexes. *Mol Biol Cell*, *26*(14), 2579-2595. doi:10.1091/mbc.E15-03-0136
- Azzarello, A., Hoest, T., & Mikkelsen, A. L. (2012). The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture. *Hum Reprod*, *27*(9), 2649-2657. doi:10.1093/humrep/des210
- Babayev, E., & Seli, E. (2015). Oocyte mitochondrial function and reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol*, *27*(3), 175-181. doi:10.1097/GCO.0000000000000164
- Bachvarova, R. (1985). Gene expression during oogenesis and oocyte development in mammals. *Dev Biol (N Y 1985)*, *1*, 453-524. doi:10.1007/978-1-4615-6814-8\_11
- Baena, V., & Terasaki, M. (2019). Three-dimensional organization of transzonal projections and other cytoplasmic extensions in the mouse ovarian follicle. *Sci Rep*, *9*(1), 1262. doi:10.1038/s41598-018-37766-2
- Baerwald, A. R., Adams, G. P., & Pierson, R. A. (2003). Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women. *Biol Reprod*, *69*(3), 1023-1031. doi:10.1095/biolreprod.103.017772
- Bailey, J. L. (2010). Factors regulating sperm capacitation. *Syst Biol Reprod Med*, *56*(5), 334-348. doi:10.3109/19396368.2010.512377
- Balaban, B., Ata, B., Isiklar, A., Yakin, K., & Urman, B. (2008). Severe cytoplasmic abnormalities of the oocyte decrease cryosurvival and subsequent embryonic development of cryopreserved embryos. *Hum Reprod*, *23*(8), 1778-1785. doi:10.1093/humrep/den127

- Balakier, H., Bouman, D., Sojecki, A., Librach, C., & Squire, J. A. (2002). Morphological and cytogenetic analysis of human giant oocytes and giant embryos. *Hum Reprod*, *17*(9), 2394-2401. doi:10.1093/humrep/17.9.2394
- Bamford, T., Barrie, A., Montgomery, S., Dhillon-Smith, R., Campbell, A., Easter, C., & Coomarasamy, A. (2022). Morphological and morphokinetic associations with aneuploidy: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*, *28*(5), 656-686. doi:10.1093/humupd/dmac022
- Banerjee, A. A., Joseph, S., & Mahale, S. D. (2021). From cell surface to signalling and back: the life of the mammalian FSH receptor. *FEBS J*, *288*(8), 2673-2696. doi:10.1111/febs.15649
- Bang, J. I., Jin, J. I., Ghanem, N., Choi, B. H., Fakruzzaman, M., Ha, A. N., . . . Kong, I. K. (2015). Quality improvement of transgenic cloned bovine embryos using an aggregation method: Effects on cell number, cell ratio, embryo perimeter, mitochondrial distribution, and gene expression profile. *Theriogenology*, *84*(4), 509-523. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.04.008
- Bar-Ami, S., Zlotkin, E., Brandes, J. M., & Itskovitz-Eldor, J. (1994). Failure of meiotic competence in human oocytes. *Biol Reprod*, *50*(5), 1100-1107. doi:10.1095/biolreprod50.5.1100
- Baran, V., & Pisko, J. (2022). Cleavage of Early Mouse Embryo with Damaged DNA. *Int J Mol Sci*, *23*(7). doi:10.3390/ijms23073516
- Bartolacci, A., Dal Canto, M., Guglielmo, M. C., Mura, L., Brigante, C., Mignini Renzini, M., & Buratini, J. (2021). Early embryo morphokinetics is a better predictor of post-ICSI live birth than embryo morphology: speed is more important than beauty at the cleavage stage. *Zygote*, *29*(6), 495-502. doi:10.1017/S0967199421000253
- Beall, S., Brenner, C., & Segars, J. (2010). Oocyte maturation failure: a syndrome of bad eggs. *Fertil Steril*, *94*(7), 2507-2513. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.02.037
- Beaujean, N., Mason, K., Bonnet-Garnier, A., Salvaing, J., & Debey, P. (2010). [Embryonic genome organization after fertilization in mammals]. *Biol Aujourd'hui*, *204*(3), 205-213. doi:10.1051/jbio/2010018
- Bebbere, D., Albertini, D. F., Coticchio, G., Borini, A., & Ledda, S. (2021). The subcortical maternal complex: emerging roles and novel perspectives. *Mol Hum Reprod*, *27*(7). doi:10.1093/molehr/gaab043
- Bebbere, D., Masala, L., Albertini, D. F., & Ledda, S. (2016). The subcortical maternal complex: multiple functions for one biological structure? *J Assist Reprod Genet*, *33*(11), 1431-1438. doi:10.1007/s10815-016-0788-z
- Beg, M. A., & Ginther, O. J. (2006). Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction*, *132*(3), 365-377. doi:10.1530/rep.1.01233
- Ben-Ami, I., Freimann, S., Armon, L., Dantes, A., Strassburger, D., Friedler, S., . . . Amsterdam, A. (2006). PGE2 up-regulates EGF-like growth factor biosynthesis in human granulosa cells: new insights into the coordination between PGE2 and LH in ovulation. *Mol Hum Reprod*, *12*(10), 593-599. doi:10.1093/molehr/gal068
- Bencomo, E., Perez, R., Arteaga, M. F., Acosta, E., Pena, O., Lopez, L., . . . Palumbo, A. (2006). Apoptosis of cultured granulosa-lutein cells is reduced by insulin-like growth factor I and may correlate with embryo fragmentation and pregnancy rate. *Fertil Steril*, *85*(2), 474-480. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.08.014
- Bennabi, I., Terret, M. E., & Verlhac, M. H. (2016). Meiotic spindle assembly and chromosome segregation in oocytes. *J Cell Biol*, *215*(5), 611-619. doi:10.1083/jcb.201607062
- Bergandi, L., Basso, G., Evangelista, F., Canosa, S., Dalmasso, P., Aldieri, E., . . . Ghigo, D. (2014). Inducible nitric oxide synthase and heme oxygenase 1 are expressed in human cumulus cells and may be used as biomarkers of oocyte competence. *Reprod Sci*, *21*(11), 1370-1377. doi:10.1177/1933719114525268
- Bergere, M., Lombroso, R., Gombault, M., Wainer, R., & Selva, J. (2001). An idiopathic infertility with oocytes metaphase I maturation block: case report. *Hum Reprod*, *16*(10), 2136-2138. doi:10.1093/humrep/16.10.2136

- Bermejo-Alvarez, P., Rosenfeld, C. S., & Roberts, R. M. (2012). Effect of maternal obesity on estrous cyclicity, embryo development and blastocyst gene expression in a mouse model. *Human Reproduction*, *27*(12), 3513-3522. doi:10.1093/humrep/des327
- Bertrand, E., Van den Bergh, M., & Englert, Y. (1995). Does zona pellucida thickness influence the fertilization rate? *Hum Reprod*, *10*(5), 1189-1193. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a136116
- Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D., & Wright, G. J. (2014). Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature*, *508*(7497), 483-487. doi:10.1038/nature13203
- Borsuk, E., & Kubiak, J. Z. (2018). In Vitro Culture of Mouse Oocytes for Meiotic Maturation. *Methods Mol Biol*, *1818*, 13-21. doi:10.1007/978-1-4939-8603-3\_2
- Boucret, L., Chao de la Barca, J. M., Moriniere, C., Desquiret, V., Ferre-L'Hotellier, V., Descamps, P., . . . May-Panloup, P. (2015). Relationship between diminished ovarian reserve and mitochondrial biogenesis in cumulus cells. *Hum Reprod*, *30*(7), 1653-1664. doi:10.1093/humrep/dev114
- Braun, J. E., Tritschler, F., Haas, G., Igreja, C., Truffault, V., Weichenrieder, O., & Izaurralde, E. (2010). The C-terminal alpha-alpha superhelix of Pat is required for mRNA decapping in metazoa. *Embo j*, *29*(14), 2368-2380. doi:10.1038/emboj.2010.124
- Brook, M., Smith, J. W., & Gray, N. K. (2009). The DAZL and PABP families: RNA-binding proteins with interrelated roles in translational control in oocytes. *Reproduction*, *137*(4), 595-617. doi:10.1530/REP-08-0524
- Burkart, A. D., Xiong, B., Baibakov, B., Jimenez-Movilla, M., & Dean, J. (2012). Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *J Cell Biol*, *197*(1), 37-44. doi:10.1083/jcb.201112094
- Burns, K. H., Yan, C., Kumar, T. R., & Matzuk, M. M. (2001). Analysis of ovarian gene expression in follicle-stimulating hormone beta knockout mice. *Endocrinology*, *142*(7), 2742-2751. doi:10.1210/endo.142.7.8279
- Bustin, S. (2015). Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition; ISBN: 9780815344643; and Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition, The Problems Book; ISBN 9780815344537. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(12), 28123-28125. doi:10.3390/ijms161226074
- Cadenas, J., Pors, S. E., Kumar, A., Kalra, B., Kristensen, S. G., Andersen, C. Y., & Mamsen, L. S. (2022). Concentrations of oocyte secreted GDF9 and BMP15 decrease with MII transition during human IVM. *Reprod Biol Endocrinol*, *20*(1), 126. doi:10.1186/s12958-022-01000-6
- Camlin, N. J., McLaughlin, E. A., & Holt, J. E. (2017). Kif4 Is Essential for Mouse Oocyte Meiosis. *PLoS One*, *12*(1), e0170650. doi:10.1371/journal.pone.0170650
- Cao, Q., Zhao, C., Wang, C., Cai, L., Xia, M., Zhang, X., . . . Huo, R. (2021). The Recurrent Mutation in PATL2 Inhibits Its Degradation Thus Causing Female Infertility Characterized by Oocyte Maturation Defect Through Regulation of the Mos-MAPK Pathway. *Front Cell Dev Biol*, *9*, 628649. doi:10.3389/fcell.2021.628649
- Cariappa, A., Takematsu, H., Liu, H., Diaz, S., Haider, K., Boboila, C., . . . Pillai, S. (2009). B cell antigen receptor signal strength and peripheral B cell development are regulated by a 9-O-acetyl sialic acid esterase. *J Exp Med*, *206*(1), 125-138. doi:10.1084/jem.20081399
- Carter, D. A. (1993). In vitro fertilization of mouse eggs. *Methods Mol Biol*, *18*, 179-182. doi:10.1385/0-89603-245-0:179
- Casarini, L., Brigante, G., Simoni, M., & Santi, D. (2016). Clinical Applications of Gonadotropins in the Female: Assisted Reproduction and Beyond. *Prog Mol Biol Transl Sci*, *143*, 85-119. doi:10.1016/bs.pmbts.2016.08.002
- Castillo-Martin, M., Bonet, S., Morato, R., & Yeste, M. (2014). Supplementing culture and vitrification-warming media with l-ascorbic acid enhances survival rates and redox status of IVP porcine blastocysts via induction of GPX1 and SOD1 expression. *Cryobiology*, *68*(3), 451-458. doi:10.1016/j.cryobiol.2014.03.001
- Cebrian-Serrano, A., Salvador, I., Garcia-Rosello, E., Pericuesta, E., Perez-Cerezales, S., Gutierrez-Adan, A., . . . Silvestre, M. A. (2013). Effect of the bovine oviductal fluid on in vitro fertilization,

- development and gene expression of in vitro-produced bovine blastocysts. *Reprod Domest Anim*, 48(2), 331-338. doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02157.x
- Chaffin, C. L., & Vandevoort, C. A. (2013). Follicle growth, ovulation, and luteal formation in primates and rodents: a comparative perspective. *Exp Biol Med (Maywood)*, 238(5), 539-548. doi:10.1177/1535370213489437
- Chalbi, M., Barraud-Lange, V., Ravaux, B., Howan, K., Rodriguez, N., Soule, P., . . . Gourier, C. (2014). Binding of sperm protein Izumo1 and its egg receptor Juno drives Cd9 accumulation in the intercellular contact area prior to fusion during mammalian fertilization. *Development*, 141(19), 3732-3739. doi:10.1242/dev.111534
- Chang, H. M., Qiao, J., & Leung, P. C. (2016). Oocyte-somatic cell interactions in the human ovary-novel role of bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors. *Hum Reprod Update*, 23(1), 1-18. doi:10.1093/humupd/dmw039
- Chao, H. T., Lee, S. Y., Lee, H. M., Liao, T. L., Wei, Y. H., & Kao, S. H. (2005). Repeated ovarian stimulations induce oxidative damage and mitochondrial DNA mutations in mouse ovaries. *Ann N Y Acad Sci*, 1042, 148-156. doi:10.1196/annals.1338.016
- Charlesworth, A., Wilczynska, A., Thampi, P., Cox, L. L., & MacNicol, A. M. (2006). Musashi regulates the temporal order of mRNA translation during *Xenopus* oocyte maturation. *Embo j*, 25(12), 2792-2801. doi:10.1038/sj.emboj.7601159
- Chavez-Badiola, A., Flores-Saiffe-Farias, A., Mendizabal-Ruiz, G., Drakeley, A. J., & Cohen, J. (2020). Embryo Ranking Intelligent Classification Algorithm (ERICA): artificial intelligence clinical assistant predicting embryo ploidy and implantation. *Reprod Biomed Online*, 41(4), 585-593. doi:10.1016/j.rbmo.2020.07.003
- Chen, B., Zhang, Z., Sun, X., Kuang, Y., Mao, X., Wang, X., . . . Wang, L. (2017). Biallelic Mutations in PATL2 Cause Female Infertility Characterized by Oocyte Maturation Arrest. *Am J Hum Genet*, 101(4), 609-615. doi:10.1016/j.ajhg.2017.08.018
- Chen, J., Melton, C., Suh, N., Oh, J. S., Horner, K., Xie, F., . . . Conti, M. (2011). Genome-wide analysis of translation reveals a critical role for deleted in azoospermia-like (*Dazl*) at the oocyte-to-zygote transition. *Genes Dev*, 25(7), 755-766. doi:10.1101/gad.2028911
- Chen, L., Zhang, S., Gu, Y., Peng, Y., Huang, Z., Gong, F., & Lin, G. (2022). Vacuolization in embryos on days 3 and 4 of *in vitro* development: Association with stimulation protocols, embryo development, chromosomal status, pregnancy and neonatal outcomes. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 13, 985741. doi:10.3389/fendo.2022.985741
- Chiaratti, M. R., Garcia, B. M., Carvalho, K. F., Macabelli, C. H., Ribeiro, F., Zangirolamo, A. F., . . . Machado, T. S. (2018). Oocyte mitochondria: role on fertility and disease transmission. *Anim Reprod*, 15(3), 231-238. doi:10.21451/1984-3143-AR2018-0069
- Choi, I., Dasari, A., Kim, N. H., & Campbell, K. H. (2015). Effects of prolonged exposure of mouse embryos to elevated temperatures on embryonic developmental competence. *Reprod Biomed Online*, 31(2), 171-179. doi:10.1016/j.rbmo.2015.04.017
- Choi, J. Y., Kim, H. R., Kim, K. S., Jung, Y. S., Cho, J. Y., Hwang, D. Y., & Song, H. K. (2017). Comparative study of the immunological characteristics of three different C57BL/6N mouse substrains. *Lab Anim Res*, 33(2), 124-131. doi:10.5625/lar.2017.33.2.124
- Christou-Kent, M. (2019). *Characterising human gametogenesis arrest from gene to protein*. *Caractérisation de l'arrêt de la gamétogenèse chez l'homme du gène à la protéine*. Université Grenoble Alpes, Retrieved from <https://theses.hal.science/tel-03130592> Inserm Uga Cnrs Star Uga-comue Uga-spao-test database. (2019GREAV071)
- Christou-Kent, M., Dhellemmes, M., Lambert, E., Ray, P. F., & Arnoult, C. (2020). Diversity of RNA-Binding Proteins Modulating Post-Transcriptional Regulation of Protein Expression in the Maturing Mammalian Oocyte. *Cells*, 9(3). doi:10.3390/cells9030662

- Christou-Kent, M., Kherraf, Z. E., Amiri-Yekta, A., Le Blevet, E., Karaouzene, T., Conne, B., . . . Arnoult, C. (2018). PATL2 is a key actor of oocyte maturation whose invalidation causes infertility in women and mice. *EMBO Mol Med*, *10*(5). doi:10.15252/emmm.201708515
- Ciotti, P. M., Notarangelo, L., Morselli-Labate, A. M., Felletti, V., Porcu, E., & Venturoli, S. (2004). First polar body morphology before ICSI is not related to embryo quality or pregnancy rate. *Hum Reprod*, *19*(10), 2334-2339. doi:10.1093/humrep/deh433
- Clarke, H. J. (2012). Post-transcriptional control of gene expression during mouse oogenesis. *Results Probl Cell Differ*, *55*, 1-21. doi:10.1007/978-3-642-30406-4\_1
- Clarke, H. J. (2018). History, origin, and function of transzonal projections: the bridges of communication between the oocyte and its environment. *Anim Reprod*, *15*(3), 215-223. doi:10.21451/1984-3143-AR2018-0061
- Clement, P. (2007). [Consequences of stimulation on oocyte quality]. *Gynecol Obstet Fertil*, *35*(9), 890-897. doi:10.1016/j.gyobfe.2007.06.010
- Clift, D., McEwan, W. A., Labzin, L. I., Konieczny, V., Mogessie, B., James, L. C., & Schuh, M. (2017). A Method for the Acute and Rapid Degradation of Endogenous Proteins. *Cell*, *171*(7), 1692-1706 e1618. doi:10.1016/j.cell.2017.10.033
- Collado-Fernandez, E., Picton, H. M., & Dumollard, R. (2012). Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. *Int J Dev Biol*, *56*(10-12), 799-808. doi:10.1387/ijdb.120140ec
- Coller, J., & Parker, R. (2004). Eukaryotic mRNA decapping. *Annu Rev Biochem*, *73*, 861-890. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.074032
- Coller, J., & Parker, R. (2005). General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell*, *122*(6), 875-886. doi:10.1016/j.cell.2005.07.012
- Conti, M., & Chang, R. J. (2016). *Chapter 125 – Folliculogenesis, Ovulation, and Luteogenesis*.
- Cordova, A., Perreau, C., Uzbekova, S., Ponsart, C., Locatelli, Y., & Mermillod, P. (2014). Development rate and gene expression of IVP bovine embryos cocultured with bovine oviduct epithelial cells at early or late stage of preimplantation development. *Theriogenology*, *81*(9), 1163-1173. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.01.012
- Cordts, E. B., Christofolini, D. M., Dos Santos, A. A., Bianco, B., & Barbosa, C. P. (2011). Genetic aspects of premature ovarian failure: a literature review. *Arch Gynecol Obstet*, *283*(3), 635-643. doi:10.1007/s00404-010-1815-4
- Coticchio, G., Dal Canto, M., Mignini Renzini, M., Guglielmo, M. C., Brambillasca, F., Turchi, D., . . . Fadini, R. (2015). Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Hum Reprod Update*, *21*(4), 427-454. doi:10.1093/humupd/dmv011
- Coticchio, G., Ezoë, K., Lagalla, C., Shimazaki, K., Ohata, K., Ninomiya, M., . . . Borini, A. (2021). Perturbations of morphogenesis at the compaction stage affect blastocyst implantation and live birth rates. *Hum Reprod*, *36*(4), 918-928. doi:10.1093/humrep/deab011
- Cragle, C. E., MacNicol, M. C., Byrum, S. D., Hardy, L. L., Mackintosh, S. G., Richardson, W. A., . . . MacNicol, A. M. (2019). Musashi interaction with poly(A)-binding protein is required for activation of target mRNA translation. *J Biol Chem*, *294*(28), 10969-10986. doi:10.1074/jbc.RA119.007220
- Cristina Magli, M., Capoti, A., Resta, S., Stanghellini, I., Ferraretti, A. P., & Gianaroli, L. (2011). Prolonged absence of meiotic spindles by birefringence imaging negatively affects normal fertilization and embryo development. *Reprod Biomed Online*, *23*(6), 747-754. doi:10.1016/j.rbmo.2011.07.019
- Cruz, M., Garrido, N., Herrero, J., Perez-Cano, I., Munoz, M., & Meseguer, M. (2012). Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online*, *25*(4), 371-381. doi:10.1016/j.rbmo.2012.06.017
- Cui, W., Marcho, C., Wang, Y., Degani, R., Golan, M., Tremblay, K. D., . . . Mager, J. (2019). MED20 is essential for early embryogenesis and regulates NANOG expression. *Reproduction*, *157*(3), 215-222. doi:10.1530/REP-18-0508

- Dai, C., Hu, L., Gong, F., Tan, Y., Cai, S., Zhang, S., . . . Lin, G. (2019). ZP2 pathogenic variants cause in vitro fertilization failure and female infertility. *Genet Med*, 21(2), 431-440. doi:10.1038/s41436-018-0064-y
- Daigneault, B. W., Rajput, S., Smith, G. W., & Ross, P. J. (2018). Embryonic POU5F1 is Required for Expanded Bovine Blastocyst Formation. *Sci Rep*, 8(1), 7753. doi:10.1038/s41598-018-25964-x
- Dalton, C. M., & Carroll, J. (2013). Biased inheritance of mitochondria during asymmetric cell division in the mouse oocyte. *J Cell Sci*, 126(Pt 13), 2955-2964. doi:10.1242/jcs.128744
- Dalton, C. M., Szabadkai, G., & Carroll, J. (2014). Measurement of ATP in single oocytes: impact of maturation and cumulus cells on levels and consumption. *J Cell Physiol*, 229(3), 353-361. doi:10.1002/jcp.24457
- Damodaran, A. P., Courtheoux, T., Watrin, E., & Prigent, C. (2020). Alteration of SC35 localization by transfection reagents. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1867(4), 118650. doi:10.1016/j.bbamcr.2020.118650
- Das, D., & Arur, S. (2022). Regulation of oocyte maturation: Role of conserved ERK signaling. *Mol Reprod Dev*, 89(9), 353-374. doi:10.1002/mrd.23637
- de Moor, C. H., Meijer, H., & Lissenden, S. (2005). Mechanisms of translational control by the 3' UTR in development and differentiation. *Semin Cell Dev Biol*, 16(1), 49-58. doi:10.1016/j.semcdb.2004.11.007
- De Santis, L., Cino, I., Rabbellotti, E., Calzi, F., Persico, P., Borini, A., & Coticchio, G. (2005). Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality. *Reproductive BioMedicine Online*, 11(1), 36-42. doi:10.1016/s1472-6483(10)61296-5
- De Sutter, P., Dozortsev, D., Qian, C., & Dhont, M. (1996). Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 11(3), 595-597. doi:10.1093/humrep/11.3.595
- Deffieux, X., & Antoine, J. M. (2003). [Inhibins, activins and anti-Mullerian hormone: structure, signalling pathways, roles and predictive value in reproductive medicine]. *Gynecol Obstet Fertil*, 31(11), 900-911. doi:10.1016/j.gyobfe.2003.08.012
- Delgado-Bermudez, A., Yeste, M., Bonet, S., & Pinart, E. (2022). A Review on the Role of Bicarbonate and Proton Transporters during Sperm Capacitation in Mammals. *Int J Mol Sci*, 23(11). doi:10.3390/ijms23116333
- Desquirit-Dumas, V., Clement, A., Seegers, V., Boucret, L., Ferre-L'Hotellier, V., Bouet, P. E., . . . May-Panloup, P. (2017). The mitochondrial DNA content of cumulus granulosa cells is linked to embryo quality. *Hum Reprod*, 32(3), 607-614. doi:10.1093/humrep/dew341
- Devesa, J., & Caicedo, D. (2019). The Role of Growth Hormone on Ovarian Functioning and Ovarian Angiogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10, 450. doi:10.3389/fendo.2019.00450
- Diaz, F. J., Anderson, L. E., Wu, Y. L., Rabot, A., Tsai, S. J., & Wiltbank, M. C. (2002). Regulation of progesterone and prostaglandin F2alpha production in the CL. *Mol Cell Endocrinol*, 191(1), 65-80. doi:10.1016/s0303-7207(02)00056-4
- Dierich, A., Sairam, M. R., Monaco, L., Fimia, G. M., Gansmuller, A., LeMeur, M., & Sassone-Corsi, P. (1998). Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(23), 13612-13617. doi:10.1073/pnas.95.23.13612
- Dieterich, K., Soto Rifo, R., Faure, A. K., Hennebicq, S., Ben Amar, B., Zahi, M., . . . Ray, P. F. (2007). Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat Genet*, 39(5), 661-665. doi:10.1038/ng2027
- Dong, J., Zhang, H., Mao, X., Zhu, J., Li, D., Fu, J., . . . Sang, Q. (2021). Novel biallelic mutations in MEI1: expanding the phenotypic spectrum to human embryonic arrest and recurrent implantation failure. *Hum Reprod*, 36(8), 2371-2381. doi:10.1093/humrep/deab118
- Downs, S. M., Humpherson, P. G., & Leese, H. J. (2002). Pyruvate utilization by mouse oocytes is influenced by meiotic status and the cumulus oophorus. *Mol Reprod Dev*, 62(1), 113-123. doi:10.1002/mrd.10067

- Dresselhaus, T., Sprunck, S., & Wessel, G. M. (2016). Fertilization Mechanisms in Flowering Plants. *Curr Biol*, 26(3), R125-139. doi:10.1016/j.cub.2015.12.032
- Driancourt, M. A., Gauld, I. K., Terqui, M., & Webb, R. (1986). Variations in patterns of follicle development in prolific breeds of sheep. *J Reprod Fertil*, 78(2), 565-575. doi:10.1530/jrf.0.0780565
- Ducibella, T., Huneau, D., Angelichio, E., Xu, Z., Schultz, R. M., Kopf, G. S., . . . Ozil, J.-P. (2002). Egg-to-Embryo Transition Is Driven by Differential Responses to Ca<sup>2+</sup> Oscillation Number. *Developmental Biology*, 250(2), 280-291. doi:10.1006/dbio.2002.0788
- Dumesic, D. A., Meldrum, D. R., Katz-Jaffe, M. G., Krisher, R. L., & Schoolcraft, W. B. (2015). Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril*, 103(2), 303-316. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.11.015
- Dumollard, R., Duchen, M., & Sardet, C. (2006). Calcium signals and mitochondria at fertilisation. *Semin Cell Dev Biol*, 17(2), 314-323. doi:10.1016/j.semcdb.2006.02.009
- Dunning, K. R., Cashman, K., Russell, D. L., Thompson, J. G., Norman, R. J., & Robker, R. L. (2010). Beta-Oxidation Is Essential for Mouse Oocyte Developmental Competence and Early Embryo Development. *Biology of Reproduction*, 83(6), 909-918. doi:10.1095/biolreprod.110.084145
- Dunning, K. R., Russell, D. L., & Robker, R. L. (2014). Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and beta-oxidation. *Reproduction*, 148(1), R15-27. doi:10.1530/REP-13-0251
- Duranthon, V. (2019). La période préimplantatoire du développement des mammifères: la souris est-elle un bon modèle ? *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 172(1), 77-82. doi:10.4267/2042/70669
- Ebner, T., Moser, M., Shebl, O., Sommerguber, M., & Tews, G. (2008). Prognosis of oocytes showing aggregation of smooth endoplasmic reticulum. *Reproductive BioMedicine Online*, 16(1), 113-118. doi:10.1016/s1472-6483(10)60563-9
- Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, M., Gaiswinkler, U., Wiesinger, R., Puchner, M., & Tews, G. (2003). Presence, but not type or degree of extension, of a cytoplasmic halo has a significant influence on preimplantation development and implantation behaviour. *Hum Reprod*, 18(11), 2406-2412. doi:10.1093/humrep/deg452
- Ebner, T., Moser, M., & Tews, G. (2006). Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? *Reproductive BioMedicine Online*, 12(4), 507-512. doi:10.1016/s1472-6483(10)62006-8
- Ebner, T., Yaman, C., Moser, M., Sommergruber, M., Feichtinger, O., & Tews, G. (2000). Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 15(2), 427-430. doi:10.1093/humrep/15.2.427
- Edelmann, W., Cohen, P. E., Kane, M., Lau, K., Morrow, B., Bennett, S., . . . Kucherlapati, R. (1996). Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice. *Cell*, 85(7), 1125-1134. doi:10.1016/s0092-8674(00)81312-4
- Edwards, R. G., Steptoe, P. C., & Purdy, J. M. (1980). Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *Br J Obstet Gynaecol*, 87(9), 737-756. doi:10.1111/j.1471-0528.1980.tb04610.x
- Eilso Nielsen, M., Rasmussen, I. A., Fukuda, M., Westergaard, L. G., & Yding Andersen, C. (2010). Concentrations of anti-Mullerian hormone in fluid from small human antral follicles show a negative correlation with CYP19 mRNA expression in the corresponding granulosa cells. *Mol Hum Reprod*, 16(9), 637-643. doi:10.1093/molehr/gaq001
- Eisa, A. A., De, S., Detwiler, A., Gilker, E., Ignatious, A. C., Vijayaraghavan, S., & Kline, D. (2019). YWHA (14-3-3) protein isoforms and their interactions with CDC25B phosphatase in mouse oogenesis and oocyte maturation. *BMC Dev Biol*, 19(1), 20. doi:10.1186/s12861-019-0200-1
- Eldar-Geva, T., Srebnik, N., Altarescu, G., Varshaver, I., Brooks, B., Levy-Lahad, E., . . . Schimmel, M. S. (2014). Neonatal outcome after preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril*, 102(4), 1016-1021. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.06.023

- Elvin, J. A., Clark, A. T., Wang, P., Wolfman, N. M., & Matzuk, M. M. (1999). Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol*, *13*(6), 1035-1048. doi:10.1210/mend.13.6.0310
- Embryology, E. S. I. G. o., & Alpha Scientists in Reproductive Medicine. Electronic address, c. b. g. i. (2017). The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators. *Reprod Biomed Online*, *35*(5), 494-510. doi:10.1016/j.rbmo.2017.06.015
- Erickson, G. F. (2009). Follicle Growth and Development. *The Global Library of Women's Medicine*. doi:10.3843/glowm.10289
- Ertzeid, G., & Storeng, R. (2001). The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum Reprod*, *16*(2), 221-225. doi:10.1093/humrep/16.2.221
- Esrich, L., Grau, N., de los Santos, M. J., Romero, J. L., Pellicer, A., & Escriba, M. J. (2012). The dynamics of in vitro maturation of germinal vesicle oocytes. *Fertil Steril*, *98*(5), 1147-1151. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.07.1116
- Esencan, E., Kallen, A., Zhang, M., & Seli, E. (2019). Translational activation of maternally derived mRNAs in oocytes and early embryos and the role of embryonic poly(A) binding protein (EPAB). *Biol Reprod*, *100*(5), 1147-1157. doi:10.1093/biolre/iox034
- Esfandiari, N., Burjaq, H., Gotlieb, L., & Casper, R. F. (2006). Brown oocytes: implications for assisted reproductive technology. *Fertil Steril*, *86*(5), 1522-1525. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.03.056
- Evans, J. P. (2012). Sperm-egg interaction. *Annu Rev Physiol*, *74*, 477-502. doi:10.1146/annurev-physiol-020911-153339
- Ezoe, K., Hickman, C., Miki, T., Okimura, T., Uchiyama, K., Yabuuchi, A., . . . Kato, K. (2020). Cytoplasmic halo characteristics during fertilization and their implications for human preimplantation embryo development and pregnancy outcome. *Reprod Biomed Online*, *41*(2), 191-202. doi:10.1016/j.rbmo.2020.02.017
- Fabian, D., Cikos, S., Rehak, P., & Koppel, J. (2014). Do embryonic polar bodies commit suicide? *Zygote*, *22*(1), 10-17. doi:10.1017/S0967199412000159
- Fabre, S., Pierre, A., Mulsant, P., Bodin, L., Di Pasquale, E., Persani, L., . . . Monniaux, D. (2006). Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reprod Biol Endocrinol*, *4*, 20. doi:10.1186/1477-7827-4-20
- Fan, H. Y., Liu, Z., Shimada, M., Sterneck, E., Johnson, P. F., Hedrick, S. M., & Richards, J. S. (2009). MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science*, *324*(5929), 938-941. doi:10.1126/science.1171396
- Fan, Y. L., Han, S. B., Wu, L. H., Wang, Y. P., & Huang, G. N. (2016). Abnormally cleaving embryos are able to produce live births: a time-lapse study. *J Assist Reprod Genet*, *33*(3), 379-385. doi:10.1007/s10815-015-0632-x
- Fang, C., Tang, M., Li, T., Peng, W. L., Zhou, C. Q., Zhuang, G. L., & Leong, M. (2007). Visualization of meiotic spindle and subsequent embryonic development in in vitro and in vivo matured human oocytes. *J Assist Reprod Genet*, *24*(11), 547-551. doi:10.1007/s10815-007-9171-4
- Fang, F., Li, Z., Yu, J., Long, Y., Zhao, Q., Ding, X., . . . Xiang, W. (2021). MicroRNAs secreted by human embryos could be potential biomarkers for clinical outcomes of assisted reproductive technology. *J Adv Res*, *31*, 25-34. doi:10.1016/j.jare.2021.01.003
- Farhi, J., Nahum, H., Weissman, A., Zahalka, N., Glezerman, M., & Levran, D. (2002). Coarse granulation in the perivitelline space and IVF-ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet*, *19*(12), 545-549. doi:10.1023/a:1021243530358
- Fatemi, N., Ray, P. F., Ramezani, F., Shahani, T., Amiri-Yekta, A., Kherraf, Z. E., . . . Totonchi, M. (2021). KH domain containing 3 like (KHDC3L) frame-shift mutation causes both recurrent pregnancy loss and hydatidiform mole. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, *259*, 100-104. doi:10.1016/j.ejogrb.2021.02.006
- Fei, C. F., & Zhou, L. Q. (2022). Gene mutations impede oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development. *Bioessays*, *44*(10), e2200007. doi:10.1002/bies.202200007

- Feng, R., Sang, Q., Kuang, Y., Sun, X., Yan, Z., Zhang, S., . . . Wang, L. (2016). Mutations in TUBB8 and Human Oocyte Meiotic Arrest. *N Engl J Med*, *374*(3), 223-232. doi:10.1056/NEJMoa1510791
- Ferraretto, X., Hammas, K., Llabador, M. A., Gricourt, S., Labrosse, J., Lousqui, J., . . . Patrat, C. (2021). Early embryo development anomalies identified by time-lapse system: prevalence and impacting factors. *Reprod Biomed Online*, *43*(4), 627-636. doi:10.1016/j.rbmo.2021.06.010
- Flemr, M., Ma, J., Schultz, R. M., & Svoboda, P. (2010). P-body loss is concomitant with formation of a messenger RNA storage domain in mouse oocytes. *Biol Reprod*, *82*(5), 1008-1017. doi:10.1095/biolreprod.109.082057
- Fritz, M. A., McLachlan, R. I., Cohen, N. L., Dahl, K. D., Bremner, W. J., & Soules, M. R. (1992). Onset and characteristics of the midcycle surge in bioactive and immunoactive luteinizing hormone secretion in normal women: influence of physiological variations in periovulatory ovarian steroid hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, *75*(2), 489-493. doi:10.1210/jcem.75.2.1639949
- Fujihara, Y., Lu, Y., Noda, T., Oji, A., Larasati, T., Kojima-Kita, K., . . . Ikawa, M. (2020). Spermatozoa lacking Fertilization Influencing Membrane Protein (FIMP) fail to fuse with oocytes in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *117*(17), 9393-9400. doi:10.1073/pnas.1917060117
- Gagliardi, M., & Matarazzo, M. R. (2016). RIP: RNA Immunoprecipitation. *Methods Mol Biol*, *1480*, 73-86. doi:10.1007/978-1-4939-6380-5\_7
- Gahlay, G. K., & Rajput, N. (2020). The enigmatic sperm proteins in mammalian fertilization: an overview dagger. *Biol Reprod*, *103*(6), 1171-1185. doi:10.1093/biolre/iaaa140
- Garcia-Guerra, A., Wiltbank, M. C., Battista, S. E., Kirkpatrick, B. W., & Sartori, R. (2018). Mechanisms regulating follicle selection in ruminants: lessons learned from multiple ovulation models. *Animal Reproduction*, *15*(Suppl. 1), 660-679. doi:10.21451/1984-3143-ar2018-0027
- Garcia-Oro, S., Rey, M. I., Rodriguez, M., Duran, A., Devesa, R., & Valverde, D. (2017). Predictive value of spindle retardance in embryo implantation rate. *J Assist Reprod Genet*, *34*(5), 617-625. doi:10.1007/s10815-017-0897-3
- Garcia, J., Acosta, A., Andrews, M. C., Jones, G. S., Jones, H. W., Jr., Mantzavinos, T., . . . et al. (1984). In vitro fertilization in Norfolk, Virginia, 1980-1983. *J In Vitro Fert Embryo Transf*, *1*(1), 24-28. doi:10.1007/BF01129616
- Gardner, D. K., Lane, M., Stevens, J., & Schoolcraft, W. B. (2001). Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril*, *76*(6), 1175-1180. doi:10.1016/s0015-0282(01)02888-6
- Gardner, D. K., Wale, P. L., Collins, R., & Lane, M. (2011). Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. *Hum Reprod*, *26*(8), 1981-1986. doi:10.1093/humrep/der143
- Gazdag, E., Santenard, A., Ziegler-Birling, C., Altobelli, G., Poch, O., Tora, L., & Torres-Padilla, M. E. (2009). TBP2 is essential for germ cell development by regulating transcription and chromatin condensation in the oocyte. *Genes Dev*, *23*(18), 2210-2223. doi:10.1101/gad.535209
- Gebauer, F., & Hentze, M. W. (2004). Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *5*(10), 827-835. doi:10.1038/nrm1488
- Gebhardt, K. M., Feil, D. K., Dunning, K. R., Lane, M., & Russell, D. L. (2011). Human cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer. *Fertil Steril*, *96*(1), 47-52 e42. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.04.033
- Georgiev, D., & Glazebrook, J. (2007). Subneuronal processing of information by solitary waves and stochastic processes. In (pp. 17-11-17).
- Gilchrist, R. B., Lane, M., & Thompson, J. G. (2008). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*, *14*(2), 159-177. doi:10.1093/humupd/dmm040
- Giraldez, A. J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R. J., Van Dongen, S., Inoue, K., . . . Schier, A. F. (2006). Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science*, *312*(5770), 75-79. doi:10.1126/science.1122689

- Gong, X., & McGee, E. A. (2009). Smad3 is required for normal follicular follicle-stimulating hormone responsiveness in the mouse. *Biol Reprod*, *81*(4), 730-738. doi:10.1095/biolreprod.108.070086
- Gridelet, V., Perrier d'Hauterive, S., Polese, B., Foidart, J. M., Nisolle, M., & Geenen, V. (2020). Human Chorionic Gonadotrophin: New Pleiotropic Functions for an "Old" Hormone During Pregnancy. *Front Immunol*, *11*, 343. doi:10.3389/fimmu.2020.00343
- Griffin, D. K., & Ogur, C. (2018). Chromosomal analysis in IVF: just how useful is it? *Reproduction*, *156*(1), F29-F50. doi:10.1530/REP-17-0683
- Guan, X., Liu, D., Zhou, H., Dai, C., Wang, T., Fang, Y., . . . Li, K. (2022). Melatonin improves pregnancy outcomes in adenomyosis mice by restoring endometrial receptivity via NF-kappaB/apoptosis signaling. *Ann Transl Med*, *10*(24), 1317. doi:10.21037/atm-22-5493
- Guo, M., Zhang, C., Wang, Y., Feng, L., Wang, Z., Niu, W., . . . Chen, Z. (2016). Progesterone Receptor Membrane Component 1 Mediates Progesterone-Induced Suppression of Oocyte Meiotic Prophase I and Primordial Folliculogenesis. *Sci Rep*, *6*, 36869. doi:10.1038/srep36869
- Gupta, S. K., Bhandari, B., Shrestha, A., Biswal, B. K., Palaniappan, C., Malhotra, S. S., & Gupta, N. (2012). Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. *Cell Tissue Res*, *349*(3), 665-678. doi:10.1007/s00441-011-1319-y
- Guyot, C., Gandula, M., Noordermeer, W., Francois-Brazier, C., Moigno, R., Bessonnat, J., . . . Martinez, G. (2021). FISH and Chimps: Insights into Frequency and Distribution of Sperm Aneuploidy in Chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Int J Mol Sci*, *22*(19). doi:10.3390/ijms221910383
- Hahn, K. L., Johnson, J., Beres, B. J., Howard, S., & Wilson-Rawls, J. (2005). Lunatic fringe null female mice are infertile due to defects in meiotic maturation. *Development*, *132*(4), 817-828. doi:10.1242/dev.01601
- Halet, G., Tunwell, R., Parkinson, S. J., & Carroll, J. (2004). Conventional PKCs regulate the temporal pattern of Ca<sup>2+</sup> oscillations at fertilization in mouse eggs. *J Cell Biol*, *164*(7), 1033-1044. doi:10.1083/jcb.200311023
- Halvaei, I., Khalili, M. A., Soleimani, M., & Razi, M. H. (2011). Evaluating the Role of First Polar Body Morphology on Rates of Fertilization and Embryo Development in ICSI Cycles. *Int J Fertil Steril*, *5*(2), 110-115. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24963368>
- Hamatani, T., Carter, M. G., Sharov, A. A., & Ko, M. S. (2004). Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Dev Cell*, *6*(1), 117-131. doi:10.1016/s1534-5807(03)00373-3
- Han, S. J., Martins, J. P. S., Yang, Y., Kang, M. K., Daldello, E. M., & Conti, M. (2017). The Translation of Cyclin B1 and B2 is Differentially Regulated during Mouse Oocyte Reentry into the Meiotic Cell Cycle. *Sci Rep*, *7*(1), 14077. doi:10.1038/s41598-017-13688-3
- Hansen, D. V., Tung, J. J., & Jackson, P. K. (2006). CaMKII and polo-like kinase 1 sequentially phosphorylate the cytoskeletal factor Emi2/XErp1 to trigger its destruction and meiotic exit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(3), 608-613. doi:10.1073/pnas.0509549102
- Hanson, B., Johnstone, E., Dorais, J., Silver, B., Peterson, C. M., & Hotaling, J. (2017). Female infertility, infertility-associated diagnoses, and comorbidities: a review. *J Assist Reprod Genet*, *34*(2), 167-177. doi:10.1007/s10815-016-0836-8
- Hardarson, T., Van Landuyt, L., & Jones, G. (2012). The blastocyst. *Hum Reprod*, *27* Suppl 1, i72-91. doi:10.1093/humrep/des230
- Hartshorne, G., Montgomery, S., & Klentzeris, L. (1999). A case of failed oocyte maturation in vivo and in vitro. *Fertil Steril*, *71*(3), 567-570. doi:10.1016/s0015-0282(98)00505-6
- Hasegawa, A., Mochida, K., Inoue, H., Noda, Y., Endo, T., Watanabe, G., & Ogura, A. (2016). High-Yield Superovulation in Adult Mice by Anti-Inhibin Serum Treatment Combined with Estrous Cycle Synchronization. *Biol Reprod*, *94*(1), 21. doi:10.1095/biolreprod.115.134023
- Hassan-Ali, H., Hisham-Saleh, A., El-Gezeiry, D., Baghdady, I., Ismaeil, I., & Mandelbaum, J. (1998). Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, *13*(12), 3425-3430. doi:10.1093/humrep/13.12.3425

- He, M., Sun, X., Wang, C., & Sui, Y. (2022). Analysis of the risk of complications during pregnancy in pregnant women with assisted reproductive technology: a retrospective study using registry linkage from 2013 to 2018 in Shanghai, China. *BMC Pregnancy Childbirth*, *22*(1), 526. doi:10.1186/s12884-022-04846-1
- He, Y. T., Yang, L. L., Luo, S. M., Shen, W., Yin, S., & Sun, Q. Y. (2019). PAK4 Regulates Actin and Microtubule Dynamics during Meiotic Maturation in Mouse Oocyte. *Int J Biol Sci*, *15*(11), 2408-2418. doi:10.7150/ijbs.34718
- He, Z., Xie, M., Li, Q. Q., Duan, J., & Lu, X. (2022). Research Progress on the Microregulatory Mechanisms of Fertilization: A Review. *In Vivo*, *36*(5), 2002-2013. doi:10.21873/invivo.12926
- Higaki, S., Kishi, M., Koyama, K., Nagano, M., Katagiri, S., Takada, T., & Takahashi, Y. (2017). Early germinal vesicle breakdown is a predictor of high preimplantation developmental competent oocytes in mice. *Zygote*, *25*(1), 41-48. doi:10.1017/S0967199416000290
- Higuchi, C., Shimizu, N., Shin, S. W., Morita, K., Nagai, K., Anzai, M., . . . Matsumoto, K. (2018). Ubiquitin-proteasome system modulates zygotic genome activation in early mouse embryos and influences full-term development. *J Reprod Dev*, *64*(1), 65-74. doi:10.1262/jrd.2017-127
- Holt, J. E., Lane, S. I., & Jones, K. T. (2013). The control of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Curr Top Dev Biol*, *102*, 207-226. doi:10.1016/B978-0-12-416024-8.00007-6
- Holt, J. E., Tran, S. M., Stewart, J. L., Minahan, K., Garcia-Higuera, I., Moreno, S., & Jones, K. T. (2011). The APC/C activator FZR1 coordinates the timing of meiotic resumption during prophase I arrest in mammalian oocytes. *Development*, *138*(5), 905-913. doi:10.1242/dev.059022
- Høst, E., Gabrielsen, A., Lindenberg, S., & Smidt-Jensen, S. (2002). Apoptosis in human cumulus cells in relation to zona pellucida thickness variation, maturation stage, and cleavage of the corresponding oocyte after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, *77*(3), 511-515. doi:10.1016/s0015-0282(01)03006-0
- Huang, L., Tong, X., Wang, F., Luo, L., Jin, R., Fu, Y., . . . Zhu, F. (2018). Novel mutations in PATL2 cause female infertility with oocyte germinal vesicle arrest. *Hum Reprod*, *33*(6), 1183-1190. doi:10.1093/humrep/dey100
- Huo, M., Zhang, Y., Shi, S., Shi, H., Liu, Y., Zhang, L., . . . Niu, W. (2022). Gene Spectrum and Clinical Traits of Nine Patients With Oocyte Maturation Arrest. *Front Genet*, *13*, 772143. doi:10.3389/fgene.2022.772143
- Ibanez, E., Sanfins, A., Combelles, C. M., Overstrom, E. W., & Albertini, D. F. (2005). Genetic strain variations in the metaphase-II phenotype of mouse oocytes matured in vivo or in vitro. *Reproduction*, *130*(6), 845-855. doi:10.1530/rep.1.00558
- Ickowicz, D., Finkelstein, M., & Breitbart, H. (2012). Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian J Androl*, *14*(6), 816-821. doi:10.1038/aja.2012.81
- Igea, A., & Mendez, R. (2010). Meiosis requires a translational positive loop where CPEB1 ensues its replacement by CPEB4. *Embo j*, *29*(13), 2182-2193. doi:10.1038/emboj.2010.111
- Ikawa, M., Inoue, N., Benham, A. M., & Okabe, M. (2010). Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J Clin Invest*, *120*(4), 984-994. doi:10.1172/JCI41585
- Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A., & Okabe, M. (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*, *434*(7030), 234-238. doi:10.1038/nature03362
- Inoue, N., Satouh, Y., Ikawa, M., Okabe, M., & Yanagimachi, R. (2011). Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(50), 20008-20011. doi:10.1073/pnas.1116965108
- Iwata, K., Yumoto, K., Sugishima, M., Mizoguchi, C., Kai, Y., Iba, Y., & Mio, Y. (2014). Analysis of compaction initiation in human embryos by using time-lapse cinematography. *J Assist Reprod Genet*, *31*(4), 421-426. doi:10.1007/s10815-014-0195-2
- Jamnongjit, M., & Hammes, S. R. (2005). Oocyte maturation: the coming of age of a germ cell. *Semin Reprod Med*, *23*(3), 234-241. doi:10.1055/s-2005-872451

- Jeon, K., Kim, E. Y., Tae, J. C., Lee, C. H., Lee, K. S., Kim, Y. O., . . . Park, S. P. (2008). Survivin protein expression in bovine follicular oocytes and their in vitro developmental competence. *Anim Reprod Sci*, 108(3-4), 319-333. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.09.003
- Jeong, W. J., Cho, S. J., Lee, H. S., Deb, G. K., Lee, Y. S., Kwon, T. H., & Kong, I. K. (2009). Effect of cytoplasmic lipid content on in vitro developmental efficiency of bovine IVP embryos. *Theriogenology*, 72(4), 584-589. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.04.015
- Jiang, Z., & Shen, H. (2022). Mitochondria: emerging therapeutic strategies for oocyte rescue. *Reprod Sci*, 29(3), 711-722. doi:10.1007/s43032-021-00523-4
- Jimenez-Movilla, M., Hamze, J. G., & Romar, R. (2021). Oolemma Receptors in Mammalian Molecular Fertilization: Function and New Methods of Study. *Front Cell Dev Biol*, 9, 662032. doi:10.3389/fcell.2021.662032
- Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S. A., . . . Hirohashi, N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(12), 4892-4896. doi:10.1073/pnas.1018202108
- Johnson, M. T., Freeman, E. A., Gardner, D. K., & Hunt, P. A. (2007). Oxidative metabolism of pyruvate is required for meiotic maturation of murine oocytes in vivo. *Biol Reprod*, 77(1), 2-8. doi:10.1095/biolreprod.106.059899
- Jones, K. T. (2004). Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Mol Hum Reprod*, 10(1), 1-5. doi:10.1093/molehr/gah009
- Jones, K. T. (2005). Mammalian egg activation: from Ca<sup>2+</sup> spiking to cell cycle progression. *Reproduction*, 130(6), 813-823. doi:10.1530/rep.1.00710
- Jukam, D., Shariati, S. A. M., & Skotheim, J. M. (2017). Zygotic Genome Activation in Vertebrates. *Dev Cell*, 42(4), 316-332. doi:10.1016/j.devcel.2017.07.026
- Kahraman, S., Cetinkaya, C. P., Cetinkaya, M., Tufekci, M. A., Ekmekci, C. G., & Montag, M. (2018). Is there a correlation between follicle size and gene expression in cumulus cells and is gene expression an indicator of embryo development? *Reprod Biol Endocrinol*, 16(1), 69. doi:10.1186/s12958-018-0388-0
- Kahraman, S., Yakin, K., Donmez, E., Samli, H., Bahce, M., Cengiz, G., . . . Imirzalioglu, N. (2000). Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 15(11), 2390-2393. doi:10.1093/humrep/15.11.2390
- Kalthur, G., Salian, S. R., Nair, R., Mathew, J., Adiga, S. K., Kalthur, S. G., . . . Hande, M. P. (2016). Distribution pattern of cytoplasmic organelles, spindle integrity, oxidative stress, octamer-binding transcription factor 4 (Oct4) expression and developmental potential of oocytes following multiple superovulation. *Reprod Fertil Dev*, 28(12), 2027-2038. doi:10.1071/RD15184
- Kang, M. K., & Han, S. J. (2011). Post-transcriptional and post-translational regulation during mouse oocyte maturation. *BMB Rep*, 44(3), 147-157. doi:10.5483/BMBRep.2011.44.3.147
- Kato, Y., Iwamori, T., Ninomiya, Y., Kohda, T., Miyashita, J., Sato, M., & Saga, Y. (2019). ELAVL2-directed RNA regulatory network drives the formation of quiescent primordial follicles. *EMBO Rep*, 20(12), e48251. doi:10.15252/embr.201948251
- Kawahara, H., Imai, T., Imataka, H., Tsujimoto, M., Matsumoto, K., & Okano, H. (2008). Neural RNA-binding protein Musashi1 inhibits translation initiation by competing with eIF4G for PABP. *J Cell Biol*, 181(4), 639-653. doi:10.1083/jcb.200708004
- Kawamura, K., Sato, N., Fukuda, J., Kodama, H., Kumagai, J., Tanikawa, H., . . . Tanaka, T. (2003). Survivin acts as an antiapoptotic factor during the development of mouse preimplantation embryos. *Dev Biol*, 256(2), 331-341. doi:10.1016/s0012-1606(02)00135-5
- Kawano, H., Yamashita, N., Ito, J., & Kashiwazaki, N. (2021). Chromosomal analyses of human giant diploid oocytes by next-generation sequencing. *Reprod Med Biol*, 20(3), 260-266. doi:10.1002/rmb2.12378

- Khalife, D., Abu-Musa, A., Khalil, A., & Ghazeeri, G. (2021). Towards the selection of embryos with the greatest implantation potential. *J Obstet Gynaecol*, *41*(7), 1010-1015. doi:10.1080/01443615.2020.1835842
- Khosravi, P., Kazemi, E., Zhan, Q., Malmsten, J. E., Toschi, M., Zisimopoulos, P., . . . Hajirasouliha, I. (2019). Deep learning enables robust assessment and selection of human blastocysts after in vitro fertilization. *NPJ Digit Med*, *2*, 21. doi:10.1038/s41746-019-0096-y
- Kilani, S., & Chapman, M. G. (2014). Meiotic spindle normality predicts live birth in patients with recurrent in vitro fertilization failure. *Fertil Steril*, *101*(2), 403-406. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.10.045
- Kilani, S., Cooke, S., Kan, A., & Chapman, M. (2009). Are there non-invasive markers in human oocytes that can predict pregnancy outcome? *Reproductive BioMedicine Online*, *18*(5), 674-680. doi:10.1016/s1472-6483(10)60013-2
- Kilani, S., Cooke, S., Tilia, L., & Chapman, M. (2011). Does meiotic spindle normality predict improved blastocyst development, implantation and live birth rates? *Fertil Steril*, *96*(2), 389-393. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.05.023
- Kim, M., Hong, S. J., Lee, J. H., Min, C. K., Hwang, K. J., & Park, R. W. (2011). Comparison of in vitro maturation media of immature oocytes: the effectiveness of blastocyst culture media. *Fertil Steril*, *95*(2), 554-557. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.10.035
- Kimmins, S., Crosio, C., Kotaja, N., Hirayama, J., Monaco, L., Hoog, C., . . . Sassone-Corsi, P. (2007). Differential functions of the Aurora-B and Aurora-C kinases in mammalian spermatogenesis. *Mol Endocrinol*, *21*(3), 726-739. doi:10.1210/me.2006-0332
- Kirchhof, N., Carnwath, J. W., Lemme, E., Anastassiadis, K., Scholer, H., & Niemann, H. (2000). Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol Reprod*, *63*(6), 1698-1705. doi:10.1095/biolreprod63.6.1698
- Kirillova, A., Smitz, J. E. J., Sukhikh, G. T., & Mazunin, I. (2021). The Role of Mitochondria in Oocyte Maturation. *Cells*, *10*(9). doi:10.3390/cells10092484
- Kirkegaard, K., Agerholm, I. E., & Ingerslev, H. J. (2012). Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Hum Reprod*, *27*(5), 1277-1285. doi:10.1093/humrep/des079
- Kitasaka, H., Konuma, Y., Tokoro, M., Fukunaga, N., & Asada, Y. (2022). Oocyte cytoplasmic diameter of  $\geq 130$   $\mu\text{m}$  can be used to determine human giant oocytes. *F S Sci*, *3*(1), 10-17. doi:10.1016/j.xfss.2021.11.004
- Knight, P. G., & Glister, C. (2006). TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, *132*(2), 191-206. doi:10.1530/rep.1.01074
- Knijn, H. M., Gyorret, J. O., Vos, P. L., Hendriksen, P. J., van der Weijden, B. C., Maddox-Hyttel, P., & Dieleman, S. J. (2003). Consequences of in vivo development and subsequent culture on apoptosis, cell number, and blastocyst formation in bovine embryos. *Biol Reprod*, *69*(4), 1371-1378. doi:10.1095/biolreprod.103.017251
- Ko, C. J., Cho, Y. M., Ham, E., Cacioppo, J. A., & Park, C. J. (2022). Endothelin 2: a key player in ovulation and fertility. *Reproduction*, *163*(4), R71-R80. doi:10.1530/REP-21-0313
- Ko, M. S., Kitchen, J. R., Wang, X., Threat, T. A., Wang, X., Hasegawa, A., . . . Doi, H. (2000). Large-scale cDNA analysis reveals phased gene expression patterns during preimplantation mouse development. *Development*, *127*(8), 1737-1749. doi:10.1242/dev.127.8.1737
- Kocyigit, A., & Cevik, M. (2016). Correlation between the cryosurvival, cell number and diameter in bovine in vitro produced embryos. *Cryobiology*, *73*(2), 203-208. doi:10.1016/j.cryobiol.2016.07.010
- Konstantinidis, M., Alfarawati, S., Hurd, D., Paolucci, M., Shovelton, J., Fragouli, E., & Wells, D. (2014). Simultaneous assessment of aneuploidy, polymorphisms, and mitochondrial DNA content in human polar bodies and embryos with the use of a novel microarray platform. *Fertil Steril*, *102*(5), 1385-1392. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.07.1233
- Korkmaz, C., Sakinci, M., Bayoglu Tekin, Y., & Ercan, C. M. (2014). Do quantitative birefringence characteristics of meiotic spindle and zona pellucida have an impact on implantation in single

- embryo transfer cycles? *Arch Gynecol Obstet*, 289(2), 433-438. doi:10.1007/s00404-013-2999-1
- Kozak, M. (2006). Rethinking some mechanisms invoked to explain translational regulation in eukaryotes. *Gene*, 382, 1-11. doi:10.1016/j.gene.2006.06.004
- Krisher, R. L., Heuberger, A. L., Paczkowski, M., Stevens, J., Pospisil, C., Prather, R. S., . . . Schoolcraft, W. B. (2015). Applying metabolomic analyses to the practice of embryology: physiology, development and assisted reproductive technology. *Reprod Fertil Dev*, 27(4), 602-620. doi:10.1071/RD14359
- Kuiper, D., Bennema, A., la Bastide-van Gemert, S., Seggers, J., Schendelaar, P., Mastenbroek, S., . . . Hadders-Algra, M. (2018). Developmental outcome of 9-year-old children born after PGS: follow-up of a randomized trial. *Hum Reprod*, 33(1), 147-155. doi:10.1093/humrep/dex337
- Kumar, R., Oliver, C., Brun, C., Juarez-Martinez, A. B., Tarabay, Y., Kadlec, J., & de Massy, B. (2018). Mouse REC114 is essential for meiotic DNA double-strand break formation and forms a complex with MEI4. *Life Sci Alliance*, 1(6), e201800259. doi:10.26508/lsa.201800259
- La Marca, A., Sighinolfi, G., Radi, D., Argento, C., Baraldi, E., Arsenio, A. C., . . . Volpe, A. (2010). Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update*, 16(2), 113-130. doi:10.1093/humupd/dmp036
- Lagalla, C., Coticchio, G., Sciajno, R., Tarozzi, N., Zaca, C., & Borini, A. (2020). Alternative patterns of partial embryo compaction: prevalence, morphokinetic history and possible implications. *Reprod Biomed Online*, 40(3), 347-354. doi:10.1016/j.rbmo.2019.11.011
- Lagalla, C., Tarozzi, N., Sciajno, R., Wells, D., Di Santo, M., Nadalini, M., . . . Borini, A. (2017). Embryos with morphokinetic abnormalities may develop into euploid blastocysts. *Reprod Biomed Online*, 34(2), 137-146. doi:10.1016/j.rbmo.2016.11.008
- Lamas-Toranzo, I., Hamze, J. G., Bianchi, E., Fernandez-Fuertes, B., Perez-Cerezales, S., Laguna-Barraza, R., . . . Bermejo-Alvarez, P. (2020). TMEM95 is a sperm membrane protein essential for mammalian fertilization. *Elife*, 9. doi:10.7554/eLife.53913
- Lane, M., & Gardner, D. K. (1997). Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J Reprod Fertil*, 109(1), 153-164. doi:10.1530/jrf.0.1090153
- Larman, M. G., Saunders, C. M., Carroll, J., Lai, F. A., & Swann, K. (2004). Cell cycle-dependent Ca<sup>2+</sup> oscillations in mouse embryos are regulated by nuclear targeting of PLCzeta. *J Cell Sci*, 117(Pt 12), 2513-2521. doi:10.1242/jcs.01109
- Laws, S. C., Webster, J. C., & Miller, W. L. (1990). Estradiol alters the effectiveness of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in ovine pituitary cultures: GnRH receptors versus responsiveness to GnRH. *Endocrinology*, 127(1), 381-386. doi:10.1210/endo-127-1-381
- Le Bin, G. C., Munoz-Descalzo, S., Kurowski, A., Leitch, H., Lou, X., Mansfield, W., . . . Nichols, J. (2014). Oct4 is required for lineage priming in the developing inner cell mass of the mouse blastocyst. *Development*, 141(5), 1001-1010. doi:10.1242/dev.096875
- Le Naour, F., Rubinstein, E., Jasmin, C., Prenant, M., & Boucheix, C. (2000). Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science*, 287(5451), 319-321. doi:10.1126/science.287.5451.319
- Leary, C., Leese, H. J., & Sturmey, R. G. (2015). Human embryos from overweight and obese women display phenotypic and metabolic abnormalities. *Hum Reprod*, 30(1), 122-132. doi:10.1093/humrep/deu276
- Lee, C. I., Su, Y. R., Chen, C. H., Chang, T. A., Kuo, E. E., Zheng, W. L., . . . Liu, M. (2021). End-to-end deep learning for recognition of ploidy status using time-lapse videos. *J Assist Reprod Genet*, 38(7), 1655-1663. doi:10.1007/s10815-021-02228-8
- Lee, H. S., Kim, E. Y., Kim, K. H., Moon, J., Park, K. S., Kim, K. S., & Lee, K. A. (2010). Obox4 critically regulates cAMP-dependent meiotic arrest and MI-MII transition in oocytes. *FASEB J*, 24(7), 2314-2324. doi:10.1096/fj.09-147314
- Lee, J., Kitajima, T. S., Tanno, Y., Yoshida, K., Morita, T., Miyano, T., . . . Watanabe, Y. (2008). Unified mode of centromeric protection by shugoshin in mammalian oocytes and somatic cells. *Nat Cell Biol*, 10(1), 42-52. doi:10.1038/ncb1667

- Lee, K. S., Joo, B. S., Na, Y. J., Yoon, M. S., Choi, O. H., & Kim, W. W. (2001). Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. *J Assist Reprod Genet*, *18*(9), 490-498. doi:10.1023/a:1016649026353
- Lee, T.-F., Lee, R. K.-K., Hwu, Y.-M., Chih, Y.-F., Tsai, Y.-C., & Su, J.-T. (2010). Relationship of Follicular Size to the Development of Intracytoplasmic Sperm Injection-derived Human Embryos. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, *49*(3), 302-305. doi:10.1016/s1028-4559(10)60065-4
- Lee, Y., Kim, K. H., Yoon, H., Lee, O. H., Kim, E., Park, M., . . . Choi, Y. (2016). RASD1 Knockdown Results in Failure of Oocyte Maturation. *Cell Physiol Biochem*, *40*(6), 1289-1302. doi:10.1159/000453182
- Lee, Y. S., Thouas, G. A., & Gardner, D. K. (2015). Developmental kinetics of cleavage stage mouse embryos are related to their subsequent carbohydrate and amino acid utilization at the blastocyst stage. *Hum Reprod*, *30*(3), 543-552. doi:10.1093/humrep/deu334
- Leese, H. J. (2012). Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction*, *143*(4), 417-427. doi:10.1530/REP-11-0484
- Leese, H. J., Baumann, C. G., Brison, D. R., McEvoy, T. G., & Sturmey, R. G. (2008). Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Mol Hum Reprod*, *14*(12), 667-672. doi:10.1093/molehr/gan065
- Lei, Q., Li, J., Zhou, X., & Zhang, W. (2022). [Oocyte maturation arrest due to compound heterozygous variants of the PATL2 gene in a case]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, *39*(7), 759-762. doi:10.3760/cma.j.cn511374-20210316-00234
- Lemmen, J. G., Agerholm, I., & Ziebe, S. (2008). Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*, *17*(3), 385-391. doi:10.1016/s1472-6483(10)60222-2
- Leroy, J. L., Vanholder, T., Mateusen, B., Christophe, A., Opsomer, G., de Kruif, A., . . . Van Soom, A. (2005). Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction*, *130*(4), 485-495. doi:10.1530/rep.1.00735
- Levrán, D., Farhi, J., Nahum, H., Glezerman, M., & Weissman, A. (2002). Maturation arrest of human oocytes as a cause of infertility: case report. *Hum Reprod*, *17*(6), 1604-1609. doi:10.1093/humrep/17.6.1604
- Li, R., & Albertini, D. F. (2013). The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *14*(3), 141-152. doi:10.1038/nrm3531
- Li, Y. Y., Guo, L., Li, H., Li, J., Dong, F., Yi, Z. Y., . . . Han, Z. (2019). NEK5 regulates cell cycle progression during mouse oocyte maturation and preimplantation embryonic development. *Mol Reprod Dev*, *86*(9), 1189-1198. doi:10.1002/mrd.23234
- Libby, B. J., De La Fuente, R., O'Brien, M. J., Wigglesworth, K., Cobb, J., Inselman, A., . . . Schimenti, J. C. (2002). The mouse meiotic mutation mei1 disrupts chromosome synapsis with sexually dimorphic consequences for meiotic progression. *Dev Biol*, *242*(2), 174-187. doi:10.1006/dbio.2001.0535
- Liebaers, I., Desmyttere, S., Verpoest, W., De Rycke, M., Staessen, C., Sermon, K., . . . Bonduelle, M. (2010). Report on a consecutive series of 581 children born after blastomere biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod*, *25*(1), 275-282. doi:10.1093/humrep/dep298
- Lin, J., Xu, H., Chen, B., Wang, W., Wang, L., Sun, X., & Sang, Q. (2020). Expanding the genetic and phenotypic spectrum of female infertility caused by TLE6 mutations. *J Assist Reprod Genet*, *37*(2), 437-442. doi:10.1007/s10815-019-01653-0
- Lin, Y., & Page, D. C. (2005). Dazl deficiency leads to embryonic arrest of germ cell development in XY C57BL/6 mice. *Dev Biol*, *288*(2), 309-316. doi:10.1016/j.ydbio.2005.06.032
- Lincoln, A. J., Wickramasinghe, D., Stein, P., Schultz, R. M., Palko, M. E., De Miguel, M. P., . . . Donovan, P. J. (2002). Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nat Genet*, *30*(4), 446-449. doi:10.1038/ng856

- Linke, M., May, A., Reifenberg, K., Haaf, T., & Zechner, U. (2013). The impact of ovarian stimulation on the expression of candidate reprogramming genes in mouse preimplantation embryos. *Cytogenet Genome Res*, *139*(2), 71-79. doi:10.1159/000343755
- Litscher, E. S., & Wassarman, P. M. (2020). Zona Pellucida Proteins, Fibrils, and Matrix. *Annu Rev Biochem*, *89*, 695-715. doi:10.1146/annurev-biochem-011520-105310
- Liu, H. C., He, Z. Y., Mele, C. A., Veeck, L. L., Davis, O. K., & Rosenwaks, Z. (1997). Expression of IGFs and their receptors is a potential marker for embryo quality. *Am J Reprod Immunol*, *38*(4), 237-245. doi:10.1111/j.1600-0897.1997.tb00509.x
- Liu, Q., Zhang, J., Wen, H., Feng, Y., Zhang, X., Xiang, H., . . . Xue, Z. (2018). Analyzing the Transcriptome Profile of Human Cumulus Cells Related to Embryo Quality via RNA Sequencing. *Biomed Res Int*, *2018*, 9846274. doi:10.1155/2018/9846274
- Liu, T., Huang, Y., & Lin, H. (2021). Estrogen disorders: Interpreting the abnormal regulation of aromatase in granulosa cells (Review). *Int J Mol Med*, *47*(5). doi:10.3892/ijmm.2021.4906
- Liu, Z., Xi, Q., Zhu, L., Yang, X., Jin, L., Wang, J., . . . Zhang, X. (2021). TUBB8 Mutations Cause Female Infertility with Large Polar Body Oocyte and Fertilization Failure. *Reprod Sci*, *28*(10), 2942-2950. doi:10.1007/s43032-021-00633-z
- Loeuillet, C., Dhellemmes, M., Cazin, C., Kherraf, Z. E., Fourati Ben Mustapha, S., Zouari, R., . . . Ray, P. F. (2022). A recurrent ZP1 variant is responsible for oocyte maturation defect with degenerated oocytes in infertile females. *Clin Genet*, *102*(1), 22-29. doi:10.1111/cge.14144
- Lopes, A. S., Greve, T., & Callesen, H. (2007). Quantification of embryo quality by respirometry. *Theriogenology*, *67*(1), 21-31. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.09.026
- Lopes, A. S., Madsen, S. E., Ramsing, N. B., Lovendahl, P., Greve, T., & Callesen, H. (2007). Investigation of respiration of individual bovine embryos produced in vivo and in vitro and correlation with viability following transfer. *Hum Reprod*, *22*(2), 558-566. doi:10.1093/humrep/del404
- Loutradis, D., Drakakis, P., Kallianidis, K., Milingos, S., Dendrinis, S., & Michalas, S. (1999). Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, *72*(2), 240-244. doi:10.1016/s0015-0282(99)00233-2
- Lund, E., Liu, M., Hartley, R. S., Sheets, M. D., & Dahlberg, J. E. (2009). Deadenylation of maternal mRNAs mediated by miR-427 in *Xenopus laevis* embryos. *RNA*, *15*(12), 2351-2363. doi:10.1261/rna.1882009
- Luo, S. M., Ge, Z. J., Wang, Z. W., Jiang, Z. Z., Wang, Z. B., Ouyang, Y. C., . . . Sun, Q. Y. (2013). Unique insights into maternal mitochondrial inheritance in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(32), 13038-13043. doi:10.1073/pnas.1303231110
- Luo, W., Gumen, A., Haughian, J. M., & Wiltbank, M. C. (2011). The role of luteinizing hormone in regulating gene expression during selection of a dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*, *84*(2), 369-378. doi:10.1095/biolreprod.110.085274
- Luong, X., & Conti, M. (2019). RNA Binding Protein Networks and Translational Regulation in Oocytes. In (pp. 193-220).
- Lydon, J. P., DeMayo, F. J., Funk, C. R., Mani, S. K., Hughes, A. R., Montgomery, C. A., Jr., . . . O'Malley, B. W. (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev*, *9*(18), 2266-2278. doi:10.1101/gad.9.18.2266
- Machaty, Z., Miller, A. R., & Zhang, L. (2017). Egg Activation at Fertilization. *Adv Exp Med Biol*, *953*, 1-47. doi:10.1007/978-3-319-46095-6\_1
- Madaschi, C., Aoki, T., de Almeida Ferreira Braga, D. P., de Cássia Sávio Figueira, R., Francisco, L. S., Iaconelli, A., & Borges, E. (2009). Zona pellucida birefringence score and meiotic spindle visualization in relation to embryo development and ICSI outcomes. *Reproductive BioMedicine Online*, *18*(5), 681-686. doi:10.1016/s1472-6483(10)60014-4
- Maddirevula, S., Coskun, S., Alhassan, S., Elnour, A., Alsaif, H. S., Ibrahim, N., . . . Alkuraya, F. S. (2017). Female Infertility Caused by Mutations in the Oocyte-Specific Translational Repressor PATL2. *Am J Hum Genet*, *101*(4), 603-608. doi:10.1016/j.ajhg.2017.08.009
- Mahajan, V. S., Demissie, E., Mattoo, H., Viswanadham, V., Varki, A., Morris, R., & Pillai, S. (2016). Striking Immune Phenotypes in Gene-Targeted Mice Are Driven by a Copy-Number Variant

- Originating from a Commercially Available C57BL/6 Strain. *Cell Rep*, 15(9), 1901-1909. doi:10.1016/j.celrep.2016.04.080
- Malcuit, C., Kurokawa, M., & Fissore, R. A. (2006). Calcium oscillations and mammalian egg activation. *J Cell Physiol*, 206(3), 565-573. doi:10.1002/jcp.20471
- Mansouri, M. R., Schuster, J., Badhai, J., Stattin, E. L., Losel, R., Wehling, M., . . . Dahl, N. (2008). Alterations in the expression, structure and function of progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) in premature ovarian failure. *Hum Mol Genet*, 17(23), 3776-3783. doi:10.1093/hmg/ddn274
- Marangos, P., Verschuren, E. W., Chen, R., Jackson, P. K., & Carroll, J. (2007). Prophase I arrest and progression to metaphase I in mouse oocytes are controlled by Emi1-dependent regulation of APC(Cdh1). *J Cell Biol*, 176(1), 65-75. doi:10.1083/jcb.200607070
- Marcos, J., Perez-Albala, S., Mifsud, A., Molla, M., Landeras, J., & Meseguer, M. (2015). Collapse of blastocysts is strongly related to lower implantation success: a time-lapse study. *Hum Reprod*, 30(11), 2501-2508. doi:10.1093/humrep/dev216
- Marnef, A., Maldonado, M., Bugaut, A., Balasubramanian, S., Kress, M., Weil, D., & Standart, N. (2010). Distinct functions of maternal and somatic Pat1 protein paralogs. *RNA*, 16(11), 2094-2107. doi:10.1261/rna.2295410
- Marnef, A., & Standart, N. (2010). Pat1 proteins: a life in translation, translation repression and mRNA decay. *Biochem Soc Trans*, 38(6), 1602-1607. doi:10.1042/BST0381602
- Marnef, A., Weil, D., & Standart, N. (2012). RNA-related nuclear functions of human Pat1b, the P-body mRNA decay factor. *Mol Biol Cell*, 23(1), 213-224. doi:10.1091/mbc.E11-05-0415
- Martinez-Rodero, I., Salas-Huetos, A., Ordonez-Leon, A., Hidalgo, C. O., Yeste, M., Mercade, E., & Mogas, T. (2022). Cryoprotectant role of exopolysaccharide ID1 in the vitrification/in-straw warming of in vitro-produced bovine embryos. *Reprod Domest Anim*, 57 Suppl 5(Suppl 5), 53-57. doi:10.1111/rda.14191
- Martinez, G. (2016). *Recherche et développement de biomolécules permettant l'amélioration des biotechnologies de la reproduction chez le bovin*. Available from <http://www.theses.fr/2016GREAV055>
- Martinez, G., Coutton, C., Loeuillet, C., Cazin, C., Muronova, J., Boguenet, M., . . . Arnoult, C. (2022). Oligogenic heterozygous inheritance of sperm abnormalities in mouse. *Elife*, 11. doi:10.7554/eLife.75373
- Masciarelli, S., Horner, K., Liu, C., Park, S. H., Hinckley, M., Hockman, S., . . . Manganiello, V. (2004). Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. *J Clin Invest*, 114(2), 196-205. doi:10.1172/JCI21804
- Mateizel, I., Van Landuyt, L., Tournaye, H., & Verheyen, G. (2013). Deliveries of normal healthy babies from embryos originating from oocytes showing the presence of smooth endoplasmic reticulum aggregates. *Hum Reprod*, 28(8), 2111-2117. doi:10.1093/humrep/det241
- Matsumoto, K., Kwon, O. Y., Kim, H., & Akao, Y. (2005). Expression of rck/p54, a DEAD-box RNA helicase, in gametogenesis and early embryogenesis of mice. *Dev Dyn*, 233(3), 1149-1156. doi:10.1002/dvdy.20429
- Matsumoto, K., Meric, F., & Wolffe, A. P. (1996). Translational repression dependent on the interaction of the Xenopus Y-box protein FRGY2 with mRNA. Role of the cold shock domain, tail domain, and selective RNA sequence recognition. *J Biol Chem*, 271(37), 22706-22712. doi:10.1074/jbc.271.37.22706
- Matsumoto, L., Hirota, Y., Saito-Fujita, T., Takeda, N., Tanaka, T., Hiraoka, T., . . . Osuga, Y. (2018). HIF2alpha in the uterine stroma permits embryo invasion and luminal epithelium detachment. *J Clin Invest*, 128(7), 3186-3197. doi:10.1172/JCI98931
- May-Panloup, P., Boguenet, M., Hachem, H. E., Bouet, P. E., & Reynier, P. (2021). Embryo and Its Mitochondria. *Antioxidants (Basel)*, 10(2). doi:10.3390/antiox10020139
- May-Panloup, P., Chretien, M. F., Jacques, C., Vasseur, C., Malthiery, Y., & Reynier, P. (2005). Low oocyte mitochondrial DNA content in ovarian insufficiency. *Hum Reprod*, 20(3), 593-597. doi:10.1093/humrep/deh667

- Mbarek, H., Steinberg, S., Nyholt, D. R., Gordon, S. D., Miller, M. B., McRae, A. F., . . . Boomsma, D. I. (2016). Identification of Common Genetic Variants Influencing Spontaneous Dizygotic Twinning and Female Fertility. *Am J Hum Genet*, *98*(5), 898-908. doi:10.1016/j.ajhg.2016.03.008
- McCallie, B., Schoolcraft, W. B., & Katz-Jaffe, M. G. (2010). Aberration of blastocyst microRNA expression is associated with human infertility. *Fertil Steril*, *93*(7), 2374-2382. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.01.069
- McGee, E. A., & Hsueh, A. J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*, *21*(2), 200-214. doi:10.1210/edrv.21.2.0394
- McKenzie, L. J., Pangas, S. A., Carson, S. A., Kovanci, E., Cisneros, P., Buster, J. E., . . . Matzuk, M. M. (2004). Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod*, *19*(12), 2869-2874. doi:10.1093/humrep/deh535
- McNatty, K. P., Lun, S., Heath, D. A., Ball, K., Smith, P., Hudson, N. L., . . . Henderson, K. M. (1986). Differences in ovarian activity between booroola X merino ewes which were homozygous, heterozygous and non-carriers of a major gene influencing their ovulation rate. *J Reprod Fertil*, *77*(1), 193-205. doi:10.1530/jrf.0.0770193
- Medvedev, S., Pan, H., & Schultz, R. M. (2011). Absence of MSY2 in mouse oocytes perturbs oocyte growth and maturation, RNA stability, and the transcriptome. *Biol Reprod*, *85*(3), 575-583. doi:10.1095/biolreprod.111.091710
- Medvedev, S., Yang, J., Hecht, N. B., & Schultz, R. M. (2008). CDC2A (CDK1)-mediated phosphorylation of MSY2 triggers maternal mRNA degradation during mouse oocyte maturation. *Dev Biol*, *321*(1), 205-215. doi:10.1016/j.ydbio.2008.06.016
- Mehlmann, L. M., Mikoshiba, K., & Kline, D. (1996). Redistribution and increase in cortical inositol 1,4,5-trisphosphate receptors after meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol*, *180*(2), 489-498. doi:10.1006/dbio.1996.0322
- Mehlmann, L. M., Terasaki, M., Jaffe, L. A., & Kline, D. (1995). Reorganization of the endoplasmic reticulum during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol*, *170*(2), 607-615. doi:10.1006/dbio.1995.1240
- Mehri, S., Levi Setti, P. E., Greco, K., Sakkas, D., Martinez, G., & Patrizio, P. (2014). Correlation between follicular diameters and flushing versus no flushing on oocyte maturity, fertilization rate and embryo quality. *J Assist Reprod Genet*, *31*(1), 73-77. doi:10.1007/s10815-013-0124-9
- Mekada, K., & Yoshiki, A. (2021). Substrains matter in phenotyping of C57BL/6 mice. *Exp Anim*, *70*(2), 145-160. doi:10.1538/expanim.20-0158
- Mendez, R., & Richter, J. D. (2001). Translational control by CPEB: a means to the end. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *2*(7), 521-529. doi:10.1038/35080081
- Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., Hilligsoe, K. M., Ramsing, N. B., & Remohi, J. (2011). The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod*, *26*(10), 2658-2671. doi:10.1093/humrep/der256
- Messinis, I. E., Messini, C. I., & Dafopoulos, K. (2014). Novel aspects of the endocrinology of the menstrual cycle. *Reprod Biomed Online*, *28*(6), 714-722. doi:10.1016/j.rbmo.2014.02.003
- Metwalley, A., Brasha, N., Esteves, S. C., Fawzy, M., Brasha, H., Hellani, A., . . . Khamiss, O. (2020). Role of diagnostic intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in the management of genetically determined zona pellucida-free oocytes during in vitro fertilization: a case report. *Zygote*, *28*(6), 519-523. doi:10.1017/S0967199420000441
- Miao, Y., Ma, S., Liu, X., Miao, D., Chang, Z., Luo, M., & Tan, J. (2004). Fate of the first polar bodies in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev*, *69*(1), 66-76. doi:10.1002/mrd.20148
- Mihm, M., Baker, P. J., Ireland, J. L., Smith, G. W., Coussens, P. M., Evans, A. C., & Ireland, J. J. (2006). Molecular evidence that growth of dominant follicles involves a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in luteinizing hormone dependence in cattle. *Biol Reprod*, *74*(6), 1051-1059. doi:10.1095/biolreprod.105.045799

- Mihm, M., Gangooly, S., & Muttukrishna, S. (2011). The normal menstrual cycle in women. *Anim Reprod Sci*, 124(3-4), 229-236. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.08.030
- Mikwar, M., MacFarlane, A. J., & Marchetti, F. (2020). Mechanisms of oocyte aneuploidy associated with advanced maternal age. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 785, 108320. doi:10.1016/j.mrrev.2020.108320
- Milewski, R., & Ajduk, A. (2017). Time-lapse imaging of cleavage divisions in embryo quality assessment. *Reproduction*, 154(2), R37-R53. doi:10.1530/REP-17-0004
- Milewski, R., Szpila, M., & Ajduk, A. (2018). Dynamics of cytoplasm and cleavage divisions correlates with preimplantation embryo development. *Reproduction*, 155(1), 1-14. doi:10.1530/REP-17-0230
- Miller, B. H., & Takahashi, J. S. (2013). Central circadian control of female reproductive function. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 4, 195. doi:10.3389/fendo.2013.00195
- Minasi, M. G., Colasante, A., Riccio, T., Ruberti, A., Casciani, V., Scarselli, F., . . . Greco, E. (2016). Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: a consecutive case series study. *Hum Reprod*, 31(10), 2245-2254. doi:10.1093/humrep/dew183
- Minshall, N., Reiter, M. H., Weil, D., & Standart, N. (2007). CPEB Interacts with an Ovary-specific eIF4E and 4E-T in Early Xenopus Oocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 282(52), 37389-37401. doi:10.1074/jbc.M704629200
- Mlyczynska, E., Kiezun, M., Kurowska, P., Dawid, M., Pich, K., Respekta, N., . . . Rak, A. (2022). New Aspects of Corpus Luteum Regulation in Physiological and Pathological Conditions: Involvement of Adipokines and Neuropeptides. *Cells*, 11(6). doi:10.3390/cells11060957
- Mogessie, B., Scheffler, K., & Schuh, M. (2018). Assembly and Positioning of the Oocyte Meiotic Spindle. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 34, 381-403. doi:10.1146/annurev-cellbio-100616-060553
- Mohr-Sasson, A., Orvieto, R., Blumenfeld, S., Axelrod, M., Mor-Hadar, D., Grin, L., . . . Haas, J. (2020). The association between follicle size and oocyte development as a function of final follicular maturation triggering. *Reprod Biomed Online*, 40(6), 887-893. doi:10.1016/j.rbmo.2020.02.005
- Montag, M., Koster, M., van der Ven, K., & van der Ven, H. (2011). Gamete competence assessment by polarizing optics in assisted reproduction. *Hum Reprod Update*, 17(5), 654-666. doi:10.1093/humupd/dmr016
- Montag, M., Schimming, T., Köster, M., Zhou, C., Dorn, C., Rösing, B., . . . van der Ven, K. (2008). Oocyte zona birefringence intensity is associated with embryonic implantation potential in ICSI cycles. *Reproductive BioMedicine Online*, 16(2), 239-244. doi:10.1016/s1472-6483(10)60580-9
- Montag, M., & van der Ven, H. (2008). Oocyte assessment and embryo viability prediction: birefringence imaging. *Reproductive BioMedicine Online*, 17(4), 454-460. doi:10.1016/s1472-6483(10)60231-3
- Moon, J. H., Hyun, C. S., Lee, S. W., Son, W. Y., Yoon, S. H., & Lim, J. H. (2003). Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the Polscope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI. *Hum Reprod*, 18(4), 817-820. doi:10.1093/humrep/deg165
- Moos, J., Visconti, P. E., Moore, G. D., Schultz, R. M., & Kopf, G. S. (1995). Potential role of mitogen-activated protein kinase in pronuclear envelope assembly and disassembly following fertilization of mouse eggs. *Biol Reprod*, 53(3), 692-699. doi:10.1095/biolreprod53.3.692
- Moreira, P. N., Fernandez-Gonzalez, R., Ramirez, M. A., Perez-Crespo, M., Rizos, D., Pintado, B., & Gutierrez-Adan, A. (2006). Differential effects of culture and nuclear transfer on relative transcript levels of genes with key roles during preimplantation. *Zygote*, 14(1), 81-87. doi:10.1017/S0967199406003595
- Moreno, R. D., Schatten, G., & Ramalho-Santos, J. (2002). Golgi apparatus dynamics during mouse oocyte in vitro maturation: effect of the membrane trafficking inhibitor brefeldin A. *Biol Reprod*, 66(5), 1259-1266. doi:10.1095/biolreprod66.5.1259

- Mori, M., Otoi, T., & Suzuki, T. (2002). Correlation between the cell number and diameter in bovine embryos produced in vitro. *Reprod Domest Anim*, 37(3), 181-184. doi:10.1046/j.1439-0531.2002.00354.x
- Motta, P. M., Nottola, S. A., Makabe, S., & Heyn, R. (2000). Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Hum Reprod*, 15 Suppl 2, 129-147. doi:10.1093/humrep/15.suppl\_2.129
- Moulton, J. D. (2017). Using Morpholinos to Control Gene Expression. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*, 68(1), 4 30 31-34 30 29. doi:10.1002/cpnc.21
- Moya-Ramirez, I., Bouton, C., Kontoravdi, C., & Polizzi, K. (2020). High resolution biosensor to test the capping level and integrity of mRNAs. *Nucleic Acids Res*, 48(22), e129. doi:10.1093/nar/gkaa955
- Mu, J., Wang, W., Chen, B., Wu, L., Li, B., Mao, X., . . . Wang, L. (2019). Mutations in NLRP2 and NLRP5 cause female infertility characterised by early embryonic arrest. *J Med Genet*, 56(7), 471-480. doi:10.1136/jmedgenet-2018-105936
- Musacchio, A., & Salmon, E. D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(5), 379-393. doi:10.1038/nrm2163
- Nakamura, M., Minegishi, T., Hasegawa, Y., Nakamura, K., Igarashi, S., Ito, I., . . . Ibuki, Y. (1993). Effect of an activin A on follicle-stimulating hormone (FSH) receptor messenger ribonucleic acid levels and FSH receptor expressions in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, 133(2), 538-544. doi:10.1210/endo.133.2.8393766
- Nakamura, Y., Tanaka, K. J., Miyauchi, M., Huang, L., Tsujimoto, M., & Matsumoto, K. (2010). Translational repression by the oocyte-specific protein P100 in *Xenopus*. *Dev Biol*, 344(1), 272-283. doi:10.1016/j.ydbio.2010.05.006
- Natraj, U., & Richards, J. S. (1993). Hormonal regulation, localization, and functional activity of the progesterone receptor in granulosa cells of rat preovulatory follicles. *Endocrinology*, 133(2), 761-769. doi:10.1210/endo.133.2.8344215
- Navarro, P. A., de Araujo, M. M., de Araujo, C. M., Rocha, M., dos Reis, R., & Martins, W. (2009). Relationship between first polar body morphology before intracytoplasmic sperm injection and fertilization rate, cleavage rate, and embryo quality. *Int J Gynaecol Obstet*, 104(3), 226-229. doi:10.1016/j.ijgo.2008.11.008
- Nemoto, S., Kubota, T., & Ohno, H. (2022). Metabolic differences and differentially expressed genes between C57BL/6J and C57BL/6N mice substrains. *PLoS One*, 17(12), e0271651. doi:10.1371/journal.pone.0271651
- Niimura, S. (2003). Time-lapse videomicrographic analyses of contractions in mouse blastocysts. *J Reprod Dev*, 49(6), 413-423. doi:10.1262/jrd.49.413
- Niswender, G. D. (2002). Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction*, 123(3), 333-339. doi:10.1530/rep.0.1230333
- Niswender, G. D., Davis, T. L., Griffith, R. J., Bogan, R. L., Monser, K., Bott, R. C., . . . Nett, T. M. (2007). Judge, jury and executioner: the auto-regulation of luteal function. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 64, 191-206. doi:10.5661/rdr-vi-191
- Niu, H., Lei, A., Tian, H., Yao, W., Liu, Y., Li, C., . . . Luo, J. (2023). Scd1 Deficiency in Early Embryos Affects Blastocyst ICM Formation through RPs-Mdm2-p53 Pathway. *Int J Mol Sci*, 24(2). doi:10.3390/ijms24021750
- Noda, T., Lu, Y., Fujihara, Y., Oura, S., Koyano, T., Kobayashi, S., . . . Ikawa, M. (2020). Sperm proteins SOF1, TMEM95, and SPACA6 are required for sperm-oocyte fusion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(21), 11493-11502. doi:10.1073/pnas.1922650117
- Nolfi-Donagan, D., Braganza, A., & Shiva, S. (2020). Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biol*, 37, 101674. doi:10.1016/j.redox.2020.101674
- Norris, R. P., Ratzan, W. J., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Krall, J., Movsesian, M. A., . . . Jaffe, L. A. (2009). Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*, 136(11), 1869-1878. doi:10.1242/dev.035238

- Ogino, M., Tsubamoto, H., Sakata, K., Oohama, N., Hayakawa, H., Kojima, T., . . . Shibahara, H. (2016). Mitochondrial DNA copy number in cumulus cells is a strong predictor of obtaining good-quality embryos after IVF. *J Assist Reprod Genet*, *33*(3), 367-371. doi:10.1007/s10815-015-0621-0
- Oh, J. S., Han, S. J., & Conti, M. (2010). Wee1B, Myt1, and Cdc25 function in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption. *J Cell Biol*, *188*(2), 199-207. doi:10.1083/jcb.200907161
- Oh, J. S., Susor, A., & Conti, M. (2011). Protein tyrosine kinase Wee1B is essential for metaphase II exit in mouse oocytes. *Science*, *332*(6028), 462-465. doi:10.1126/science.1199211
- Okabe, M. (2018). Sperm-egg interaction and fertilization: past, present, and future. *Biol Reprod*, *99*(1), 134-146. doi:10.1093/biolre/i0y028
- Oktem, O., & Urman, B. (2010). Understanding follicle growth in vivo. *Hum Reprod*, *25*(12), 2944-2954. doi:10.1093/humrep/deq275
- Otsuki, J., Nagai, Y., & Chiba, K. (2007). Lipofuscin bodies in human oocytes as an indicator of oocyte quality. *J Assist Reprod Genet*, *24*(7), 263-270. doi:10.1007/s10815-007-9130-0
- Otsuki, J., Okada, A., Morimoto, K., Nagai, Y., & Kubo, H. (2004). The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes. *Hum Reprod*, *19*(7), 1591-1597. doi:10.1093/humrep/deh258
- Ottosen, L. D., Hindkjaer, J., Lindenberg, S., & Ingerslev, H. J. (2007). Murine pre-embryo oxygen consumption and developmental competence. *J Assist Reprod Genet*, *24*(8), 359-365. doi:10.1007/s10815-007-9138-5
- Ozgur, S., Basquin, J., Kamenska, A., Filipowicz, W., Standart, N., & Conti, E. (2015). Structure of a Human 4E-T/DDX6/CNOT1 Complex Reveals the Different Interplay of DDX6-Binding Proteins with the CCR4-NOT Complex. *Cell Rep*, *13*(4), 703-711. doi:10.1016/j.celrep.2015.09.033
- Ozgur, S., Chekulaeva, M., & Stoecklin, G. (2010). Human Pat1b connects deadenylation with mRNA decapping and controls the assembly of processing bodies. *Mol Cell Biol*, *30*(17), 4308-4323. doi:10.1128/MCB.00429-10
- Ozgur, S., & Stoecklin, G. (2013). Role of Rck-Pat1b binding in assembly of processing-bodies. *RNA Biol*, *10*(4), 528-539. doi:10.4161/rna.24086
- Ozil, J. P., Banrezes, B., Toth, S., Pan, H., & Schultz, R. M. (2006). Ca<sup>2+</sup> oscillatory pattern in fertilized mouse eggs affects gene expression and development to term. *Dev Biol*, *300*(2), 534-544. doi:10.1016/j.ydbio.2006.08.041
- Ozil, J. P., & Huneau, D. (2001). Activation of rabbit oocytes: the impact of the Ca<sup>2+</sup> signal regime on development. *Development*, *128*(6), 917-928. doi:10.1242/dev.128.6.917
- Ozturk, S. (2020). Selection of competent oocytes by morphological criteria for assisted reproductive technologies. *Mol Reprod Dev*, *87*(10), 1021-1036. doi:10.1002/mrd.23420
- Ozturk, S., Yaba-Ucar, A., Sozen, B., Mutlu, D., & Demir, N. (2016). Superovulation alters embryonic poly(A)-binding protein (Epab) and poly(A)-binding protein, cytoplasmic 1 (Pabpc1) gene expression in mouse oocytes and early embryos. *Reprod Fertil Dev*, *28*(3), 375-383. doi:10.1071/RD14106
- Padmanabhan, K., & Richter, J. D. (2006). Regulated Pumilio-2 binding controls RINGO/Spy mRNA translation and CPEB activation. *Genes Dev*, *20*(2), 199-209. doi:10.1101/gad.1383106
- Palermo, R. (2007). Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. *Reproductive BioMedicine Online*, *15*(3), 326-337. doi:10.1016/s1472-6483(10)60347-1
- Pan, H., Ma, P., Zhu, W., & Schultz, R. M. (2008). Age-associated increase in aneuploidy and changes in gene expression in mouse eggs. *Dev Biol*, *316*(2), 397-407. doi:10.1016/j.ydbio.2008.01.048
- Park, J. Y., Su, Y. Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S. L., & Conti, M. (2004). EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*, *303*(5658), 682-684. doi:10.1126/science.1092463
- Park, S. Y., Kim, E. Y., Cui, X. S., Tae, J. C., Lee, W. D., Kim, N. H., . . . Lim, J. H. (2006). Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. *Zygote*, *14*(2), 125-131. doi:10.1017/S0967199406003649

- Park, S. Y., Kim, E. Y., Jeon, K., Cui, X. S., Lee, W. D., Kim, N. H., . . . Lim, J. H. (2007). Survivin acts as anti-apoptotic factor during the development of bovine pre-implantation embryos. *Mol Reprod Dev*, *74*(5), 582-590. doi:10.1002/mrd.20641
- Payne, D., Flaherty, S. P., Barry, M. F., & Matthews, C. D. (1997). Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod*, *12*(3), 532-541. doi:10.1093/humrep/12.3.532
- Paynton, B. V., Rempel, R., & Bachvarova, R. (1988). Changes in state of adenylation and time course of degradation of maternal mRNAs during oocyte maturation and early embryonic development in the mouse. *Dev Biol*, *129*(2), 304-314. doi:10.1016/0012-1606(88)90377-6
- Pelletier, C., Keefe, D. L., & Trimarchi, J. R. (2004). Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. *Fertil Steril*, *81 Suppl 1*, 850-856. doi:10.1016/j.fertnstert.2003.09.033
- Perry, A. C. F., Asami, M., Lam, B. Y. H., & Yeo, G. S. H. (2022). The initiation of mammalian embryonic transcription: to begin at the beginning. *Trends Cell Biol*. doi:10.1016/j.tcb.2022.08.008
- Pierre, W., Herve, L., Paviolo, C., Mandula, O., Remondiere, V., Morales, S., . . . Allier, C. (2022). 3D time-lapse imaging of a mouse embryo using intensity diffraction tomography embedded inside a deep learning framework. *Appl Opt*, *61*(12), 3337-3348. doi:10.1364/AO.453910
- Piko, L., & Clegg, K. B. (1982). Quantitative changes in total RNA, total poly(A), and ribosomes in early mouse embryos. *Dev Biol*, *89*(2), 362-378. doi:10.1016/0012-1606(82)90325-6
- Putnam, C. D., Brann, D. W., Kolbeck, R. C., & Mahesh, V. B. (1991). Inhibition of uterine contractility by progesterone and progesterone metabolites: mediation by progesterone and gamma amino butyric acidA receptor systems. *Biol Reprod*, *45*(2), 266-272. doi:10.1095/biolreprod45.2.266
- Raju, G. A. R., Prakash, G. J., Krishna, K. M., & Madan, K. (2007). Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging. *Reproductive BioMedicine Online*, *14*(2), 166-174. doi:10.1016/s1472-6483(10)60784-5
- Rankin, T., Familari, M., Lee, E., Ginsberg, A., Dwyer, N., Blanchette-Mackie, J., . . . Dean, J. (1996). Mice homozygous for an insertional mutation in the Zp3 gene lack a zona pellucida and are infertile. *Development*, *122*(9), 2903-2910. doi:10.1242/dev.122.9.2903
- Rankin, T., Talbot, P., Lee, E., & Dean, J. (1999). Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development*, *126*(17), 3847-3855. doi:10.1242/dev.126.17.3847
- Rankin, T. L., O'Brien, M., Lee, E., Wigglesworth, K., Eppig, J., & Dean, J. (2001). Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development*, *128*(7), 1119-1126. doi:10.1242/dev.128.7.1119
- Rapport sur les causes d'infertilité. (2022). Retrieved from [https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/rapport\\_sur\\_les\\_causes\\_d\\_infertilite.pdf](https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/rapport_sur_les_causes_d_infertilite.pdf)
- Raviv, S., Hantisteanu, S., Sharon, S. M., Atzmon, Y., Michaeli, M., & Shalom-Paz, E. (2020). Lipid droplets in granulosa cells are correlated with reduced pregnancy rates. *J Ovarian Res*, *13*(1), 4. doi:10.1186/s13048-019-0606-1
- Reddy, P., Shen, L., Ren, C., Boman, K., Lundin, E., Ottander, U., . . . Liu, K. (2005). Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Dev Biol*, *281*(2), 160-170. doi:10.1016/j.ydbio.2005.02.013
- Reich, A., Klatsky, P., Carson, S., & Wessel, G. (2011). The transcriptome of a human polar body accurately reflects its sibling oocyte. *J Biol Chem*, *286*(47), 40743-40749. doi:10.1074/jbc.M111.289868
- Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Hodges, C. A., Hunt, P. A., Liebe, B., . . . Jessberger, R. (2004). Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat Cell Biol*, *6*(6), 555-562. doi:10.1038/ncb1135
- Reyes, J. M., & Ross, P. J. (2016). Cytoplasmic polyadenylation in mammalian oocyte maturation. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, *7*(1), 71-89. doi:10.1002/wrna.1316

- Reynier, P., May-Panloup, P., Chretien, M. F., Morgan, C. J., Jean, M., Savagner, F., . . . Malthiery, Y. (2001). Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol Hum Reprod*, 7(5), 425-429. doi:10.1093/molehr/7.5.425
- Richards, J. S., & Ascoli, M. (2018). Endocrine, Paracrine, and Autocrine Signaling Pathways That Regulate Ovulation. *Trends Endocrinol Metab*, 29(5), 313-325. doi:10.1016/j.tem.2018.02.012
- Richter, J. D. (2007). CPEB: a life in translation. *Trends Biochem Sci*, 32(6), 279-285. doi:10.1016/j.tibs.2007.04.004
- Rienzi, L., Ubaldi, F., Martinez, F., Iacobelli, M., Minasi, M. G., Ferrero, S., . . . Greco, E. (2003). Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte developmental potential after ICSI. *Hum Reprod*, 18(6), 1289-1293. doi:10.1093/humrep/deg274
- Rienzi, L., Vajta, G., & Ubaldi, F. (2011). Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Hum Reprod Update*, 17(1), 34-45. doi:10.1093/humupd/dmq029
- Rimon-Dahari, N., Yerushalmi-Heinemann, L., Alyagor, L., & Dekel, N. (2016). Ovarian Folliculogenesis. *Results Probl Cell Differ*, 58, 167-190. doi:10.1007/978-3-319-31973-5\_7
- Robbins, M., Judge, A., & MacLachlan, I. (2009). siRNA and innate immunity. *Oligonucleotides*, 19(2), 89-102. doi:10.1089/oli.2009.0180
- Robinson, J. W., Zhang, M., Shuhaibar, L. C., Norris, R. P., Geerts, A., Wunder, F., . . . Jaffe, L. A. (2012). Luteinizing hormone reduces the activity of the NPR2 guanylyl cyclase in mouse ovarian follicles, contributing to the cyclic GMP decrease that promotes resumption of meiosis in oocytes. *Dev Biol*, 366(2), 308-316. doi:10.1016/j.ydbio.2012.04.019
- Robker, R. L., Russell, D. L., Espey, L. L., Lydon, J. P., O'Malley, B. W., & Richards, J. S. (2000). Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(9), 4689-4694. doi:10.1073/pnas.080073497
- Rodgaard, T., Heegaard, P. M., & Callesen, H. (2015). Non-invasive assessment of in-vitro embryo quality to improve transfer success. *Reprod Biomed Online*, 31(5), 585-592. doi:10.1016/j.rbmo.2015.08.003
- Rogers, N. T., Halet, G., Piao, Y., Carroll, J., Ko, M. S., & Swann, K. (2006). The absence of a Ca<sup>2+</sup> signal during mouse egg activation can affect parthenogenetic preimplantation development, gene expression patterns, and blastocyst quality. *Reproduction*, 132(1), 45-57. doi:10.1530/rep.1.01059
- Rojas, J., Hinostroza, F., Vergara, S., Pinto-Borguero, I., Aguilera, F., Fuentes, R., & Carvacho, I. (2021). Knockin' on Egg's Door: Maternal Control of Egg Activation That Influences Cortical Granule Exocytosis in Animal Species. *Front Cell Dev Biol*, 9, 704867. doi:10.3389/fcell.2021.704867
- Rosen, M. P., Shen, S., Dobson, A. T., Rinaudo, P. F., McCulloch, C. E., & Cedars, M. I. (2008). A quantitative assessment of follicle size on oocyte developmental competence. *Fertil Steril*, 90(3), 684-690. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.02.011
- Rosenbusch, B., Schneider, M., Glaser, B., & Brucker, C. (2002). Cytogenetic analysis of giant oocytes and zygotes to assess their relevance for the development of digynic triploidy. *Hum Reprod*, 17(9), 2388-2393. doi:10.1093/humrep/17.9.2388
- Rostami, T., Fathi, F., Assadollahi, V., Hosseini, J., Khadem Erfan, M. B., Rashidi, A., . . . Alasvand, M. (2021). Effect of cyanocobalamin on oocyte maturation, in vitro fertilization, and embryo development in mice. *Zygote*, 29(2), 161-168. doi:10.1017/S0967199420000635
- Rubinstein, E., Ziyat, A., Prenant, M., Wrobel, E., Wolf, J. P., Levy, S., . . . Boucheix, C. (2006). Reduced fertility of female mice lacking CD81. *Dev Biol*, 290(2), 351-358. doi:10.1016/j.ydbio.2005.11.031
- Rubio, I., Kuhlmann, R., Agerholm, I., Kirk, J., Herrero, J., Escribá, M.-J., . . . Meseguer, M. (2012). Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertility and Sterility*, 98(6), 1458-1463. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.07.1135

- Runge, K. E., Evans, J. E., He, Z. Y., Gupta, S., McDonald, K. L., Stahlberg, H., . . . Myles, D. G. (2007). Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution. *Dev Biol*, *304*(1), 317-325. doi:10.1016/j.ydbio.2006.12.041
- Russell, D. L., & Robker, R. L. (2007). Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update*, *13*(3), 289-312. doi:10.1093/humupd/dml062
- Sa, R., Cunha, M., Silva, J., Luis, A., Oliveira, C., Teixeira da Silva, J., . . . Sousa, M. (2011). Ultrastructure of tubular smooth endoplasmic reticulum aggregates in human metaphase II oocytes and clinical implications. *Fertil Steril*, *96*(1), 143-149 e147. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.04.088
- Saint-Dizier, M., Chastant-Maillard, S., & Chemineau, P. (2014). *La reproduction animale et humaine* (S.-D. Marie & C.-M. Sylvie Eds.). Versailles (France): Editions Quae.
- Saiz, N., & Plusa, B. (2013). Early cell fate decisions in the mouse embryo. *Reproduction*, *145*(3), R65-80. doi:10.1530/REP-12-0381
- Sakagami, N., Nishida, K., Akiyama, K., Abe, H., Hoshi, H., Suzuki, C., & Yoshioka, K. (2015). Relationships between oxygen consumption rate, viability, and subsequent development of in vivo-derived porcine embryos. *Theriogenology*, *83*(1), 14-20. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.06.027
- Sampino, S., Zacchini, F., Swiergiel, A. H., Modlinski, A. J., Loi, P., & Ptak, G. E. (2014). Effects of blastomere biopsy on post-natal growth and behavior in mice. *Hum Reprod*, *29*(9), 1875-1883. doi:10.1093/humrep/deu145
- Sanchez-Lazo, L., Brisard, D., Elis, S., Maillard, V., Uzbekov, R., Labas, V., . . . Uzbekova, S. (2014). Fatty acid synthesis and oxidation in cumulus cells support oocyte maturation in bovine. *Mol Endocrinol*, *28*(9), 1502-1521. doi:10.1210/me.2014-1049
- Sanchez, F., & Smitz, J. (2012). Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta*, *1822*(12), 1896-1912. doi:10.1016/j.bbadis.2012.05.013
- Sang, Q., Li, B., Kuang, Y., Wang, X., Zhang, Z., Chen, B., . . . Wang, L. (2018). Homozygous Mutations in WEE2 Cause Fertilization Failure and Female Infertility. *Am J Hum Genet*, *102*(4), 649-657. doi:10.1016/j.ajhg.2018.02.015
- Sang, Q., Zhou, Z., Mu, J., & Wang, L. (2021). Genetic factors as potential molecular markers of human oocyte and embryo quality. *J Assist Reprod Genet*, *38*(5), 993-1002. doi:10.1007/s10815-021-02196-z
- Santamaria, D., Barriere, C., Cerqueira, A., Hunt, S., Tardy, C., Newton, K., . . . Barbacid, M. (2007). Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature*, *448*(7155), 811-815. doi:10.1038/nature06046
- Santos, T. A., El Shourbagy, S., & St John, J. C. (2006). Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. *Fertil Steril*, *85*(3), 584-591. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.09.017
- Sato, K., & Sato, M. (2017). Multiple ways to prevent transmission of paternal mitochondrial DNA for maternal inheritance in animals. *J Biochem*, *162*(4), 247-253. doi:10.1093/jb/mvx052
- Sato, M., & Sato, K. (2013). Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta*, *1833*(8), 1979-1984. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.03.010
- Sauerbrun-Cutler, M. T., Vega, M., Breborowicz, A., Gonzales, E., Stein, D., Lederman, M., & Keltz, M. (2015). Oocyte zona pellucida dysmorphology is associated with diminished in-vitro fertilization success. *J Ovarian Res*, *8*, 5. doi:10.1186/s13048-014-0111-5
- Savy, V., Stein, P., Shi, M., & Williams, C. J. (2021). Superovulation Does Not Alter Calcium Oscillations Following Fertilization. *Front Cell Dev Biol*, *9*, 762057. doi:10.3389/fcell.2021.762057
- Sayutti, N., Abu, M. A., & Ahmad, M. F. (2022). PCOS and Role of Cumulus Gene Expression in Assessing Oocytes Quality. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *13*, 843867. doi:10.3389/fendo.2022.843867
- Scheller, N., Resa-Infante, P., de la Luna, S., Galao, R. P., Albrecht, M., Kaestner, L., . . . Diez, J. (2007). Identification of PatL1, a human homolog to yeast P body component Pat1. *Biochim Biophys Acta*, *1773*(12), 1786-1792. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.08.009
- Schindler, K., Davydenko, O., Fram, B., Lampson, M. A., & Schultz, R. M. (2012). Maternally recruited Aurora C kinase is more stable than Aurora B to support mouse oocyte maturation and early development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(33), E2215-2222. doi:10.1073/pnas.1120517109

- Schindler, K., & Schultz, R. M. (2009). CDC14B acts through FZR1 (CDH1) to prevent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod*, *80*(4), 795-803. doi:10.1095/biolreprod.108.074906
- Sciorio, R., Herrer Saura, R., Thong, K. J., Esbert Algam, M., Pickering, S. J., & Meseguer, M. (2020). Blastocyst collapse as an embryo marker of low implantation potential: a time-lapse multicentre study. *Zygote*, *28*(2), 139-147. doi:10.1017/s0967199419000819
- Sciorio, R., Thong, D., Thong, K. J., & Pickering, S. J. (2021). Clinical pregnancy is significantly associated with the blastocyst width and area: a time-lapse study. *J Assist Reprod Genet*, *38*(4), 847-855. doi:10.1007/s10815-021-02071-x
- Scott, R. T., Jr., Upham, K. M., Forman, E. J., Zhao, T., & Treff, N. R. (2013). Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertil Steril*, *100*(3), 624-630. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.04.039
- Sen, A., & Caiazza, F. (2013a). Oocyte maturation: a story of arrest and release. *Front Biosci (Schol Ed)*, *5*(2), 451-477. doi:10.2741/s383
- Sen, A., & Caiazza, F. (2013b). Oocyte maturation: a story of arrest and release. *Front Biosci (Schol Ed)*, *5*, 451-477. doi:10.2741/s383
- Senn, A., Urner, F., Chanson, A., Primi, M. P., Wirthner, D., & Germond, M. (2006). Morphological scoring of human pronuclear zygotes for prediction of pregnancy outcome. *Hum Reprod*, *21*(1), 234-239. doi:10.1093/humrep/dei282
- Serhal, P. F., Ranieri, D. M., Kinis, A., Marchant, S., Davies, M., & Khadum, I. M. (1997). Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, *12*(6), 1267-1270. doi:10.1093/humrep/12.6.1267
- Setti, A. S., Figueira, R. C., de Almeida Ferreira Braga, D. P., Azevedo, M. C., Iaconelli, A., Jr., & Borges, E., Jr. (2016). Oocytes with smooth endoplasmic reticulum clusters originate blastocysts with impaired implantation potential. *Fertil Steril*, *106*(7), 1718-1724. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.09.006
- Severson, A. F., von Dassow, G., & Bowerman, B. (2016). Oocyte Meiotic Spindle Assembly and Function. *Curr Top Dev Biol*, *116*, 65-98. doi:10.1016/bs.ctdb.2015.11.031
- Shalgi, R., & Phillips, D. M. (1980). Mechanics of in vitro fertilization in the hamster. *Biol Reprod*, *23*(2), 433-444. doi:10.1095/biolreprod23.2.433
- Shan, M. M., Zou, Y. J., Pan, Z. N., Zhang, H. L., Xu, Y., Ju, J. Q., & Sun, S. C. (2022). Kinesin motor KIFC1 is required for tubulin acetylation and actin-dependent spindle migration in mouse oocyte meiosis. *Development*, *149*(5). doi:10.1242/dev.200231
- Shapiro, B. S., Rasouli, M. A., Verma, K., Raman, A., Garner, F. C., Aguirre, M., . . . Bedient, C. (2022). The effect of ovarian follicle size on oocyte and embryology outcomes. *Fertil Steril*, *117*(6), 1170-1176. doi:10.1016/j.fertnstert.2022.02.017
- Shaw-Jackson, C., Van Beirs, N., Thomas, A. L., Rozenberg, S., & Autin, C. (2014). Can healthy babies originate from oocytes with smooth endoplasmic reticulum aggregates? A systematic mini-review. *Hum Reprod*, *29*(7), 1380-1386. doi:10.1093/humrep/deu101
- Shebl, O., Sifferlinger, I., Habelsberger, A., Oppelt, P., Mayer, R. B., Petek, E., & Ebner, T. (2017). Oocyte competence in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection patients suffering from endometriosis and its possible association with subsequent treatment outcome: a matched case-control study. *Acta Obstet Gynecol Scand*, *96*(6), 736-744. doi:10.1111/aogs.12941
- Shen, Q., Chen, M., Zhao, X., Liu, Y., Ren, X., & Zhang, L. (2020). Versican expression level in cumulus cells is associated with human oocyte developmental competence. *Syst Biol Reprod Med*, *66*(3), 176-184. doi:10.1080/19396368.2020.1725685
- Shen, Y., Stalf, T., Mehnert, C., Eichenlaub-Ritter, U., & Tinneberg, H. R. (2005). High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles. *Hum Reprod*, *20*(6), 1596-1606. doi:10.1093/humrep/deh811
- Simon, A. M., Goodenough, D. A., Li, E., & Paul, D. L. (1997). Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature*, *385*(6616), 525-529. doi:10.1038/385525a0

- Slama, R., Hansen, O. K., Ducot, B., Bohet, A., Sorensen, D., Giorgis Allemand, L., . . . Bouyer, J. (2012). Estimation of the frequency of involuntary infertility on a nation-wide basis. *Hum Reprod*, 27(5), 1489-1498. doi:10.1093/humrep/des070
- Sledz, C. A., Holko, M., de Veer, M. J., Silverman, R. H., & Williams, B. R. (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol*, 5(9), 834-839. doi:10.1038/ncb1038
- Smits, G., Campillo, M., Govaerts, C., Janssens, V., Richter, C., Vassart, G., . . . Costagliola, S. (2003). Glycoprotein hormone receptors: determinants in leucine-rich repeats responsible for ligand specificity. *Embo j*, 22(11), 2692-2703. doi:10.1093/emboj/cdg260
- Solovova, O. A., & Chernykh, V. B. (2022). Genetics of Oocyte Maturation Defects and Early Embryo Development Arrest. *Genes (Basel)*, 13(11). doi:10.3390/genes13111920
- Soullier, N., Bouyer, J., Pouly, J. L., Guibert, J., & de La Rochebrochard, E. (2011). Effect of the woman's age on discontinuation of IVF treatment. *Reprod Biomed Online*, 22(5), 496-500. doi:10.1016/j.rbmo.2011.01.013
- Spruck, C. H., de Miguel, M. P., Smith, A. P., Ryan, A., Stein, P., Schultz, R. M., . . . Reed, S. I. (2003). Requirement of Cks2 for the first metaphase/anaphase transition of mammalian meiosis. *Science*, 300(5619), 647-650. doi:10.1126/science.1084149
- Standart, N., & Marnef, A. (2012). Pat1 proteins: regulating mRNAs from birth to death? *Biomol Concepts*, 3(4), 295-306. doi:10.1515/bmc-2012-0005
- Standart, N., & Weil, D. (2018). P-Bodies: Cytosolic Droplets for Coordinated mRNA Storage. *Trends Genet*, 34(8), 612-626. doi:10.1016/j.tig.2018.05.005
- Stebbins-Boaz, B., Cao, Q., de Moor, C. H., Mendez, R., & Richter, J. D. (1999). Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF-4E. *Mol Cell*, 4(6), 1017-1027. doi:10.1016/s1097-2765(00)80230-0
- Stebbins-Boaz, B., Hake, L. E., & Richter, J. D. (1996). CPEB controls the cytoplasmic polyadenylation of cyclin, Cdk2 and c-mos mRNAs and is necessary for oocyte maturation in *Xenopus*. *Embo j*, 15(10), 2582-2592.
- Stein, P., Savy, V., Williams, A. M., & Williams, C. J. (2020). Modulators of calcium signalling at fertilization. *Open Biol*, 10(7), 200118. doi:10.1098/rsob.200118
- Sternlicht, A. L., & Schultz, R. M. (1981). Biochemical studies of mammalian oogenesis: kinetics of accumulation of total and poly(A)-containing RNA during growth of the mouse oocyte. *J Exp Zool*, 215(2), 191-200. doi:10.1002/jez.1402150209
- Steuerwald, N., Cohen, J., Herrera, R. J., Sandalinas, M., & Brenner, C. A. (2001). Association between spindle assembly checkpoint expression and maternal age in human oocytes. *Mol Hum Reprod*, 7(1), 49-55. doi:10.1093/molehr/7.1.49
- Stigliani, S., Moretti, S., Casciano, I., Canepa, P., Remorgida, V., Anserini, P., & Scaruffi, P. (2018). Presence of aggregates of smooth endoplasmic reticulum in MII oocytes affects oocyte competence: molecular-based evidence. *Mol Hum Reprod*, 24(6), 310-317. doi:10.1093/molehr/gay018
- Storr, A., Venetis, C. A., Cooke, S., Susetio, D., Kilani, S., & Ledger, W. (2015). Morphokinetic parameters using time-lapse technology and day 5 embryo quality: a prospective cohort study. *J Assist Reprod Genet*, 32(7), 1151-1160. doi:10.1007/s10815-015-0534-y
- Subtelny, A. O., Eichhorn, S. W., Chen, G. R., Sive, H., & Bartel, D. P. (2014). Poly(A)-tail profiling reveals an embryonic switch in translational control. *Nature*, 508(7494), 66-71. doi:10.1038/nature13007
- Sugawara, A., & Ward, M. A. (2013). Biopsy of embryos produced by in vitro fertilization affects development in C57BL/6 mouse strain. *Theriogenology*, 79(2), 234-241. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.08.007
- Sugimura, S., Yokoo, M., Yamanaka, K., Kawahara, M., Moriyasu, S., Wakai, T., . . . Sato, E. (2010). Anomalous oxygen consumption in porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell Reprogram*, 12(4), 463-474. doi:10.1089/cell.2009.0111

- Suh, C. S., Jee, B. C., Choi, Y. M., Kim, J. G., Lee, J. Y., Moon, S. Y., & Kim, S. H. (2002). Prognostic implication of apoptosis in human luteinized granulosa cells during IVF-ET. *J Assist Reprod Genet*, *19*(5), 209-214. doi:10.1023/a:1015319617598
- Summerton, J. E. (2007). Morpholino, siRNA, and S-DNA compared: impact of structure and mechanism of action on off-target effects and sequence specificity. *Curr Top Med Chem*, *7*(7), 651-660. doi:10.2174/156802607780487740
- Sun, L., Tong, K., Liu, W., Tian, Y., Yang, S., Zhou, D., . . . Li, J. (2022). Identification and characterization of a novel homozygous splice site variant of PATL2 causing female infertility due to oocyte germinal vesicle arrest. *Front Genet*, *13*, 967288. doi:10.3389/fgene.2022.967288
- Sun, Q. Y., Lai, L., Park, K. W., Kuhholzer, B., Prather, R. S., & Schatten, H. (2001). Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen-activated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Biol Reprod*, *64*(3), 879-889. doi:10.1095/biolreprod64.3.879
- Sunkara, S. K., Antonisamy, B., Selliah, H. Y., & Kamath, M. S. (2017). Pre-term birth and low birth weight following preimplantation genetic diagnosis: analysis of 88 010 singleton live births following PGD and IVF cycles. *Hum Reprod*, *32*(2), 432-438. doi:10.1093/humrep/dew317
- Susor, A., & Kubelka, M. (2017). Translational Regulation in the Mammalian Oocyte. *Results Probl Cell Differ*, *63*, 257-295. doi:10.1007/978-3-319-60855-6\_12
- Sutovsky, P., McCauley, T. C., Sutovsky, M., & Day, B. N. (2003). Early degradation of paternal mitochondria in domestic pig (*Sus scrofa*) is prevented by selective proteasomal inhibitors lactacystin and MG132. *Biol Reprod*, *68*(5), 1793-1800. doi:10.1095/biolreprod.102.012799
- Sutovsky, P., Moreno, R. D., Ramalho-Santos, J. o., Dominko, T., Simerly, C., & Schatten, G. (2000). Ubiquitinated Sperm Mitochondria, Selective Proteolysis, and the Regulation of Mitochondrial Inheritance in Mammalian Embryos<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, *63*(2), 582-590. doi:10.1095/biolreprod63.2.582
- Sutton-McDowall, M. L., Gilchrist, R. B., & Thompson, J. G. (2010). The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction*, *139*(4), 685-695. doi:10.1530/REP-09-0345
- Svoboda, P., Fulka, H., & Malik, R. (2017). Clearance of Parental Products. *Adv Exp Med Biol*, *953*, 489-535. doi:10.1007/978-3-319-46095-6\_10
- Takahashi, H., Otsuki, J., Yamamoto, M., Saito, H., Hirata, R., Habara, T., & Hayashi, N. (2020). Clinical outcomes of MII oocytes with refractile bodies in patients undergoing ICSI and single frozen embryo transfer. *Reprod Med Biol*, *19*(1), 75-81. doi:10.1002/rmb2.12305
- Takahashi, Y., Bigler, D., Ito, Y., & White, J. M. (2001). Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 3 and murine eggs: role of beta1 integrin-associated proteins CD9, CD81, and CD98. *Mol Biol Cell*, *12*(4), 809-820. doi:10.1091/mbc.12.4.809
- Takahashi, Y., Hashimoto, S., Yamochi, T., Goto, H., Yamanaka, M., Amo, A., . . . Morimoto, Y. (2016). Dynamic changes in mitochondrial distribution in human oocytes during meiotic maturation. *J Assist Reprod Genet*, *33*(7), 929-938. doi:10.1007/s10815-016-0716-2
- Tamburrino, L., Marchiani, S., Muratori, M., Luconi, M., & Baldi, E. (2020). Progesterone, spermatozoa and reproduction: An updated review. *Mol Cell Endocrinol*, *516*, 110952. doi:10.1016/j.mce.2020.110952
- Tan, J. H., Wang, H. L., Sun, X. S., Liu, Y., Sui, H. S., & Zhang, J. (2009). Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. *Mol Hum Reprod*, *15*(1), 1-9. doi:10.1093/molehr/gan069
- Tang, F., Kaneda, M., O'Carroll, D., Hajkova, P., Barton, S. C., Sun, Y. A., . . . Surani, M. A. (2007). Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev*, *21*(6), 644-648. doi:10.1101/gad.418707
- Tapia-Pizarro, A., Archiles, S., Argandona, F., Valencia, C., Zavaleta, K., Cecilia Johnson, M., . . . Devoto, L. (2017). hCG activates Epac-Erk1/2 signaling regulating Progesterone Receptor expression and function in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod*, *23*(6), 393-405. doi:10.1093/molehr/gax015

- Taugourdeau, A., Desquirit-Dumas, V., Hamel, J. F., Chupin, S., Boucret, L., Ferre-L'Hotellier, V., . . . May-Panloup, P. (2019). The mitochondrial DNA content of cumulus cells may help predict embryo implantation. *J Assist Reprod Genet*, *36*(2), 223-228. doi:10.1007/s10815-018-1348-5
- Tay, J., & Richter, J. D. (2001). Germ cell differentiation and synaptonemal complex formation are disrupted in CPEB knockout mice. *Dev Cell*, *1*(2), 201-213. doi:10.1016/s1534-5807(01)00025-9
- Tejera, A., Castello, D., de Los Santos, J. M., Pellicer, A., Remohi, J., & Meseguer, M. (2016). Combination of metabolism measurement and a time-lapse system provides an embryo selection method based on oxygen uptake and chronology of cytokinesis timing. *Fertil Steril*, *106*(1), 119-126 e112. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.03.019
- Tejera, A., Herrero, J., de Los Santos, M. J., Garrido, N., Ramsing, N., & Meseguer, M. (2011). Oxygen consumption is a quality marker for human oocyte competence conditioned by ovarian stimulation regimens. *Fertil Steril*, *96*(3), 618-623 e612. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.06.059
- Ten, J., Mendiola, J., Vioque, J., de Juan, J., & Bernabeu, R. (2007). Donor oocyte dysmorphisms and their influence on fertilization and embryo quality. *Reproductive BioMedicine Online*, *14*(1), 40-48. doi:10.1016/s1472-6483(10)60762-6
- Tharun, S., & Parker, R. (2001). Targeting an mRNA for decapping: displacement of translation factors and association of the Lsm1p-7p complex on deadenylated yeast mRNAs. *Mol Cell*, *8*(5), 1075-1083. doi:10.1016/s1097-2765(01)00395-1
- Thomas, C., Cavazza, T., & Schuh, M. (2021). Aneuploidy in human eggs: contributions of the meiotic spindle. *Biochem Soc Trans*, *49*(1), 107-118. doi:10.1042/BST20200043
- Thompson, J. G., Partridge, R. J., Houghton, F. D., Cox, C. I., & Leese, H. J. (1996). Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *J Reprod Fertil*, *106*(2), 299-306. doi:10.1530/jrf.0.1060299
- Thouas, G. A., Trounson, A. O., Wolvetang, E. J., & Jones, G. M. (2004). Mitochondrial dysfunction in mouse oocytes results in preimplantation embryo arrest in vitro. *Biol Reprod*, *71*(6), 1936-1942. doi:10.1095/biolreprod.104.033589
- Tilia, L., Chapman, M., Kilani, S., Cooke, S., & Venetis, C. (2020). Oocyte meiotic spindle morphology is a predictive marker of blastocyst ploidy-a prospective cohort study. *Fertil Steril*, *113*(1), 105-113 e101. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.08.070
- Tomari, H., Honjo, K., Kunitake, K., Aramaki, N., Kuhara, S., Hidaka, N., . . . Horiuchi, T. (2018). Meiotic spindle size is a strong indicator of human oocyte quality. *Reprod Med Biol*, *17*(3), 268-274. doi:10.1002/rmb2.12100
- Tong, X., Jin, J., Hu, Z., Zhang, Y., Fan, H. Y., Zhang, Y. L., & Zhang, S. (2022). Mutations in OOEP and NLRP5 identified in infertile patients with early embryonic arrest. *Hum Mutat*, *43*(12), 1909-1920. doi:10.1002/humu.24448
- Tora, L., & Vincent, S. D. (2021). What defines the maternal transcriptome? *Biochem Soc Trans*, *49*(5), 2051-2062. doi:10.1042/BST20201125
- Toralova, T., Kinterova, V., Chmelikova, E., & Kanka, J. (2020). The neglected part of early embryonic development: maternal protein degradation. *Cell Mol Life Sci*, *77*(16), 3177-3194. doi:10.1007/s00018-020-03482-2
- Tripathi, A., Kumar, K. V., & Chaube, S. K. (2010). Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. *J Cell Physiol*, *223*(3), 592-600. doi:10.1002/jcp.22108
- Tulay, P., Arslan, H., Buran, A., & Koprulu, Y. (2019). Assessment of successful pregnancy using granular oocytes in ICSI treatments. *Zygote*, *27*(2), 97-100. doi:10.1017/S096719941900008X
- Tung, J. Y., Rosen, M. P., Nelson, L. M., Turek, P. J., Witte, J. S., Cramer, D. W., . . . Reijo-Pera, R. A. (2006). Novel missense mutations of the Deleted-in-AZoospermia-Like (DAZL) gene in infertile women and men. *Reprod Biol Endocrinol*, *4*, 40. doi:10.1186/1477-7827-4-40
- Ugajin, T., Terada, Y., Hasegawa, H., Velayo, C. L., Nabeshima, H., & Yaegashi, N. (2010). Aberrant behavior of mouse embryo development after blastomere biopsy as observed through time-lapse cinematography. *Fertil Steril*, *93*(8), 2723-2728. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.06.056

- Van Blerkom, J. (2011). Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion*, *11*(5), 797-813. doi:10.1016/j.mito.2010.09.012
- Van Blerkom, J., & Davis, P. (2001). Differential effects of repeated ovarian stimulation on cytoplasmic and spindle organization in metaphase II mouse oocytes matured in vivo and in vitro. *Hum Reprod*, *16*(4), 757-764. doi:10.1093/humrep/16.4.757
- Van Blerkom, J., Davis, P. W., & Lee, J. (1995). ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod*, *10*(2), 415-424. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a135954
- Van Blerkom, J., & Runner, M. N. (1984). Mitochondrial reorganization during resumption of arrested meiosis in the mouse oocyte. *Am J Anat*, *171*(3), 335-355. doi:10.1002/aja.1001710309
- Van Hoek, V., Leroy, J. L., Arias Alvarez, M., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Schnorbusch, K., . . . Sturme, R. G. (2013). Oocyte developmental failure in response to elevated nonesterified fatty acid concentrations: mechanistic insights. *Reproduction*, *145*(1), 33-44. doi:10.1530/REP-12-0174
- Van Hoek, V., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Pintelon, I., Jorssen, E., Dufort, I., . . . Leroy, J. L. (2015). Interaction between differential gene expression profile and phenotype in bovine blastocysts originating from oocytes exposed to elevated non-esterified fatty acid concentrations. *Reprod Fertil Dev*, *27*(2), 372-384. doi:10.1071/RD13263
- Vanderheyden, V., Devogelaere, B., Missiaen, L., De Smedt, H., Bultynck, G., & Parys, J. B. (2009). Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release by reversible phosphorylation and dephosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, *1793*(6), 959-970. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.12.003
- Vejnar, C. E., Abdel Messih, M., Takacs, C. M., Yartseva, V., Oikonomou, P., Christiano, R., . . . Giraldez, A. J. (2019). Genome wide analysis of 3' UTR sequence elements and proteins regulating mRNA stability during maternal-to-zygotic transition in zebrafish. *Genome Res*, *29*(7), 1100-1114. doi:10.1101/gr.245159.118
- Verlinsky, Y., Lerner, S., Illkevitch, N., Kuznetsov, V., Kuznetsov, I., Cieslak, J., & Kuliev, A. (2003). Is there any predictive value of first polar body morphology for embryo genotype or developmental potential? *Reproductive BioMedicine Online*, *7*(3), 336-341. doi:10.1016/s1472-6483(10)61874-3
- Villaescusa, J. C., Allard, P., Carminati, E., Kontogiannina, M., Talarico, D., Blasi, F., . . . Verrotti, A. C. (2006). Clast4, the murine homologue of human eIF4E-Transporter, is highly expressed in developing oocytes and post-translationally modified at meiotic maturation. *Gene*, *367*, 101-109. doi:10.1016/j.gene.2005.09.026
- Vindry, C., Marnef, A., Broomhead, H., Twyffels, L., Ozgur, S., Stoecklin, G., . . . Standart, N. (2017). Dual RNA Processing Roles of Pat1b via Cytoplasmic Lsm1-7 and Nuclear Lsm2-8 Complexes. *Cell Rep*, *20*(5), 1187-1200. doi:10.1016/j.celrep.2017.06.091
- Vindry, C., Weil, D., & Standart, N. (2019). Pat1 RNA-binding proteins: Multitasking shuttling proteins. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, *10*(6), e1557. doi:10.1002/wrna.1557
- Vitt, U. A., Mazerbourg, S., Klein, C., & Hsueh, A. J. (2002). Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. *Biol Reprod*, *67*(2), 473-480. doi:10.1095/biolreprod67.2.473
- Vondrakova, J., Frolikova, M., Ded, L., Cerny, J., Postlerova, P., Palenikova, V., . . . Komrskova, K. (2022). MAIA, Fc receptor-like 3, supersedes JUNO as IZUMO1 receptor during human fertilization. *Sci Adv*, *8*(36), eabn0047. doi:10.1126/sciadv.abn0047
- Wai, T., Ao, A., Zhang, X., Cyr, D., Dufort, D., & Shoubridge, E. A. (2010). The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. *Biol Reprod*, *83*(1), 52-62. doi:10.1095/biolreprod.109.080887
- Wakai, T., Vanderheyden, V., Yoon, S. Y., Cheon, B., Zhang, N., Parys, J. B., & Fissore, R. A. (2012). Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor function during mouse oocyte maturation. *J Cell Physiol*, *227*(2), 705-717. doi:10.1002/jcp.22778
- Walser, C. B., & Lipshitz, H. D. (2011). Transcript clearance during the maternal-to-zygotic transition. *Curr Opin Genet Dev*, *21*(4), 431-443. doi:10.1016/j.gde.2011.03.003

- Wang, F., Li, A., Meng, T. G., Wang, L. Y., Wang, L. J., Hou, Y., . . . Ou, X. H. (2020). Regulation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations and mitochondrial activity by various calcium transporters in mouse oocytes. *Reprod Biol Endocrinol*, *18*(1), 87. doi:10.1186/s12958-020-00643-7
- Wang, L., Tang, J., Wang, L., Tan, F., Song, H., Zhou, J., & Li, F. (2021). Oxidative stress in oocyte aging and female reproduction. *J Cell Physiol*, *236*(12), 7966-7983. doi:10.1002/jcp.30468
- Wang, S., Chen, L., Zhu, Y., & Jiang, W. (2021). Characterization of microRNAs in spent culture medium associated with human embryo quality and development. *Ann Transl Med*, *9*(22), 1648. doi:10.21037/atm-21-5029
- Wang, W., Dong, J., Chen, B., Du, J., Kuang, Y., Sun, X., . . . Sang, Q. (2020). Homozygous mutations in REC114 cause female infertility characterised by multiple pronuclei formation and early embryonic arrest. *J Med Genet*, *57*(3), 187-194. doi:10.1136/jmedgenet-2019-106379
- Wang, X., Watt, P. M., Louis, E. J., Borts, R. H., & Hickson, I. D. (1996). Pat1: a topoisomerase II-associated protein required for faithful chromosome transmission in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, *24*(23), 4791-4797. doi:10.1093/nar/24.23.4791
- Wang, Y., Teng, Z., Li, G., Mu, X., Wang, Z., Feng, L., . . . Xia, G. (2015). Cyclic AMP in oocytes controls meiotic prophase I and primordial folliculogenesis in the perinatal mouse ovary. *Development*, *142*(2), 343-351. doi:10.1242/dev.112755
- Warden, A. S., DaCosta, A., Mason, S., Blednov, Y. A., Mayfield, R. D., & Harris, R. A. (2020). Inbred Substrain Differences Influence Neuroimmune Response and Drinking Behavior. *Alcohol Clin Exp Res*, *44*(9), 1760-1768. doi:10.1111/acer.14410
- Wassarman, P. M., & Kinloch, R. A. (1992). Gene expression during oogenesis in mice. *Mutat Res*, *296*(1-2), 3-15. doi:10.1016/0165-1110(92)90028-8
- Wei, Y., Chiang, W. C., Sumpter, R., Jr., Mishra, P., & Levine, B. (2017). Prohibitin 2 Is an Inner Mitochondrial Membrane Mitophagy Receptor. *Cell*, *168*(1-2), 224-238 e210. doi:10.1016/j.cell.2016.11.042
- Weston, A., & Sommerville, J. (2006). Xp54 and related (DDX6-like) RNA helicases: roles in messenger RNP assembly, translation regulation and RNA degradation. *Nucleic Acids Res*, *34*(10), 3082-3094. doi:10.1093/nar/gkl409
- Wigglesworth, K., Lee, K. B., O'Brien, M. J., Peng, J., Matzuk, M. M., & Eppig, J. J. (2013). Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(39), E3723-3729. doi:10.1073/pnas.1314829110
- Wiltbank, M. C., Belfiore, C. J., & Niswender, G. D. (1993). Steroidogenic enzyme activity after acute activation of protein kinase (PK) A and PKC in ovine small and large luteal cells. *Mol Cell Endocrinol*, *97*(1-2), 1-7. doi:10.1016/0303-7207(93)90205-x
- Winata, C. L., & Korzh, V. (2018). The translational regulation of maternal mRNAs in time and space. *FEBS Lett*, *592*(17), 3007-3023. doi:10.1002/1873-3468.13183
- Wong, C. C., Loewke, K. E., Bossert, N. L., Behr, B., De Jonge, C. J., Baer, T. M., & Reijo Pera, R. A. (2010). Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol*, *28*(10), 1115-1121. doi:10.1038/nbt.1686
- Wu, L., Chen, H., Li, D., Song, D., Chen, B., Yan, Z., . . . Sang, Q. (2019). Novel mutations in PATL2: expanding the mutational spectrum and corresponding phenotypic variability associated with female infertility. *J Hum Genet*, *64*(5), 379-385. doi:10.1038/s10038-019-0568-6
- Xia, P. (1997). Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod*, *12*(8), 1750-1755. doi:10.1093/humrep/12.8.1750
- Xu, Y., Shi, Y., Fu, J., Yu, M., Feng, R., Sang, Q., . . . Wang, L. (2016). Mutations in PADI6 Cause Female Infertility Characterized by Early Embryonic Arrest. *Am J Hum Genet*, *99*(3), 744-752. doi:10.1016/j.ajhg.2016.06.024

- Xu, Z., Kopf, G. S., & Schultz, R. M. (1994). Involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca<sup>2+</sup> release in early and late events of mouse egg activation. *Development*, *120*(7), 1851-1859. doi:10.1242/dev.120.7.1851
- Yamanaka, M., Hashimoto, S., Amo, A., Ito-Sasaki, T., Abe, H., & Morimoto, Y. (2011). Developmental assessment of human vitrified-warmed blastocysts based on oxygen consumption. *Hum Reprod*, *26*(12), 3366-3371. doi:10.1093/humrep/der324
- Yamamoto, M., Minami, S., & Nakano, R. (1991). Immunohistochemical localization of inhibin subunits in human corpora lutea during menstrual cycle and pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, *73*(3), 470-477. doi:10.1210/jcem-73-3-470
- Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F. J., Elvin, J. A., Carino, C., . . . Matzuk, M. M. (2001). Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol*, *15*(6), 854-866. doi:10.1210/mend.15.6.0662
- Yang, J., Morales, C. R., Medvedev, S., Schultz, R. M., & Hecht, N. B. (2007). In the absence of the mouse DNA/RNA-binding protein MSY2, messenger RNA instability leads to spermatogenic arrest. *Biol Reprod*, *76*(1), 48-54. doi:10.1095/biolreprod.106.055095
- Yang, L., Lin, X., Tang, H., Fan, Y., Zeng, S., Jia, L., . . . Liu, X. (2020). Mitochondrial DNA mutation exacerbates female reproductive aging via impairment of the NADH/NAD(+) redox. *Aging Cell*, *19*(9), e13206. doi:10.1111/accel.13206
- Yao, T., Suzuki, R., Furuta, N., Suzuki, Y., Kabe, K., Tokoro, M., . . . Sugimura, S. (2018). Live-cell imaging of nuclear-chromosomal dynamics in bovine in vitro fertilised embryos. *Sci Rep*, *8*(1), 7460. doi:10.1038/s41598-018-25698-w
- Yatsenko, S. A., & Rajkovic, A. (2019). Genetics of human female infertility dagger. *Biol Reprod*, *101*(3), 549-566. doi:10.1093/biolre/ioz084
- Yding Andersen, C. (2017). Inhibin-B secretion and FSH isoform distribution may play an integral part of follicular selection in the natural menstrual cycle. *Mol Hum Reprod*, *23*(1), 16-24. doi:10.1093/molehr/gaw070
- Yoon, H., Jang, H., Kim, E. Y., Moon, S., Lee, S., Cho, M., . . . Choi, Y. (2018). Knockdown of PRKAR2B Results in the Failure of Oocyte Maturation. *Cell Physiol Biochem*, *45*(5), 2009-2020. doi:10.1159/000487978
- Yoon, S. Y. (2019). Role of Type 1 Inositol 1,4,5-trisphosphate Receptors in Mammalian Oocytes. *Dev Reprod*, *23*(1), 1-9. doi:10.12717/DR.2019.23.1.001
- Yoshida, N., & Perry, A. C. (2007). Piezo-actuated mouse intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Nat Protoc*, *2*(2), 296-304. doi:10.1038/nprot.2007.7
- Younis, J. S., Radin, O., Izhaki, I., & Ben-Ami, M. (2009). Does first polar body morphology predict oocyte performance during ICSI treatment? *J Assist Reprod Genet*, *26*(11-12), 561-567. doi:10.1007/s10815-009-9368-9
- Yu, C., Cveticic, N., Hisler, V., Gupta, K., Ye, T., Gazdag, E., . . . Tora, L. (2020). TBPL2/TFIIA complex establishes the maternal transcriptome through oocyte-specific promoter usage. *Nat Commun*, *11*(1), 6439. doi:10.1038/s41467-020-20239-4
- Yu, E. J., Ahn, H., Lee, J. M., Jee, B. C., & Kim, S. H. (2015). Fertilization and embryo quality of mature oocytes with specific morphological abnormalities. *Clin Exp Reprod Med*, *42*(4), 156-162. doi:10.5653/cerm.2015.42.4.156
- Yu, J., Hecht, N. B., & Schultz, R. M. (2001). Expression of MSY2 in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Biol Reprod*, *65*(4), 1260-1270. doi:10.1095/biolreprod65.4.1260
- Yu, X. J., Yi, Z., Gao, Z., Qin, D., Zhai, Y., Chen, X., . . . Li, L. (2014). The subcortical maternal complex controls symmetric division of mouse zygotes by regulating F-actin dynamics. *Nat Commun*, *5*, 4887. doi:10.1038/ncomms5887
- Zeng, H. T., Ren, Z., Yeung, W. S., Shu, Y. M., Xu, Y. W., Zhuang, G. L., & Liang, X. Y. (2007). Low mitochondrial DNA and ATP contents contribute to the absence of birefringent spindle imaged with PolScope in in vitro matured human oocytes. *Hum Reprod*, *22*(6), 1681-1686. doi:10.1093/humrep/dem070

- Zhang, C. H., Wang, Z. B., Quan, S., Huang, X., Tong, J. S., Ma, J. Y., . . . Sun, Q. Y. (2011). GM130, a cis-Golgi protein, regulates meiotic spindle assembly and asymmetric division in mouse oocyte. *Cell Cycle*, *10*(11), 1861-1870. doi:10.4161/cc.10.11.15797
- Zhang, J. H., Zhang, T., Gao, S. H., Wang, K., Yang, X. Y., Mo, F. F., . . . Jiang, G. J. (2016). Mitofusin-2 is required for mouse oocyte meiotic maturation. *Sci Rep*, *6*, 30970. doi:10.1038/srep30970
- Zhang, J. J., Liu, X., Chen, L., Zhang, S., Zhang, X., Hao, C., & Miao, Y. L. (2020). Advanced maternal age alters expression of maternal effect genes that are essential for human oocyte quality. *Aging (Albany NY)*, *12*(4), 3950-3961. doi:10.18632/aging.102864
- Zhang, M., Su, Y. Q., Sugiura, K., Wigglesworth, K., Xia, G., & Eppig, J. J. (2011). Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro. *Endocrinology*, *152*(11), 4377-4385. doi:10.1210/en.2011-1118
- Zhang, M., Su, Y. Q., Sugiura, K., Xia, G., & Eppig, J. J. (2010). Granulosa cell ligand NPR2 and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science*, *330*(6002), 366-369. doi:10.1126/science.1193573
- Zhang, X., Wu, X. Q., Lu, S., Guo, Y. L., & Ma, X. (2006). Deficit of mitochondria-derived ATP during oxidative stress impairs mouse MII oocyte spindles. *Cell Res*, *16*(10), 841-850. doi:10.1038/sj.cr.7310095
- Zhang, Z., Li, B., Fu, J., Li, R., Diao, F., Li, C., . . . Wang, L. (2020). Bi-allelic Missense Pathogenic Variants in TRIP13 Cause Female Infertility Characterized by Oocyte Maturation Arrest. *Am J Hum Genet*, *107*(1), 15-23. doi:10.1016/j.ajhg.2020.05.001
- Zhao, J., Hyman, L., & Moore, C. (1999). Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev*, *63*(2), 405-445. doi:10.1128/MMBR.63.2.405-445.1999
- Zhao, L., Guan, Y., Meng, Q., Wang, W., Wu, L., Chen, B., . . . Wang, L. (2021). Identification of Novel Mutations in CDC20: Expanding the Mutational Spectrum for Female Infertility. *Front Cell Dev Biol*, *9*, 647130. doi:10.3389/fcell.2021.647130
- Zhao, L., Xue, S., Yao, Z., Shi, J., Chen, B., Wu, L., . . . Sang, Q. (2020). Biallelic mutations in CDC20 cause female infertility characterized by abnormalities in oocyte maturation and early embryonic development. *Protein Cell*, *11*(12), 921-927. doi:10.1007/s13238-020-00756-0
- Zheng, W., Zhou, Z., Sha, Q., Niu, X., Sun, X., Shi, J., . . . Sang, Q. (2020). Homozygous Mutations in BTG4 Cause Zygotic Cleavage Failure and Female Infertility. *Am J Hum Genet*, *107*(1), 24-33. doi:10.1016/j.ajhg.2020.05.010
- Zhou, D., Nie, Z. W., & Cui, X. S. (2021). EB1 Is Essential for Spindle Formation and Chromosome Alignment During Oocyte Meiotic Maturation in Mice. *Microsc Microanal*, *27*(2), 385-391. doi:10.1017/S1431927620024897
- Zhou, J., Wang, M., Yang, Q., Li, D., Li, Z., Hu, J., . . . Zhu, L. (2022). Can successful pregnancy be achieved and predicted from patients with identified ZP mutations? A literature review. *Reprod Biol Endocrinol*, *20*(1), 166. doi:10.1186/s12958-022-01046-6
- Zhou, W., Fu, L., Sha, W., Chu, D., & Li, Y. (2016). Relationship of polar bodies morphology to embryo quality and pregnancy outcome. *Zygote*, *24*(3), 401-407. doi:10.1017/S0967199415000325
- Ziebe, S., Bangsboll, S., Schmidt, K. L., Loft, A., Lindhard, A., & Nyboe Andersen, A. (2004). Embryo quality in natural versus stimulated IVF cycles. *Hum Reprod*, *19*(6), 1457-1460. doi:10.1093/humrep/deh264