



HAL
open science

Génotoxicité des rayonnements ionisants au cours de l'ovogenèse chez les mammifères

Vincent Puy

► **To cite this version:**

Vincent Puy. Génotoxicité des rayonnements ionisants au cours de l'ovogenèse chez les mammifères. Reproduction sexuée. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASL090 . tel-04322529

HAL Id: tel-04322529

<https://theses.hal.science/tel-04322529>

Submitted on 5 Dec 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.

Génotoxicité des rayonnements ionisants au
cours de l'ovogenèse chez les mammifères

*Genotoxicity of ionizing radiation during oogenesis
in mammals*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°568 : signalisations et réseaux intégratifs en biologie (Biosigne)
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Unité de recherche : Université de Paris and Université Paris-Saclay, iRCM/IBFJ CEA, UMR
Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations

Référent : Faculté de médecine

Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,

le 03/12/2021, par

Vincent PUY

Composition du Jury

Catherine PATRAT

PUPH, APHP - Université de Paris

Philippe MONGET

DR INRAE, Université de Tours

Daniel VAIMAN

DR INSERM, Institut Cochin-Université de Paris

Patrick REVY

DR CNRS, Institut Imagine-Université de Paris

Présidente

Rapporteur & Examineur

Rapporteur & Examineur

Examineur

Direction de la thèse

Nelly ACHOUR-FRYDMAN

PUPH, APHP - Université Paris-Saclay

Gabriel LIVERA

PU, Institut de Biologie Francois Jacob - Université de Paris

Emmanuelle MARTINI

Chercheur CEA, Institut de Biologie Francois Jacob - CEA

Directrice de thèse

Co-directeur de thèse

Co-encadrante

À Pauline et choupette,

À Georges,

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier l'ensemble des membres composant le jury de cette thèse qui me font le grand honneur d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie vivement les Directeurs de Recherche Philippe Monget et Daniel Vaiman d'avoir accepté d'être rapporteurs et examinateurs de ces travaux.

Je remercie sincèrement le Professeur Catherine Patrat et le Directeur de Recherche Patrick Revy d'avoir accepté d'évaluer cette thèse en tant qu'examineurs.

Enfin, je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Gabriel Livera, le Docteur Emmanuelle Martini et le Professeur Nelly Achour-Frydman sans lesquels ce travail n'aurait pas été possible.

Ces dernières années j'ai eu la chance d'intégrer des équipes formidables sans qui ce travail n'existerait pas. Je voudrais ici exprimer ma reconnaissance envers celles et ceux qui m'ont tant donné :

MERCI à toute la famille LDG de m'avoir initié à la réflexion scientifique et soutenu avec bienveillance tout au long de ma thèse. Vous m'avez transmis le virus de la Recherche et conforté dans mes choix professionnels. Vous m'avez également toujours poussé de l'avant au sens figuré comme au sens propre (cf. une panne de voiture). Vous allez tous me manquer. J'espère de tout cœur que nous trouverons le chemin qui nous permettra de continuer à travailler ensemble.

Gabriel, je te suis infiniment reconnaissant de m'avoir si bien accueilli dans ton équipe et encadré jusqu'au bout (...du bout) dans ce travail. Je me souviendrai toujours du jour où tu m'as confié ce projet « OR ».

Merci Virginie pour ta gentillesse et ta simplicité qui m'ont beaucoup touché. Je te remercie notamment pour tes conseils pour optimiser les protocoles de culture organotypique.

Merci Emmanuelle pour ton expertise sur le DNA repair, ta justesse, ton perfectionnisme dans les manip, mais aussi ta capacité à être straight to the point dans le money time ! Je te remercie pour la patience dont tu as fait preuve face à mes (trop) nombreuses questions.

Merci Justine pour ta bonne humeur, ta disponibilité, tes conseils et notamment ton expertise dans la manipulation des gonades. Merci aussi pour les bonnes tranches de rire.

Merci Sébastien d'avoir accepté de partager ton bureau avec moi et pour tout le travail que tu as fourni dans ce projet. Il serait grand temps d'abattre ce mur qui nous sépare.

Merci Delphine pour toute ton aide notamment pour les xénogreffes. J'ai adoré travailler à tes côtés.

Merci Muriel pour tes conseils et ton soutien tout au long de cette thèse. J'ai également beaucoup apprécié nos discussions variées, de la Santé aux abeilles.

Merci Pauline pour ta gentillesse et ta provoc, prépares toi au passage du flambeau du thésard du LDG car tu es la prochaine 😊.

Merci Amandine et Cathy pour votre gentillesse, et pour tous les gâteaux ou chips respectivement 😊. Je vous souhaite le meilleur pour la suite de vos thèses.

Merci Lucie pour nos échanges autour de la pratique de la PMA et pour ton soutien. J'espère que tu vas t'éclater avec l'étude du modèle RAD50 !

Merci Chiara pour ta bonne humeur et tes chants qui ont égayé nos journées en pièce histo.

Merci Aurélie pour les moments partagés et ton aide pour ce manuscrit.

Un grand merci à toutes celles et ceux ont quitté le LDG et que je n'oublie pas. Les ingénieurs (Sophie, Cécile), post-docs (Morgane et ses pinces magiques, merci pour ta relecture) et doctorants (Gaby do Brasil, Nour, Cynthia, Laura, Sonia), les masters (Antoine, Gaëlle, Iris), les techniciens (Quentin) avec qui j'ai passé de très bons moments partagés.

Je remercie également toutes celles et ceux qui ont collaboré avec le LDG dans le cadre de ce travail.

Merci Vilma, ta rigueur et ton efficacité m'impressionnent. Je suis vraiment ravi d'avoir pu te rencontrer et te remercie tant sur le plan des manip que sur le plan humain. Nos courses avec Seb vont me manquer.

Merci à Caro et à Véronique également pour votre aide et la bonne volonté que vous m'avez accordé du côté de la plateforme de l'animalerie.

Un grand merci Véronique pour ton expertise sur les rayonnements ionisants. C'est promis mes matériels et méthodes seront rigoureux 😊. Je te remercie pour ta relecture attentive de ce manuscrit.

Merci Lamya pour ton soutien, ton aide au confocal et pour les supers belles photos de ton smartphone 😊.

Merci Philippe pour ton aide en informatique.

Merci à Arielle et Aurélie pour votre aide indispensable au niveau administratif.

Merci à toute l'équipe du LCSG (Pierre, Lydia, Isabelle, Clémentine, Anne-Sophie) pour votre soutien.

Merci à Daniel et à Claire du LRTS pour le projet « low doses » et la confiance que vous m'avez accordé.

Merci à Christine et François du LRP pour leur soutien et la collaboration passionnante sur les anomalies cytogénétiques radio-induites.

Merci à Eléa et Luis de la cellule sécurité.

Merci à Christophe pour nos échanges bien qu'ils ne furent pas au squash.

MERCI à toute l'équipe de la PMA du bâtiment Jean d'Alsace pour ces 4,5 années passées à vos côtés et qui sont passées (trop) vite. Vous m'avez chaun énormément appris dans la pratique de la PMA à la paillasse, aux staffs, en consultation bref dans tous les aspects du merveilleux métier de biologiste de PMA. Vous allez évidemment tous beaucoup me manquer et je vous souhaite le meilleur.

Merci Nelly car sans toi je ne serais pas en train d'écrire ces lignes. Aussi, un immense merci de m'avoir ouvert les portes du LDG et soutenu tout au long de ce travail en me donnant ta confiance. Je te suis infiniment reconnaissant de m'avoir accueilli dans ton service et permis de progresser pendant toutes ces années tant sur le plan hospitalier qu'universitaire.

Merci pour tout Laetitia, tes compétences et ta bonne humeur sont une vraie source d'inspiration. Je te suis très reconnaissant pour tout ce que tu m'as apporté pendant ces années et d'avoir été si arrangeante lorsque j'en avais besoin.

Merci également à Anne pour ta dispobilité et tout ce que tu m'as appris dès mon arrivée dans le service. Le passage d'interne à assistant a été tellement plus facile grâce à tes conseils.

Merci Olivier, pour tous les bons moments passés ensemble en tant qu'assistants dans le service. Petit clin d'oeil à Alexandre avec qui j'ai eu la chance de faire mes débuts avant son départ à Bordeaux.

Merci Emine et plein de bonnes choses pour la suite à Poissy.

Merci à Claire, Stéphane, Ilan, Bruno avec qui j'ai eu grand plaisir à travailler mais aussi Olivia que je n'aurai pas eu le temps de bien connaître.

Un énorme merci à toute l'équipe technique qui m'a tant appris. Je garderai pour toujours votre conscience professionnelle, ce que que vous m'avez (avec beaucoup de patience) appris à la paillasse, et tous les moments de joie partagée autour d'un café ou d'une partie de pétanque. Vous allez tous me manquer. Merci à Chrichri, Blan, Sophie, Juju, Cathy, Noémie, Sally, Aurélia et je n'oublie pas Valérie et Benoît (merci pour toutes les touches sucrées).

Merci également à Thierry et à la retraitée Dominique.

Merci à Mylène et Alex pour tous les dossiers que je vous ai demandé de rechercher et tous les services qui m'ont grandement aidé.

Je remercie chaleureusement tous les internes (Julie, Florence, Aurélie, Victoria, Emmanuelle et Fanny) avec qui j'ai eu grand plaisir de travailler.

Je remercie également toute l'équipe clinique de PMA de Béclère. Un grand merci à Michael pour ta disponibilité et ton soutien. Merci à Vanessa pour ton soutien (et pour le suivi de grossesse). Je remercie chaleureusement Vincent, Anne, Charlotte, Valentin, Jad, Jeanne, Ursula, Fayçal, Jonas et tous les Gynécologues de Béclère.

Merci à la team de choc des sages femmes et en particulier à Alex, Constance et à « compagnon » Yaëlle qui a quitté le service.

Merci à toutes les infirmières et notamment Nathalie, Charlotte et Andréa.

Merci aux aides soignantes et notamment Colette et Nathalie pour votre aide et votre bonne humeur toujours au rendez-vous.

Merci à Chimène, Caro et Céline pour tout le boulot de secrétariat côté clinique.

MERCI à l'équipe d'enseignants de Paris-Saclay. Merci au Professeur Gerard Tachdjian pour m'avoir accordé sa confiance, à Sophie pour les débuts mais aussi Lucie, Rima, Abdel, Jérôme, Aurélie et tous les autres. Enseigner à vos côtés a été très instructif et un vrai plaisir. Vous allez me manquer.

MERCI évidemment à l'équipe de Jean-Verdier qui a accepté de m'accueillir prochainement. Je remercie tout particulièrement le Professeur Florence Esutache et le Dr. Christophe Sifer qui me font l'honneur de m'accorder leur confiance. Je suis prêt pour cette nouvelle aventure !

Et enfin, MERCI à toute ma famille pour votre soutien indéfectible ainsi qu'à tous mes amis et notamment le Pr. Martin.

SOMMAIRE

TABLE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AVANT-PROPOS

INTRODUCTION	1
1. L'OVOGENÈSE	1
1.1. Mise en place de la lignée germinale femelle	1
1.1.1. Origine des cellules germinales	1
1.1.1.1. Les cellules germinales primordiales	1
1.1.1.2. Acquisition de la compétence gamétique	4
1.1.1.3. Détermination sexuelle somatique	6
1.1.1.4. Du cycle mitotique à l'initiation méiotique	8
1.1.2. Origines des cellules somatiques ovariennes	10
1.2. La méiose	12
1.2.1. Les différentes étapes	12
1.2.2. Dimorphisme sexuel	14
1.2.3. La Prophase I de méiose	15
1.2.3.1. Le remaniement chromatinien	15
1.2.3.2. L'appariement des chromosomes homologues	18
1.2.3.3. Origine et prise en charge des cassures double-brin méiotiques	19
1.2.3.3.1. <i>Le complexe SPO11-TOPVIB-like</i>	19
1.2.3.3.2. Signalisation des cassures double-brin méiotiques	21
1.2.3.3.3. La recombinaison homologue méiotique	22
1.3. La folliculogenèse	25
1.3.1. Définitions	25
1.3.2. Les étapes de la folliculogenèse	28
1.3.3. Régulations de la folliculogenèse	30
1.3.3.1. Histogenèse folliculaire	30
1.3.3.2. Croissance folliculaire basale	32
1.3.3.3. Croissance folliculaire terminale	36
1.3.4. Communication directe entre ovocyte et cellules somatiques	37
1.4. L'homéostasie des cellules germinales	38
1.4.1. Les voies de mort des cellules germinales	40
1.4.2. Les rôles de la mort ovocytaire	43
1.4.3. La néo-ovogenèse	45

2. EFFETS DES RAYONNEMENTS IONISANTS SUR L'OVAIRE.....	46
2.1. Généralités sur les rayonnements ionisants.....	46
2.1.1. Définitions	46
2.1.2. Les sources d'exposition	48
2.2. Effets des rayonnements ionisants sur l'organisme	50
2.2.1. Effets cliniques somatiques	50
2.2.2. Effets sur la fertilité féminine.....	51
2.2.2.1. Le risque de diminution de la fertilité.....	51
2.2.2.2. Le risque héréditaire	52
2.3. Effets cellulaires des rayonnements ionisants	59
2.3.1. Les lésions cellulaires radio-induites	59
2.3.2. Les effets sur la cellule somatique.....	60
2.3.3. Les effets sur l'ovocyte	62
2.3.3.1. Radiosensibilité de la cellule germinale femelle.....	62
2.3.3.1.1. L'apoptose ovocytaire radio-induite	62
2.3.3.1.2. Les modèles d'étude de la radiosensibilité ovocytaire.....	63
2.3.3.2. Le risque héréditaire	66
2.3.3.2.1. Les anomalies chromosomiques	66
2.3.3.2.2. Les mutations ponctuelles radio-induites.....	70
2.3.3.2.3. Les modifications de l'épigénome	71
3. ORIGINES ET PRISE EN CHARGE DES CASSURES DOUBLE-BRIN DE L'ADN.....	73
3.1. Les origines.....	73
3.2. Détection et signalisation des cassures double-brin	73
3.2.1. Détection.....	73
3.2.2. Signalisation et conséquences cellulaires	75
3.3. Le choix des voies de réparation des cassures double-brin : résection ou pas ?.....	77
3.4. Voies de réparation des cassures double-brin.....	81
3.4.1. NHEJ canonique.....	83
3.4.1.1. Les grandes étapes	83
3.4.1.2. Focus sur XLF.....	84
3.4.2. Les voies résectives	85
3.4.2.1. L'alt-NHEJ	85
3.4.2.2. La recombinaison homologue	86
3.4.2.3. Le single strand annealing	88
3.5. Prise en charge des cassures double-brin dans l'ovocyte post-natal.....	89

OBJECTIFS DE LA THÈSE	91
RÉSULTATS	93
Partie 1 : Radiosensibilité ovocytaire au cours de la folliculogenèse et évaluation de la fertilité résiduelle après exposition aux rayonnements ionisants chez la Souris	95
Partie 2 : Étude de la prise en charge des cassures double-brin de l'ADN dans l'ovocyte post-natal mammalien.....	113
Partie 3 : Étude de la fertilité femelle chez la Souris après exposition répétée à de faibles doses d'irradiation	141
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	149
BIBLIOGRAPHIE	167
ANNEXES	225

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Représentation schématique du développement de la lignée germinale femelle de la souris et de la femme	3
Figure 2 : Cinétique d'acquisition de la méthylation de l'ADN au cours du développement de la lignée germinale mâle et femelle chez la souris.....	5
Figure 3 : Schéma simplifié de l'antagonisme entre les voies de différenciation sexuelles somatiques mâle et femelle	7
Figure 4 : Représentation schématique de la morphogénèse ovarienne	11
Figure 5 : Représentation schématique comparative de la mitose et de la méiose	13
Figure 6 : Représentation schématique de l'assemblage du complexe synaptonémal au cours de la prophase I méiotique.....	17
Figure 7 : Schéma simplifié de la recombinaison homologue méiotique	23
Figure 8 : Les différents stades de la folliculogénèse chez la souris adulte	27
Figure 9 : Représentation schématique de la folliculogénèse	29
Figure 10 : Représentation schématique de l'implication des voies PI3K/PTEN et TSC/mTOR dans l'activation des follicules primordiaux.....	35
Figure 11 : Le nombre de cellules germinales dans l'ovaire chez la Souris et chez l'Homme au cours de l'ovogénèse.....	39
Figure 12 : Représentation schématique simplifiée des voies conduisant à l'apoptose.....	41
Figure 13 : Spectre électromagnétique.....	46
Figure 14 : Les différentes sources d'exposition radioactives en France	49
Figure 15 : Les différentes sources d'exposition aux rayonnements ionisants dans les prises en charges diagnostiques.....	49
Figure 16 : Principales stratégies actuelles de préservation de la fertilité féminine	57
Figure 17 : Le large spectre des lésions radio-induites de l'ADN	59
Figure 18 : Schéma simplifié des effets cellulaires des rayonnements ionisants.....	61
Figure 19 : Les principales aberrations chromosomiques	67
Figure 20 : Illustration des différents modes de ségrégation d'une translocation robertsonienne et d'une translocation réciproque au cours de la méiose.....	69
Figure 21 : Les principales voies de réparation des dommages de l'ADN radio-induits	72
Figure 22 : L'activation des voies ATM et ATR	74
Figure 23 : Les voies de réponse cellulaire aux dommages de l'ADN.....	76
Figure 24 : Schéma simplifié de la régulation de la résection par 53BP1 et BRCA1 dans la prise en charge des cassures double-brin	78
Figure 25 : Les modifications post-traductionnelles des histones dans le recrutement différentiel de 53BP1 et BRCA1	80
Figure 26 : Le choix des voies de réparation des cassures double-brin de l'ADN	81

Figure 27 : La voie de la jonction des extrémités non homologues après cassure double-brin de l'ADN.....	82
Figure 28 : La recombinaison homologue.....	87

Tableau 1 : Valeurs seuil des effets déterministes des rayonnements ionisants sur les grandes fonctions de l'organisme de mammifères.....	50
Tableau 2 : Principales études du risque héréditaire après exposition accidentelle aux rayonnements ionisants chez l'Homme	53
Tableau 3 : Estimation du nombre de lésions à l'ADN en condition physiologique et après une irradiation de 1Gy	61
Tableau 4 : Principales études relatives au risque de survenue d'insuffisance ovarienne prématurée après exposition aux rayonnements ionisants	64
Tableau 5 : La radiosensibilité des follicules ovariens chez les mammifères	65

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A

ADNc : ADN complémentaire

ADNdb : ADN double-brin

ADNsb : ADN simple-brin

alt-NHEJ : NHEJ alternatif

AMH : Anti-Müllerian Hormone

AMPc : Adénosine Mono-Phosphate cyclique

Apaf-1 : Apoptotic Protease Activating Factor-1

AR : Acide Rétinoïque

ARNm : Acides Ribo-Nucléiques messagers

ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3 related

ATRIP : Interacting Protein

B

Bak : Bcl2 homologous Antagonist/Killer

BARD1 : BRCA1 Associated RING Domain 1

BAX : Bcl2 Associated X protein

BID : BH3 Interacting Domain death agonist

BIM : Bcl-2 Interacting Mediator of cell death

BIR : Break-Induced Replication

BLIMP1 : B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1

BLM : BLM RecQ like helicase

BMP : Bone Morphogenetic Protein

BMP15 : Bone Morphogenetic Protein 15

BRCA1 : Breast Cancer 1, early onset

BRCA2 : Breast Cancer 2, early onset

C

CDBs : Cassures Double-Brin

Cdc25 : Cell Division Cycle 25C

CDK1 : Cyclin Dependent Kinase 1

CECOS : Centre d'Étude et de Conservation des Œufs et du Sperme humains

CGPs : Cellules Germinales Primordiales

Chk1 : Checkpoint Kinase 1

Chk2 : Checkpoint Kinase 2

CS : Complexe Synaptonémal

CTGF : Connective Tissue Growth Factor

CtIP : CTBP-interacting protein

CTNNB1 : Catenin Beta 1

CTO : Cryoconservation de Tissu Ovarien

CXCR4 : Chemokine (C-X-C motif) Receptor 4

CX37 : Connexine 37

CX43 : Connexine 43

D

DAZL : Deleted in Azoospermia Like

Ddx4 : DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4

dHJ : double Jonction de Holliday

DL50 : Dose Léthale pour 50%

D-loop : boucle de Déplacement

Dmc1 : DNA Meiotic recombinase 1

DNA2 : DNA replication helicase/nuclease 2

DNA-PK : DNA-Protein Kinase

DNAPKcs : DNA-Protein Kinase catalytic subunit

DND1 : Dead end homolog 1

DR5 : Death Receptor 5

DSBR : Double Strand Break Repair

E

EA : Éléments Axiaux

EC : Éléments centraux

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EL : Éléments Latéraux

ELISA : Exposition Liée aux ImagerieS en rAdiothérapie

ES : cellules Souches d'origine Embryonnaire

ESR1/2 : Estrogen Receptor 1/2

EXO1 : nucléases Exonuclease 1

F

FAS : (tnfr-F6)-ASsociated

FASL : FAS Ligand

FGF2 : Fibroblast Growth Factor 2 (basic)

Figla : Folliculogenesis specific basic helix-loop-helix

FOXL2 : Forkhead box l2

FP : Follicules Primordiaux

FSH : Hormone FolliculoStimulante

FSHR : Follicle Stimulating Hormone Receptor

G

G-CSF : Granulocyte-Colony-Stimulating Factor

GVBD : Germinal Vesicle BreakDown (= rupture de la vésicule germinale)

GDF9 : Growth Differentiation Factor 9

GP : Globule Polaire

H

H3K4 : Histone 3 en lysine 4

H3K9 : Histone 3 en lysine 9

H4K20 : Histone 4 en lysine 20

H4K20me0 : H4K20 non méthylée

H4K20me1 : H4K20 monométhylée

H4K20me2 : H4K20 diméthylée

HOC : Hyperstimulation Ovarienne Contrôlée

HR : Recombinaison Homologue

I

IGF1R : Insulin-like Growth Factor I Receptor

IOP : Insuffisance Ovarienne Prématurée

IPS : cellules Pluripotentes Induites

IRCM : Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire

J

JAG1 : Jagged1

JH : Jonction de Holliday

Jpc : Jours post-coïtum

Jpp : Jour post-procréation

K

KASH5 : KASH domain containing 5

KIT : v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogène homolog = SCFR

KITL : v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogène homolog ligand = SCF

L

LDG : Laboratoire de Développement des Gonades

LH : Hormone Lutéinisante

LHX8 : LIM Homeobox 8

LIF : Leukemia Inhibitory Factor

LIG4 : protéine Ligase

LINK : Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton

LRP : Laboratoire de Radiopathologie

M

MDC1 : Mediator of DNA Damage Checkpoint 1

MEIOB : Meiosis specific with OB-fold

MEIOC : Meiosis specific with coiled-coil domain

MEIOSIN : MEIOSis INitiator

MIV : Maturation *In Vitro*

MLH-1 : MutL homolog-1

MLH-2 : MutL homolog-2

MO : Moelle Osseuse

MRE11 : Meiotic REcombination 11

MRN : complexe MRE11, RAD50, NBS1

MRX : complexe MRE11, RAD50, XRS2 chez *S. cerevisiae*

MSH4 : MutS Homolog 4

MSH5 : MutS Homolog 5

MSUC : Silencing Méiotique de la Chromatine non synapsée

mSV : millisievert

mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

N

NANOG : Nanog homeobox

NANOS3 : Nanos homolog 3

NBS1 : Nijmegen Breakage Syndrome protein 1

NCO : Non-CrossOvers

NHEJ : Non Homologous End Joining, jonction des extrémités non homologues

NOBOX : NOBOX oogenesis homeobox

NOTCH2 : Notch homolog 2

O

OCT4 : Octamer-binding transcription factor 4 = POU5F1

P

PALB2 : Partner And Localizer of BRCA2

PARP-1 : poly(ADP-ribose) polymérase 1

PAXX : Paralogue of XRCC4 and XLF

PF : Préservation de la Fertilité

PI3K : Phosphatidylinositol-3-Kinase

PIWI: P-element Induced Wimpy testis

PMAIP1 ou NOXA : Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1

PMS2 : PostMeiotic Segregation increased 2

Pol II : ARN Polymérase II

Pol λ : ADN Polymérase gamma

Pol δ : ADN Polymérase delta

Pol μ : ADN Polymérase mu

Prdm14 : PR domain zinc finger protein 14

PRDM9 : Méthyltransférase protéine PR Domain-containing 9

PUMA : P53 Upregulated Modulator of Apoptosis

R

RAD50 : DNA repair protein 50

Rad51 : DNA repair protein 51

REC8 : Recombinase-8

REV7 : mitotic arrest deficient 2 like 2 MAD2L2

RF : Replication Fork (= fourche réplivative)

RH : Recombinaison Homologue

RI : Rayonnement Ionisant

RNF168 : Ring Finger protein 168

RNF8 : Ring Finger protein 8

ROS : espèces Réactives de l'Oxygène

RPA : Replication Protein A

RSPO1 : R-Spondin 1

S

SDF1 : Stromal cell Derived Factor 1

SDSA : Synthesis-Dependent Strand Annealing

SG : Semaine de Grossesse

SHLD1 : Shieldin complex subunit 1

SHLD2 : Shieldin complex subunit 2

SHLD3 : Shieldin complex subunit 3

siRNA : Small interference RNA

SMC-1 β : Structural Maintenance of Chromosomes-1 β

SMC-3 : Structural Maintenance of Chromosomes-3

SN : Surrounded Nucleolus

SOHLH1 : Spermatogenesis and Oogenesis specific basic Helix-Loop-Helix 1

SOHLH2 : Spermatogenesis and Oogenesis specific basic Helix-Loop-Helix 2

SOX17 : Sex-determining région Y-box 17

SOX2 : Sex-determining région Y-box 2

Sox9 : Sex-determining région Y -box 9

SPATA22 : Spermatogenesis Associated 22

Spo11 : initiator of meiotic double stranded breaks

SPO11-TOPVIB-like : Sporulation protein homolog-11-topoisomérase-like de type VI

Sry : Sex determining region of Y chromosome

SSA : Single-Strand Annealing

STAG3 : Stromal 89 antigen 3

STRA8 : Stimulated by Retinoic Acid 8

SUN1 : Sad1 and UNC84 domain containing 1

SYCP1 : Synaptonemal Complex Protein 1

SYCP2 : Synaptonemal Complex Protein 2

SYCP3 : Synaptonemal Complex Protein 3

T

TdT : Terminal deoxynucleotidyl Transferase

TEL : Transfert d'Énergie Linéique

Tfap2c : Transcription factor AP-2 gamma

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

TO : Transposition Ovarienne

Topo VI : Topo-isomérase VI

TRAIL : Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand

TSC : Tuberous Sclerosis Complex

V

Vasa : homologue murin de Vasa

W

WNT4 : Wingless-type MMTV integration site family, member 4

WRN : Werner syndrome RecQ like helicase

X

XLF : Non-Homologous End Joining factor 1 (= NHEJ1)

XRCC1 : X-ray Repair Cross Complementing 1

XRCC4 : X-ray Repair Cross Complementing 4

Y

YTHDC2 : YTH Domain Containing 2

Z

ZP : Zone Pellucide

γ

γ : gamma

γ H2AX : variant « X » de l'histone 2A phosphorylé en position γ sur la sérine 139

Numérique

53BP1 : Tumor Protein P53 Binding Protein 1

Note concernant la nomenclature du manuscrit : la nomenclature utilisée pour le manuscrit sera celle recommandée par la HUGOgene database, c'est à dire *GENE1*/PROTEINE1 chez l'Homme et *Gène1*/PROTEINE 1 chez la souris.

AVANT-PROPOS

Au cours des dernières décennies, les progrès réalisés dans le diagnostic et le traitement des maladies oncologiques ont considérablement amélioré le taux de survie à long terme des jeunes patientes. Cependant, ils peuvent avoir des effets iatrogènes sur leur fertilité allant d'une diminution de la fertilité à une stérilité complète (W.H.B. Wallace, Thomson and Kelsey, 2003; Sauvat *et al.*, 2009; Edelman *et al.*, 2014). L'étude de l'impact des traitements anticancéreux sur la fertilité féminine est donc une problématique majeure de santé publique. Grâce à la cryopréservation d'ovocytes/embryons et/ou de tissu germinale, la préservation de la fertilité (PF) a amélioré le succès de conception chez les femmes infertiles ayant survécu à un cancer (Garcia-Velasco *et al.* 2013; Marklund *et al.* 2021; Mayeur *et al.* 2021). Cette activité est en constante progression avec plus de 8200 patientes ayant choisi de cryoconserver plus de 69 000 échantillons en France fin 2019 (Agence de la Biomédecine 2019).

Les irradiations, c'est-à-dire l'exposition à des rayonnements ionisants, utilisées en médecine sont à risque pour la fertilité féminine. Dans leur parcours de soins en oncologie, les patientes peuvent être exposées à une large gamme de doses d'irradiation. Les traitements curatifs, comme la radiothérapie, sont des irradiations à fortes doses qui nécessitent une PF lorsque les ovaires sont compris dans le champ d'irradiation. A ce jour, il n'existe pas de recommandation de PF pour des irradiations à de faibles doses. Pourtant, la prise en charge diagnostic nécessite de telles expositions (radiographies, scanners) de manière répétée et dans un court laps de temps. Elles sont réalisées en amont des traitements curatifs et de la prise en charge en PF. L'impact de l'exposition à des faible(s) dose(s) d'irradiation sur la fertilité féminine n'est à ce jour pas démontré et il reste de nombreuses questions quant aux effets des fortes doses d'irradiation.

La prise en charge en PF féminine est lourde avec des risques médico-chirurgicaux (stimulation ovarienne, anesthésiques, hémorragiques...) non négligeables pour des patientes dont l'état général est altéré. Pourtant, la réutilisation des ovocytes cryoconservés dans le cadre de la PF reste très limitée avec seulement un peu plus d'une centaine de tentatives d'assistance médicale à la procréation en 2019 (Agence de la Biomédecine 2019) dont certaines probablement pour les mêmes patientes. En pratique, les patientes se voient conseiller une contraception par leur oncologue pour une durée variable de l'ordre de 18 à 24 mois après la fin des traitements. Passé ce délai et en cas de projet parental, le praticien leur conseille arbitrairement de concevoir naturellement après un bilan d'évaluation de leur fertilité résiduelle (clinique, échographique, biologique). Une majorité des patientes adressées en PF conserve une fertilité naturelle résiduelle et de nombreuses grossesses spontanées ont été rapportées, sans suivi particulier des enfants. Le matériel cryoconservé est donc aujourd'hui considéré uniquement comme un stock de secours, ce qui soulève un certain nombre de questions :

Doit-on proposer d'emblée aux patientes une conception naturelle après exposition à des traitements reprotoxiques ou vaut-il mieux utiliser le stock d'ovocytes cryoservés ? Existe-t-il un risque héréditaire après exposition aux traitements anticancéreux ? Quels sont les ovocytes résistants chez les mammifères ? Comment les ovocytes ont survécu à des stress génotoxiques ?

En clinique, les effets iatrogènes des traitements anticancéreux sur la fertilité féminine ne sont donc actuellement envisagés que sous un angle quantitatif avec la crainte de la survenue future de difficultés voire d'incapacité complète à concevoir naturellement. Pour preuve, la PF est parfois même réalisée après traitement afin d'obtenir une « quantité » d'ovocytes suffisante en banque, permettant d'augmenter les chances de grossesses futures (Wikander et al. 2021). J'ai donc souhaité m'intéresser à la qualité ovocytaire des ovocytes radio-résistants (ayant survécu après irradiation) et notamment aux mécanismes de réparation de l'ADN mis en jeu par l'ovocyte post-natal pour conserver (ou non) l'intégrité de son information génétique face à des stress exogènes.

Né de problématiques cliniques, ce travail nécessite une approche expérimentale de l'impact des rayonnements ionisants utilisés dans le domaine médical (X et gamma) pour

- i) évaluer la radiosensibilité ovocytaire notamment aux faible(s) dose(s),
- ii) induire des dommages à l'ADN et analyser comment l'ovocyte post-natal y répond.

Nous avons d'abord travaillé sur le modèle murin historiquement utilisé en radiobiologie et facilement manipulable. Grâce à une collaboration avec le service de Gynécologie-Obstétrique et avec le Centre d'Etude et de Conservation des Œufs et du Spermé humains (CECOS) de l'hôpital Antoine-Béclère, nous avons également accès à du matériel de recherche nous permettant d'appréhender pour la première fois la radiotoxicité sur l'ovocyte humain à travers des modèles de culture organotypique et de xénogreffe.

Afin de poser le contexte de notre travail, une vision non exhaustive de la gamétogenèse femelle nous permettra de définir **l'ovocyte post-natal dans des conditions physiologiques**, avec une attention particulière sur les facteurs clés de l'homéostasie de la lignée germinale chez les mammifères femelles. Puis, nous verrons que **les rayonnements ionisants** peuvent altérer la **fertilité féminine d'un point de vue quantitatif et qualitatif** à cause d'**effets cellulaires** spécifiques. Enfin, nous questionnerons les régulations de l'intégrité génétique de l'ovocyte post-natal par l'étude des mécanismes moléculaires mis en jeu dans **la réparation de dommages à l'ADN** radio-induits.

INTRODUCTION

1. L'ovogenèse

L'ovogenèse (du latin ovum et genesis, désignant la genèse de l'œuf) correspond à la gamétogenèse femelle. C'est un processus biologique aboutissant après la puberté à la formation d'un gamète femelle mature apte à donner par fécondation la cellule œuf. Chez le mammifère femelle, elle se déroule en grande partie au niveau des ovaires, organes pairs situés au niveau de la cavité abdominale et qui associent le développement de cellules germinales (CGs) à celui de cellules somatiques.

Les CGs sont spécifiées très tôt au cours du développement et une grande partie de l'ovogenèse a lieu pendant la vie fœtale. Après leur spécification, les CGs vont connaître une phase de multiplication au cours de laquelle elles vont migrer vers les gonades en formation où elles acquièrent la compétence gamétique et sont orientées vers un destin sexuel. Elles entreront ensuite en méiose, processus biologique leur permettant d'évoluer vers un statut haploïde. Le développement de la lignée germinale est orchestré par leur environnement somatique qui va progressivement s'organiser autour d'elles de manière étroite lors de la folliculogénèse qui a lieu principalement en période post-natale (Figure 1).

1.1. Mise en place de la lignée germinale femelle

Nous aborderons dans ce chapitre les points clés des origines de la lignée germinale femelle nécessaires à la compréhension de son devenir post-natal.

1.1.1. Origine des cellules germinales

1.1.1.1. Les cellules germinales primordiales

Spécification des cellules germinales primordiales :

Chez les mammifères, la spécification des cellules germinales primordiales (CGPs) est induite de manière paracrine à partir de l'épiblaste par des facteurs de croissance de la famille des « bone morphogenetic protein » (BMP). Ceux-ci entraînent l'expression de facteurs de transcription. Chez la souris, l'expression des trois gènes B-lymphocyte-induced maturation protein 1 (*Blimp1*), PR domain zinc finger protein 14 (*Prdm14*) et Transcription factor AP-2 gamma (*Tfap2c*) sont nécessaires et suffisants à la formation de CGPs (Nakaki et al. 2013).

Chez l'Homme elle requiert en plus l'expression de Sex-determining région Y-box 17 (SOX17) (pour revue Jostes et Schorle 2018). Ces gènes permettent la répression du programme génétique somatique et le maintien de l'état de pluripotence des CGPs via l'expression de facteurs tels que Sex-determining région Y-box 2 (SOX2), Nanog homeobox (NANOG) et Octamer-binding transcription factor 4 (OCT4) (pour revue Saitou 2009).

Les CGPs sont ainsi spécifiées vers 6,25 jours post-coïtum (jpc) chez la souris et vers la 2^{ème} semaine de grossesse (SG) dans l'embryon humain (Lawson et al. 1999) (Figure 1). Dès leur spécification les CGPs vont commencer à se multiplier et exprimer des facteurs spécifiques nécessaires à leur survie tels que Nanos homolog 3 (NANOS3) et Dead end homolog 1 (DND1) (pour revue Monget et al. 2012).

Migration et colonisation des CGPs :

D'une position extra-embryonnaire à la racine de l'allantoïde, les CGPs vont rejoindre la cavité abdominale et se rapprocher du mésonéphros en position intra-embryonnaire. Ce rapprochement est passif puis actif. Le déplacement passif des CGPs est permis par la morphogenèse embryonnaire. En effet, le développement important de l'ectoblaste et l'augmentation rapide de la cavité amniotique vont invaginer une partie du lécithocèle et du mésoderme adjacent lors du processus de délimitation embryonnaire qui va former l'endoderme primitif intestinal. Ce processus entraîne de manière passive les CGPs en position intra-embryonnaire. Puis, les CGPs migrent de manière active le long du sillon primitif et de l'intestin postérieur et à travers le mésentère dorsal jusqu'aux crêtes génitales, renflements mésonéphrotiques (les reins embryonnaires). Elles sont guidées par des signaux chémoattractants assurant leur bon adressage comme les facteurs somatiques v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogène homolog ligand (KITL) (Farini et al. 2007) et stromal cell derived factor 1 (SDF1) (Ara et al. 2003; Kathleen A. Molyneaux et al. 2003), dont les récepteurs sur les CGs sont respectivement v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogène homolog (KIT) et chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4).

La colonisation des crêtes génitales par les CGPs intervient à partir de la 6^{ème} SG chez la femme et à partir de 10,5 jpc chez la souris (Figure 1). Elles contribuent, avec les cellules du mésenchyme primitif et les cellules de l'épithélium cœlomique, à la formation de la gonade indifférenciée (Motta et Makabe 1982; K. A. Molyneaux et al. 2001). Au sein de la gonade indifférenciée, les CGPs vont poursuivre leur prolifération et perdre leur motilité les classant au stade de CGPs post-migratoires. Leur nouvel environnement somatique va progressivement orienter leurs compétences.

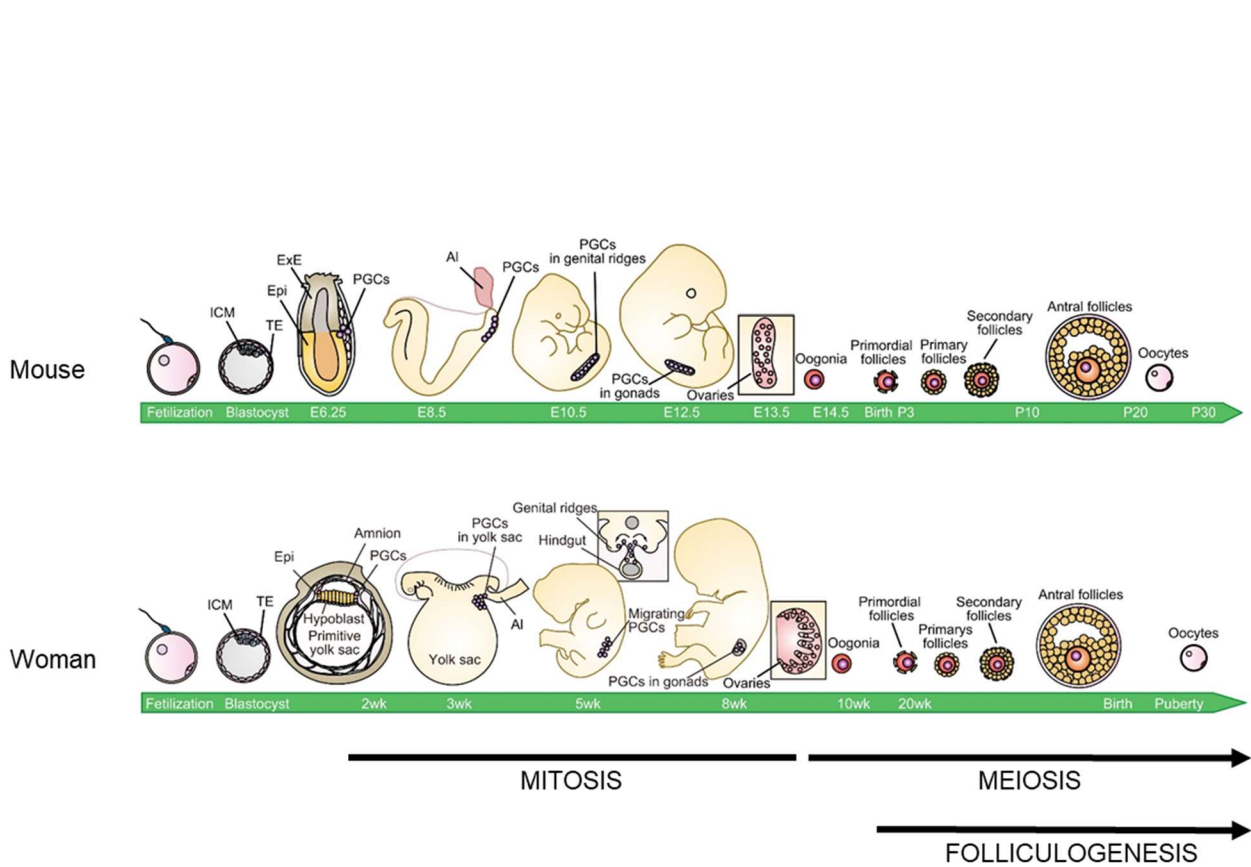


Figure 1 : Représentation schématique du développement de la lignée germinale femelle de la souris et de la femme (adapté de Saitou et Miyauchi, 2016).

ICM: masse cellulaire interne; TE: trophoctoderme; Epi: épiblaste; AI: allantoïde.

Tout au long de leur migration et après la colonisation, les CGs prolifèrent très rapidement par mitoses. D'une centaine, leur nombre doublerait toutes les 16h entre 8,5 et 13,5 jpc (Tam et Snow 1981).

L'extinction transcriptionnelle :

Au moment de la spécification, les CGs sont programmées pour maintenir un état de pluripotence tout en acquérant des marqueurs de la lignée germinale. L'activité transcriptionnelle des CGPs est drastiquement réprimée afin d'éviter une différenciation en cellules somatiques ou un engagement trop précoce dans le programme méiotique. Cela est permis par l'inhibition de l'acide ribo-nucléique (ARN) polymérase II (Pol II) mais d'autres mécanismes sont impliqués comme des remodelages chromatinien et les ARN interférants P-element Induced Wimpy testis (PIWI) (pour revue Sienski, Dönertas, et Brennecke 2012; Lebedeva et al. 2018).

Modifications épigénétiques :

Au cours de la migration, et surtout après leur localisation à la gonade indifférenciée les CGPs sont soumises à une profonde reprogrammation épigénétique. Cette dernière consiste en une déméthylation globale de l'ADN permettant l'enlèvement des empreintes parentales, la réactivation du chromosome X et la décondensation de la chromatine. Elle coïncide avec l'acquisition de la pluripotence et permettrait de remettre à zéro toute anomalie de méthylation ou épimutation acquise, empêchant ainsi sa transmission à la génération suivante (pour revue Hill et al. 2018; H. Sasaki et Matsui 2008). L'hypométhylation globale de l'ADN sera maintenue chez la femelle jusqu'après la naissance (Figure 2).

1.1.1.2. Acquisition de la compétence gamétique

A l'arrivée dans la gonade indifférenciée, les CGPs sont d'abord bipotentiels (absence de détermination sexuelle) et indifférenciés. Le profil d'expression de gènes des CGPs change lorsqu'elles colonisent la gonade (pour revue Ewen et Koopman 2010). L'expression des marqueurs des CGPs antérieurs à la colonisation diminue. De nouveaux marqueurs déterminants de la lignée germinale s'expriment. *Deleted in azoospermia like (DAZL)* est une protéine de liaison aux ARN exprimée dans les CGs des deux sexes de 11,5 jpc à la fin de la gamétogénèse (Saunders et al. 2003). *Dazl* est capital pour l'avancement dans la voie germinale puisque son invalidation entraîne un blocage des CGs au stade indifférencié et la mort cellulaire (Kee et al. 2009; Fu et al. 2015).

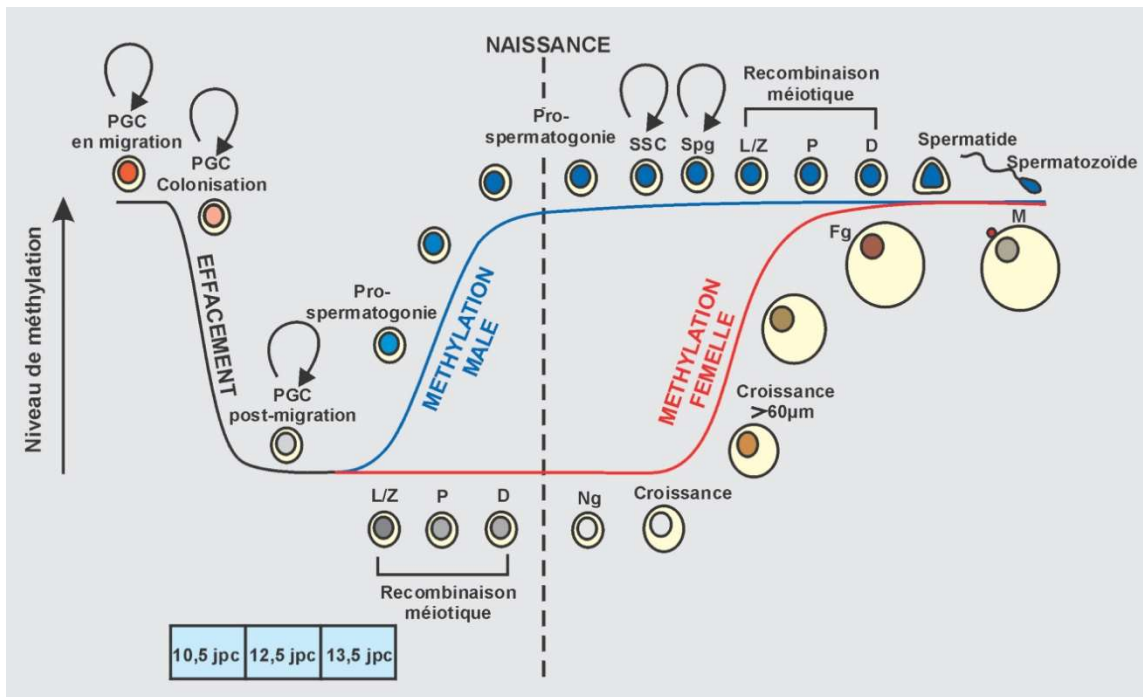


Figure 2 : Cinétique d'acquisition de la méthylation de l'ADN au cours du développement de la lignée germinale mâle et femelle chez la souris (Bourc'his et Proudhon 2008).

Les CGPs subissent un effacement de leurs profils de méthylation déclenché par leur arrivée dans les ébauches gonadiques vers 10,5 jpc. À 12,5 jpc, ces cellules sont globalement déméthylées, alors que le gène *Sry* commence à s'exprimer dans la gonade des individus mâles. À 13,5 jpc, les CGs mâles reméthylent leur génome. Les CGs femelles rentrent à ce stade en méiose, et ne se reméthylent qu'après la naissance, à chaque cycle d'ovulation, dans les cohortes successives d'ovocytes en fin de croissance basale. Du fait de cette chronologie de reméthylation post-natale, la lignée germinale femelle pourrait cependant être moins exposée à des altérations survenant en période *in utero*, comparée à la lignée germinale mâle qui subit à la fois la déméthylation et la reméthylation avant la naissance. SSC : cellules souches des spermatogonies; L/z : leptotène/zygotène; P : pachytène; D : diplotène; Spg : spermatogonie; Fg : ovocyte mûr; Ng : ovocyte quiescent; M : ovocyte en métaphase II de la méiose, après ovulation

L'homologue murin de Vasa (*Vasa/ DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 (Ddx4)*) est également exprimé spécifiquement à partir de la colonisation dans les CG mâles et femelles chez la souris (Tanaka et al. 2000). C'est une protéine de la famille des ARN hélicases dont l'inactivation empêche la méiose mâle chez la souris (Tanaka et al. 2000). Cette protéine initialement décrite dans le développement des CGs chez la *Drosophila* femelle est universellement utilisée comme marqueur spécifique de la lignée germinale.

Après colonisation de la gonade, les CGs passent d'un état pluripotent à un état bipotent, où elles sont engagées vers un destin germinale mâle ou femelle. Les changements transcriptionnels les rendent compétentes à répondre à l'environnement gonadique et notamment à entamer une voie de différenciation germinale mâle (dans les testicules) ou femelle (dans les ovaires). Toutefois, elles continuent d'exprimer certains marqueurs de pluripotence comme *Oct4*, *Nanog* et *Sox2* jusqu'à la différenciation sexuelle.

1.1.1.3. Détermination sexuelle somatique

L'environnement somatique va jouer un rôle capital pour la détermination sexuelle des CGs (Figure 3).

Les cellules somatiques des gonades XX et XY sont d'abord bipotentiels. Elles expriment un programme transcriptionnel identique, avec un équilibre entre facteurs pro-ovariens et pro-testiculaires. Un changement dans le programme transcriptionnel somatique va établir une dichotomie sexuelle vers 11 jpc chez la souris (Koopman et al. 1991). L'expression de Sex determining Region of Y chromosome (*Sry*) dans certains précurseurs somatiques va induire une intense prolifération des cellules de l'épithélium coelomique (Schmahl et al. 2000) et l'expression de Sex-determining région Y -box 9 (*Sox9*) va permettre à ces cellules de se différencier en cellules de Sertoli. Il s'ensuit une cascade d'activation de gènes et de signaux paracrines permettant la formation du testicule. En l'absence d'expression de *Sry* la différenciation femelle présente deux grandes voies principales : la voie de signalisation R-spondin 1 / Wingless-type MMTV integration site family, member 4 / Catenin Beta 1 (*RSPO1/WNT4/CTNNB1*) et la cascade génétique induite par forkhead box I2 (*FoxI2*). Ces deux voies exercent des fonctions spécifiques – telles que la survie des CGs XX ou la prolifération cellulaire – et complémentaires – telles que la différenciation des cellules de la granulosa et l'inhibition de la voie de différenciation mâle. L'activation de ces deux voies dans l'ovaire fœtal est cruciale pour sa différenciation et son développement (pour revue Sarraj et Drummond 2012; Capel 2017).

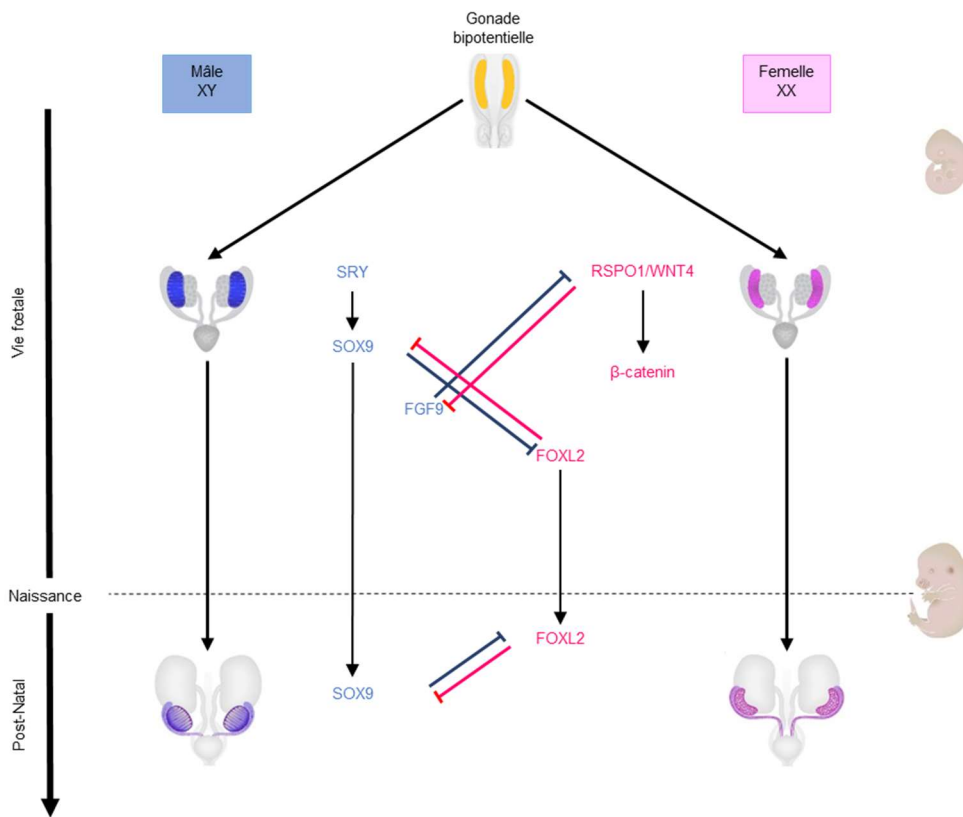


Figure 3 : Schéma simplifié de l'antagonisme entre les voies de différenciation sexuelles somatiques mâle et femelle (adapté de DiNapoli and Capel, 2008).

1.1.1.4. Du cycle mitotique à l'initiation méiotique

Pendant la vie fœtale, une prolifération cellulaire "groupée" va permettre d'harmoniser les CGs avant l'initiation méiotique. Les CGPs conservent une activité mitotique intense dans les gonades indifférenciées mais avec une cytodièrese incomplète conduisant à la formation de clusters. Il s'agit de groupes de CGs reliées entre elles par des ponts cytoplasmiques et se divisant de façon synchronisée (M. E. Pepling et Spradling 1998). Ces communications entre CGs sont très conservées d'un point de vue évolutif des invertébrés à l'Homme. Elles ont d'abord été caractérisées chez *Drosophila melanogaster* puis chez le mammifère comme la souris avec la mise en évidence de Testis-expressed gene 14 (*Tex14*) (Greenbaum et al. 2006). L'inactivation *Tex14* entraîne la stérilité des mâles mais non des femelles (Greenbaum et al. 2006). Pour autant ces communications entre CGs ont des rôles essentiels chez la femelle pour protéger et harmoniser les CGs au sein d'un même cluster. En effet, elles permettent un partage des ressources pouvant même aller jusqu'au sacrifice d'une CG lorsqu'une cellule entre en apoptose (L. Lei et Spradling 2016). De plus, elles permettraient de limiter les risques de mutations *de novo* ou d'épimutations en régulant la cyclicité des CGs au sein d'un même cluster (D. H. Nguyen, Jaszczak, et Laird 2019). Enfin, elles permettent l'harmonisation du passage de la pluripotence à la méiose, probablement par dilution de facteurs régulateurs (Lei Lei et Spradling 2013; Soygur et al. 2021). En effet, chez les souris *Tex14* *-/-* la perte de pluripotence et l'entrée en méiose sont anormalement accélérées.

La transition d'un cycle mitotique vers un cycle méiotique définit le passage des CGs au stade ovocytaire. C'est le premier signe visible d'engagement des CGs dans la gamétogenèse dans l'ovaire. Dès lors les CGs arrêtent définitivement de proliférer et perdent l'expression des gènes de pluripotence (Western et al. 2010; Le Rolle et al. 2021). Chez la souris femelle, cette transition est hautement synchronisée grâce aux ponts cytoplasmiques et suit un axe rostro-caudal à partir de 13,5 jpc (Speed 1982; Bullejos et Koopman 2004; Menke, Koubova, et Page 2003).

L'initiation de la méiose dépend de facteurs intrinsèques et extrinsèques.

Au sein des CGs, le complexe Stimulated by retinoic acid 8 (STRA8) / meiosis initiator (MEIOSIN) joue un rôle de facteur de transcription essentiel à l'initiation méiotique (Ishiguro et al. 2020). Les transcrits méiotiques sont ensuite stabilisés par le complexe meiosis specific with coiled-coil domain (MEIOC) / YTH domain containing 2 (YTHDC2) pour permettre une progression en méiose des CGs (Soh et al. 2017; Abby et al. 2016).

La transition vers la méiose dépend également de l'environnement des CGs. Il existe une régulation paracrine grâce à des facteurs diffusibles somatiques jouant un rôle clé dans l'entrée

en méiose des CGs. En effet, des CGs XY acquièrent la capacité d'entrer en méiose dans des testicules fœtaux cultivés en contact avec des ovaires fœtaux (Adams et McLaren 2002). L'entrée en méiose de CGs XX est, quant à elle, empêchée par la culture avec un testicule fœtal (Guerquin et al. 2010). L'AR produit par le mésonéphros active l'expression de *Stra8* et de *Meiosin* et a longtemps été considéré comme le facteur central activateur de la méiose (Ishiguro et al. 2020; Baltus et al. 2006). Cependant, l'invalidation génétique de la synthèse ou des récepteurs nucléaires de l'AR n'empêchent pas l'expression de *Stra8* et l'initiation méiotique dans l'ovaire fœtal murin (Chassot et al. 2020; Vernet et al. 2020), remettant en cause le dogme selon lequel l'AR serait le seul signal de transition vers la méiose femelle.

L'initiation de la méiose est donc multifactorielle et le contexte somatique permet le déclenchement d'un programme méiotique spécifique dans un timing précis avec notamment l'expression de gènes méiotiques spécifiques tels que synaptonemal complex protein 3 (*Sycp3*), initiator of meiotic double stranded breaks (*Spo11*) et DNA meiotic recombinase 1 (*Dmc1*), essentiels pour l'appariement des chromosomes et la recombinaison homologue de la méiose (Koubova et al. 2014; Baltus et al. 2006; Saba, Wu, et Saga 2014).

1.1.2. Origines des cellules somatiques ovariennes

L'environnement somatique va s'organiser autour des CGs au cours du développement fœtal femelle (Figure 4).

Dès le stade de gonade indifférenciée, on retrouve chez la femme une organisation tissulaire en cordons sexuels primitifs par pénétration de l'épithélium cœlomique au sein du mésenchyme (Pelliniemi et Lauteala 1981; Francavilla et al. 1990; M. Satoh 1991). Ceux-ci vont ensuite dégénérer et des cellules épithéliales vont former un nouvel ensemble de cordons sexuels restant en surface (cortex) de l'organe, les cordons ovigères, délimitant une partie plus profonde, la médulla (Funkuda 1976).

Chez la souris, l'ovaire fœtal conserve globalement l'aspect de blastème inorganisé lors des deux premières semaines du développement. Les CGs restent regroupées durant le développement fœtal sous la forme de cystes délimités pouvant se fragmenter et se réassocier sous la forme de nids ovigères visibles vers 14,5 jpc (Lei Lei et Spradling 2013).

Les cordons ovigères chez la femme et les nids ovigères chez la souris femelle correspondent donc à des groupes de CGs entourées de cellules somatiques spécifiques, progénitrices des cellules de la granulosa (McLaren 1991). Ces cellules pré-granulosa ont une origine multiple (Figure 4). La plupart dérivent de l'épithélium cœlomique notamment dans la partie externe du cortex ovarien mais celles plus en profondeur dans l'ovaire peuvent avoir une origine mésonéphrotique (Mork et al. 2012). Les cellules pré-granulosa deviendront cellules de la granulosa vers la naissance chez la souris, entourant alors un seul ovocyte (cf. paragraphe 1.3.3.1.). Les cellules de la thèque, qui se différencient plus tard dans l'ovaire post-natal, dériveraient de cellules du stroma ovarien (Erickson et al. 1985) mais leur origine précise est encore débattue.

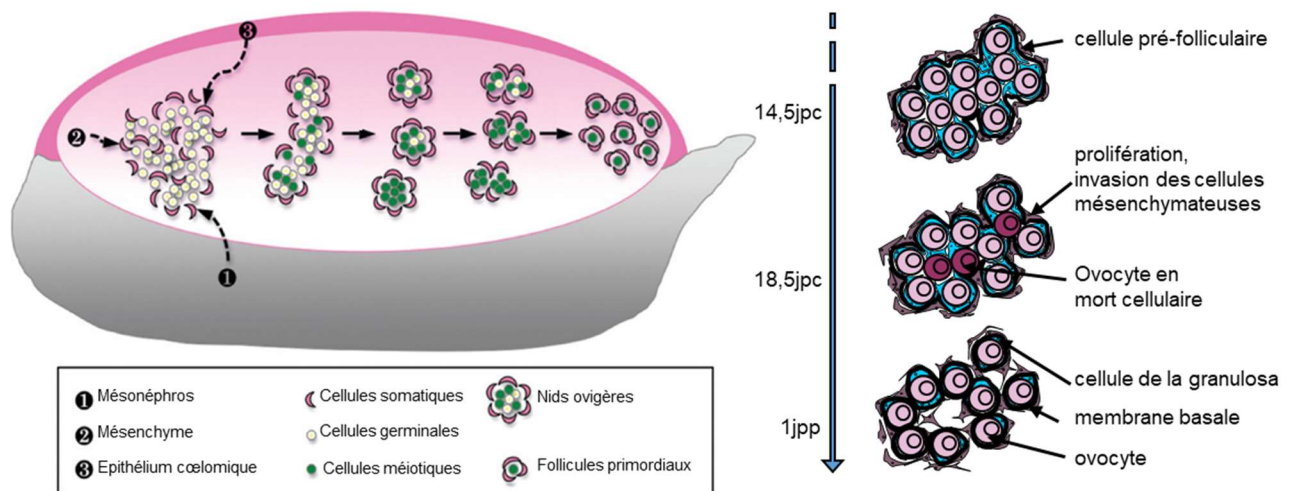


Figure 4 : Représentation schématique de la morphogénèse ovarienne (adapté de Mazaud Guittot et al., 2006).

Une fois que les CGs ont colonisé l'ovaire (11,5jpc), elles se mélangent aux cellules somatiques provenant du ❶ mésonephros adjacent, ❷ du mésenchyme et ❸ de l'épithélium cœlomique. Les cellules somatiques s'agrègent autour des CGs et celles-ci entrent en méiose. Dans la gonade XX, vers 14,5 jpc chez la souris, les CGs s'agrègent entre elles et s'entourent de cellules somatiques pour former les nids ovigères. En fin de vie fœtale, les cellules somatiques vont proliférer intensément, se différencier et commencer à envahir ces nids qui se rompent. Les nids ovigères se forment et autour de la naissance il y a rupture des cordons ovigères. Les cellules somatiques entourent alors les ovocytes individuellement et sécrètent une matrice extracellulaire, formant ainsi les follicules primordiaux.

1.2. La méiose

La méiose (du grec *meiōsis*, *réduire*) est un passage de la diploïdie à l'haploïdie par deux divisions cellulaires successives des CGs. C'est un processus spécifique à la reproduction sexuée et central dans la formation des gamètes (pour revue Gray et Cohen 2016). Les gamètes prennent la forme de spermatozoïdes et d'ovocytes (mammifères), de pollen et d'ovules (plantes à fleur) ou encore de spores (champignons). Pour des raisons didactiques nous présenterons les grandes étapes de l'ovogenèse de manière séquentielle mais les processus de développement des CGs et des cellules somatiques se chevauchent. Ainsi, la méiose se déroule parallèlement aux réarrangements des nids ovigères puis de la folliculogénèse (Figure 1).

1.2.1. Les différentes étapes

Le préalable nécessaire à la méiose est une phase répllicative de l'ADN spécifique (phase S ou stade pré-leptotène) (Figure 5). Durant cette phase pré-méiotique des cohésines spécifiques sont recrutées le long des chromosomes homologues permettant la formation d'axes chromosomiques.

La première division de méiose (méiose I ou méiose réductionnelle) aboutit à la séparation des chromosomes homologues entre deux cellules filles ($2n$). Elle nécessite deux processus interdépendants en prophase de première division de méiose (prophase I) : la réparation de cassures double-brin (CDBs) programmées de l'ADN, et l'appariement des chromosomes homologues avec notamment la mise en place du complexe synaptonémal (CS). La réparation de ces CDBs s'effectue par recombinaison homologue méiotique entre chromosomes homologues d'origine paternelle et maternelle à l'origine du brassage intrachromosomique de la méiose. C'est une différence importante avec la recombinaison homologue des cellules somatiques qui intervient non pas entre homologues mais entre les chromatides sœurs (cf. 3.). Elle joue également un rôle mécanique essentiel. En effet, elle aboutit à la formation de liens physiques entre chromosomes homologues, les chiasmata, indispensables à la bonne distribution des chromosomes entre les deux cellules filles (Bolcun-Filas et Schimenti 2012).

La seconde division de méiose (méiose II ou méiose équationnelle) correspond à la ségrégation des chromatides sœurs. Cette division méiotique s'apparente à une division mitotique classique sans répllication de l'ADN préalable. Au final, la méiose des mammifères aboutit à la formation de CGs haploïdes (n chromosomes) à une chromatide.

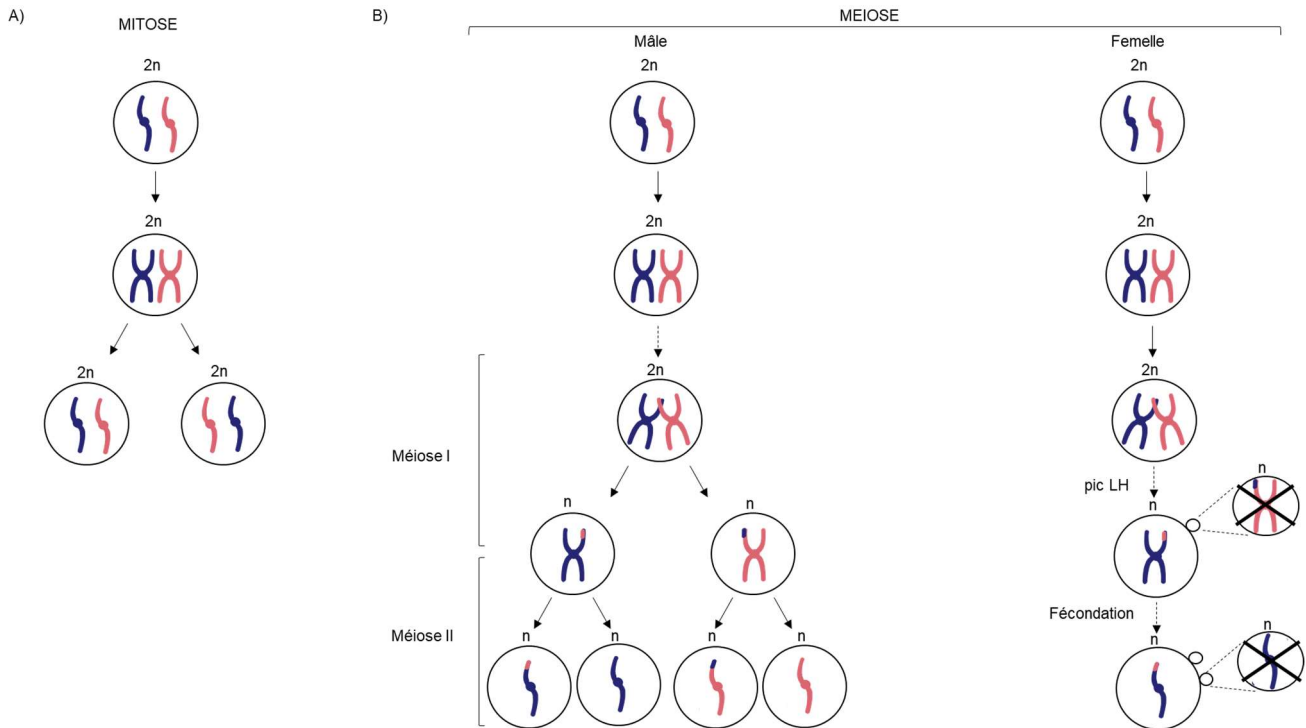


Figure 5 : Représentation schématique comparative de la mitose et de la méiose.

A) Cycle mitotique. La phase répliquative permet à une cellule diploïde contenant une paire de chromosomes homologues (un bleu, un rose) de générer les chromatides sœurs. La division cellulaire mitotique sépare les chromatides sœurs en deux cellules filles de contenu génétique identique.

B) La méiose. Une phase répliquative pré-méiotique permet de générer les chromatides sœurs. La recombinaison homologue méiotique intervient en prophase I. Chez le mammifère mâle (comme chez les champignons et chez les plantes) la méiose est continue et aboutit à la formation de quatre gamètes haploïdes génétiquement différents. Chez le mammifère femelle, la méiose s'arrête en fin de prophase I. Le pic de LH permet la reprise de la méiose I qui se termine par la ségrégation des chromosomes homologues. Cette division est asymétrique avec la création d'un premier globule polaire (GPI) abortif. Un nouveau blocage intervient au stade métaphase de deuxième division méiotique. La fécondation permettra la reprise de la méiose II avec séparation des chromatides sœurs et l'expulsion du deuxième globule polaire (GPII) non fonctionnel. La méiose femelle, si elle est complète, aboutit donc à la création d'une seule cellule haploïde.

1.2.2. Dimorphisme sexuel

Il existe un dimorphisme sexuel concernant notamment l'initiation et le déroulement de la méiose (Figure 5). Chez le mâle, c'est un processus continu qui débute à la puberté tandis que chez la femelle il est précoce et discontinu.

En effet, la méiose ovocytaire est initiée dès le développement fœtal chez de nombreux mammifères dont la souris et l'Homme (cf. 1.1.1.4.). L'entrée en méiose est synchronisée (entre 13,5 jpc et 15,5 jpc) chez la souris (Bullejos et Koopman 2004; McLaren 2000; Menke, Koubova, et Page 2003), alors qu'elle est plus tardive (à partir de 64 jpc) et très asynchrone, s'étalant sur plusieurs mois chez la femme (Frydman et al. 2017).

Le déroulement de la méiose ovocytaire est discontinu avec deux blocages : un arrêt en fin de prophase I et un arrêt en métaphase II. Chez la souris, l'arrêt en fin de prophase I débute vers 17,5 jpc, et se termine vers 1 jour post-procréation (jpp) (Borum 1961; Menke, Koubova, et Page 2003). Chez la femme, le timing du début de cet arrêt est moins précis puisqu'il serait compris entre 112 et 140 jpc selon les auteurs (Maheshwari et Fowler 2008; Geber et al. 2012) témoignant d'une durée de prophase I avant blocage bien plus importante que chez la souris. La période d'arrêt en fin de prophase I est également plus courte chez la souris avec une durée de quelques semaines tandis que celle-ci se prolonge sur plusieurs années chez la femme. Les mécanismes impliqués dans l'initiation de ce blocage et dans son maintien jusqu'après l'initiation de la folliculogénèse sont peu connus. Néanmoins la reprise méiotique en fin d'ovogénèse est empêchée grâce un taux élevé d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) intra-ovocytaire qui inhibe les cyclin dependent kinase 1 (CDK1) (pour revue He et al. 2021).

A partir de la puberté, dans les ovocytes pré-matures, ce blocage méiotique sera levé par le pic de LH juste avant l'ovulation. Il s'en suit rapidement un blocage en métaphase II avec reprise de la méiose II en cas de fécondation de l'ovocyte.

Le rendement quantitatif de la méiose femelle est beaucoup plus faible que celui de la méiose mâle. D'une part, chaque division méiotique femelle est asymétrique avec la production d'une cellule fonctionnelle et d'un globule polaire (GP), petite cellule abortive haploïde (n chromosomes à 2 chromatides et n chromosomes à 1 chromatide pour les GPI et GPII respectivement). D'autre part des phénomènes de mort ovocytaire et d'atrésie que nous aborderons dans les prochains chapitres participent à la perte de presque tous les ovocytes avant ovulation.

Dans l'ovaire post-natal, objet de notre étude, tous les ovocytes sont donc au même stade de méiose, bloqués en fin de prophase I.

1.2.3. La Prophase I de méiose

C'est la phase la plus longue de la méiose qui peut durer deux semaines chez la souris mâle (Oakberg 1956) contre seulement quelques minutes en cycle mitotique (Leblond et El-Alfy 1998; Liskay 1977). La prophase I se distingue de la prophase de mitose par : i) sa durée de résolution plus longue, ii) l'appariement des chromosomes homologues à travers un remaniement particulier de la structure chromatinienne, iii) la formation de CDBs programmées de l'ADN qui autorisent alors iv) des échanges de matériel génétique entre chromosomes homologues.

1.2.3.1. Le remaniement chromatinien

En prophase I, la chromatine subit un fort remaniement structurel. La structure des chromosomes change dès l'entrée en méiose pour former une structure spécifique composée par des boucles d'ADN reliées à un axe qui va permettre la mise en place du CS.

Cytologiquement, la prophase I est définie en cinq stades selon les changements morphologiques de la chromatine associés à l'assemblage et au désassemblage du CS (Borum 1961). Il s'agit des stades leptotène, zygotène, pachytène, diplotène suivi de la diacynèse, étape de transition avec la métaphase I (Figure 6).

Au stade leptotène (du grec *leptos*, mince, et *tenein*, étirer), les structures chromatiniennes deviennent visibles. Les cohésines favorisent le chargement progressif des protéines Synaptonemal Complex Protein 2 (SYCP2) et SYCP3 appelés éléments axiaux (EA) le long des axes de chaque homologue (Lammers et al. 1994; Offenberget al. 1998; Schalk et al. 1998). À ce stade, les chromosomes se compactent et commencent à être visibles en microscopie optique. Le long des chromosomes, il est possible de distinguer des régions plus ou moins épaisses irrégulièrement espacées à la manière d'un collier de perle. Cet aspect correspond à l'association presque complète des chromatides sœurs. Le nucléole est alors désassemblé.

Au début du stade zygotène (du grec *zugon*, paire), les chromosomes homologues s'alignent et les filaments transversaux, constitués par la protéine Synaptonemal Complex Protein 1 (SYCP1), vont relier les EA de deux chromosomes homologues. Le chargement de SYCP2 et SYCP3 est alors complet et continu le long des axes chromosomiques changeant leur dénomination qui passe d'EA à éléments latéraux (EL). L'appariement entre homologues est initié avec le chargement des protéines éléments centraux (EC) au centre de l'axe, achevant la formation d'une structure tripartite (deux éléments latéraux et un élément central) caractéristique du CS. C'est le synapsis qui s'étend vers les télomères des chromosomes, à la manière d'une « fermeture éclair » (Denise Zickler et Kleckner 2015). À ce stade, l'enveloppe nucléaire donne

l'impression de se fragmenter et la chromatine présente un aspect très condensé du fait de la compaction importante des chromosomes (Bézard et Mauléon 1984).

Au stade pachytène (du grec *pakhus*, épais), le CS est complet, recouvrant toute la longueur des axes chromosomiques. Chaque couple de chromosomes homologues ainsi formé est un bivalent. C'est à cette étape qu'ont lieu les échanges réciproques de matériel génétique entre homologues, les crossing-overs (CO). À ce stade, l'enveloppe nucléaire s'est reformée et les chromosomes sont suffisamment épais pour être individualisables en microscopie optique (Holm 1986).

Au début du stade diplotène ou dictyé (du grec *diploos*, double), le CS se dissout presque intégralement. Les homologues dupliqués d'une même paire (association de 4 chromatides appelée tétrade) restent connectés entre eux au niveau des points où ont eu lieu les CO entre une chromatide « paternelle » et une « maternelle ». Chaque point de contact physique est appelé chiasma qui est la conséquence morphologique d'un CO. Cette phase est reconnaissable par l'augmentation de taille du noyau, la chromatine qui s'affine suite à la séparation incomplète des chromosomes homologues et la présence du nucléole de nouveau visible.

Au stade diacinèse (du grec *dia* séparation, distinction, *kinésis*, mouvement), la structure du CS a presque totalement disparu ; seules des traces d'EL persistent. Les chiasmata glissent vers l'extrémité des bras des chromosomes (télomères) et leur nombre diminue. Ce phénomène est appelé « terminalisation » des chiasmata. À la fin de la diacinèse, l'enveloppe nucléaire et les nucléoles disparaissent et un fuseau de division analogue au fuseau mitotique est mis en place. Les différences cytologiques entre le stade diplotène et le stade diacinèse sont subtiles et nous considérerons dans la suite du manuscrit que les ovocytes post-nataux sont bloqués en fin de prophase I au stade diplotène.

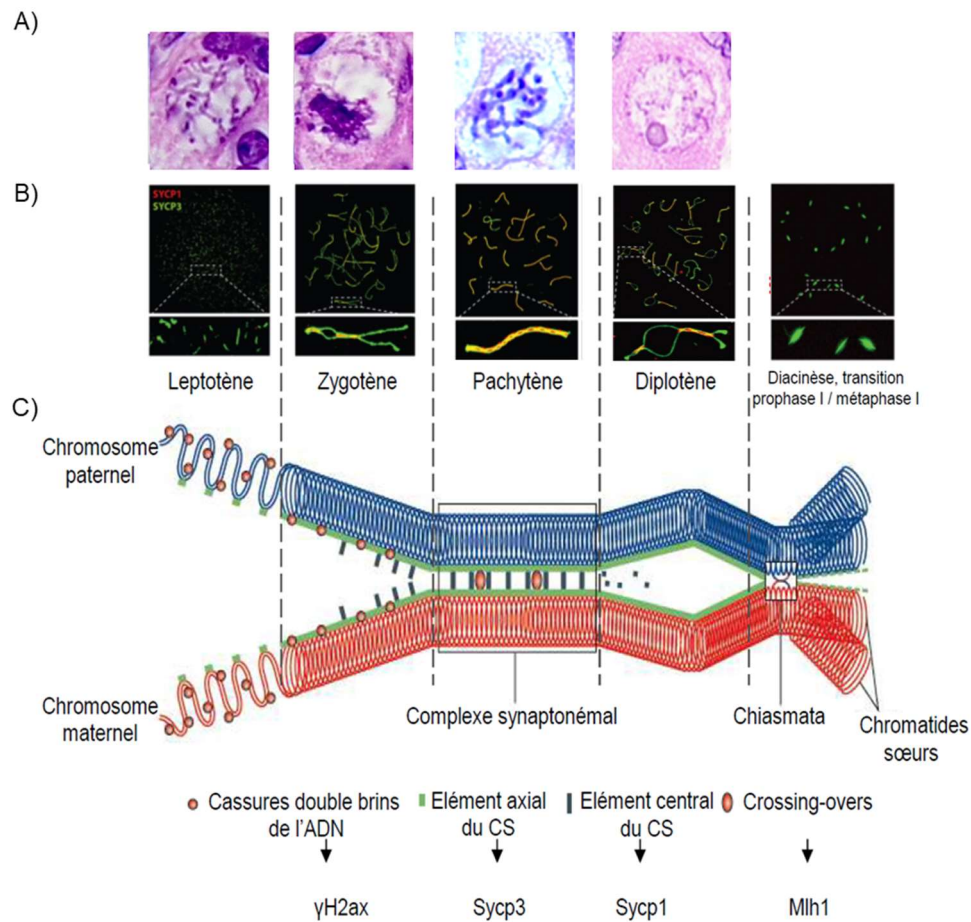


Figure 6 : Représentation schématique de l'assemblage du complexe synaptonémal au cours de la prophase I méiotique.

- A) Cellules germinales humaines à différents stades de prophase I de méiose femelle (coloration hématoxyline/éosine, d'après les données de Delphine Moison & Marine Poulain).
- B) Mise en place des éléments axiaux SYCP3 et des filaments transversaux constitués de SYCP1 en immunofluorescence chez le mâle (adapté de Stephen Gray et Paula E. Cohen, 2016).
- C) Représentation schématique de l'assemblage du complexe synaptonémal au cours de la prophase I méiotique (adapté de Burgoyne, Mahadevaiah and Turner, 2009).

1.2.3.2. L'appariement des chromosomes homologues

L'appariement des chromosomes est un processus multifactoriel, dynamique dans le temps et l'espace. Il dépend de mouvements de rapprochement des chromosomes qui s'ancrent à la membrane nucléaire par leurs extrémités télomériques au stade pré-leptotène. Chez les mammifères, cet ancrage est permis par le complexe Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton (LINK) composé de Sad1 and UNC84 domain containing 1 (SUN1) et KASH domain containing 5 (KASH5) (Ding et al. 2007; X. Wang et Pepling 2021). Il permet la migration des télomères le long de l'enveloppe nucléaire et la formation du « bouquet » à la transition leptotène/zygotène. L'initiation de l'appariement des homologues aux extrémités télomériques est concomitant à la formation du bouquet (Scherthan 2001; D. Zickler et Kleckner 1998).

Il dépend également de nombreux facteurs protéiques comme les cohésines méiotiques spécifiques Recombinase-8 (REC8) (Parisi et al. 1999), Stromal 89 antigen 3 (STAG3) (Prieto et al. 2001), et Structural maintenance of chromosomes-1 β et -3 (SMC-1 β , -3) (Revenkova et al. 2001) recrutées dès le stade pré-leptotène. Ces cohésines ont deux rôles principaux. Elles lient les chromatides sœurs entre elles ce qui éviterait l'envahissement de la chromatide sœur lors de la réparation des CDBs même si cela n'est pas clairement démontré. D'autre part elles créent des boucles d'ADN à l'origine du recrutement des EA du CS, favorisant l'appariement des chromosomes homologues (Bannister et al. 2004; Xu et al. 2005).

L'appariement des chromosomes homologues est interdépendant avec la réparation des CDBs programmées. En effet, les mutants du CS induisent des défauts de réparation des CDBs et l'invalidation de *Spo11*, à l'origine des CDBs, présente des défauts de synapsis (F. Baudat et al. 2000; Wojtasz et al. 2012). La recherche d'homologie lors de la réparation de l'ADN par recombinaison méiotique favorise l'appariement avec l'envahissement entre homologues, stabilisé par les CO au stade pachytène. Les premiers sites d'assemblages des EA corrént d'ailleurs avec les sites de CDBs.

Il est intéressant de noter qu'avant la mise en place du complète du CS, l'asynapsis entre chromosomes homologues est finement régulé grâce à des protéines recrutées après induction des CDBs programmées.

Les protéines méiotiques à domaine HORMA (HORMAD 1 et 2) sont importantes pour diriger la réparation des CDBs entre chromosomes homologues. Elles régulent notamment l'interaction entre homologues en empêchant la réparation entre chromatide sœurs (Carballo et al. 2008; Rinaldi et al. 2017; Vader et Musacchio 2014). Elles sont chargées au zones d'asynapsis des chromosomes en début de prophase I puis déchargées à mesure que les chromosomes homologues synapsent et enfin rechargées sur les chromosomes désynapsés au stade

diplotène (Wojtasz et al. 2009). L'association des protéines HORMAD est facilitée par RNF212, une SUMO E3 ligase qui envoie à la mort les ovocytes dont l'appariement ou la prise en charge des CDBs est défectueux (pour revue Lake et Hawley 2013). En effet, les mutations de RNF212 et d'HORMAD empêchent la mort ovocytaire induite à la fois par les mutants de recombinaison homologue et par ceux d'appariement des chromosomes (Qiao et al. 2018; Wojtasz et al. 2012). Les protéines HORMAD et RNF212 sont donc de beaux exemples de l'interdépendance qui existe entre appariement des chromosomes et réparation des CDBs méiotiques.

Il existe un autre mécanisme de signalisation des asynapsis : le silencing méiotique de la chromatine non synapsée (meiotic silencing of unsynapsed chromosome, MSUC). C'est un processus d'hétérochromatinisation et de régulation transcriptionnelle extensive qui conduit au silencing transcriptionnel des régions chromosomiques non synapsées au cours du stade pachytène (Turner et al. 2006; Cloutier et al. 2015).

1.2.3.3. Origine et prise en charge des CDBs méiotiques

La recombinaison homologue méiotique est un processus de réparation de l'ADN consécutif à la formation de CDBs programmées dans tout le génome et qui utilise comme matrice de réparation le chromosome homologue. Nous en aborderons ici les grandes étapes, la réparation de l'ADN par recombinaison homologue non méiotique étant présentée en partie 3.

1.2.3.3.1. Le complexe SPO11-TOPVIB-like

Le complexe Sporulation protein homolog-11-topoisomérase-like de type VI (SPO11-TOPVIB-like), est à l'origine de plusieurs centaines de CDBs programmées dans le génome (Scott Keeney 2001). SPO11 est une enzyme très conservée au cours de l'évolution qui dérive de la sous-unité catalytique (A) d'une famille de topoisomérases de type II, appelée Topo VI (Bergerat et al. 1997; S. Keeney, Giroux, et Kleckner 1997). Nous aborderons ici le rôle de SPO11 mais la mise en place de ces CDBs dépend également de la sous-unité catalytique (B) présente chez les archaebactéries et dont l'homologue a pu être identifié chez les eucaryotes dont *A. Thaliana* (Frédéric Baudat et Massy 2004), la souris (Robert et al. 2016) et récemment la levure (Claeys Bouuaert et al. 2021).

D'abord étudiée chez *Saccharomyces Cerevisiae*, l'induction des CDBs induites par SPO11 est complexe car elle nécessite conjointement une ouverture de la chromatine et la coopération d'une dizaine de protéines réparties en 3 sous-groupes : le cœur du complexe (Spo11, Ski8, Rec102, et Rec104), le complexe MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) et les protéines RMM (Rec114, Mei4, et Mer2) (Lam et Keeney 2014). SPO11 agit en dimère et coupe l'ADN double-brin

(ADNdb) par réaction transesterase, en se liant à chaque extrémité 5' de la CDB. Dans les mutants délétés *Spo11Δ*, aucune CDB méiotique n'est détectée (Cao, Alani, et Kleckner 1990) conduisant à des anomalies méiotiques et à la formation de spores non viables (Klapholz, Waddell, et Esposito 1985). Chez la souris femelle, le mutant *Spo11 -/-* présente un phénotype similaire. La progression méiotique va jusqu'au stade diplotène mais le nombre d'ovocytes diminue drastiquement dès 4-8 jpp de plus de 60% (Baudat *et al.*, 2000). Les femelles adultes mutantes sont infertiles par incapacité de produire des ovocytes matures euploïdes (Baudat *et al.*, 2000).

La répartition de ces CDBs n'est pas aléatoire. D'un point de vue temporel, leur apparition a lieu au stade leptotène de prophase I. D'un point de vue spatial, les CDBs sont très rares à proximité des centromères, des extrémités télomériques des chromosomes ainsi que des régions riches en microsatellites évitant des recombinaisons non homologues ou la création de chiasmata pouvant perturber la bonne répartition chromosomique en fin de méiose I (F. Baudat et Nicolas 1997; L. Chen *et al.* 2008). Elles se produisent à plus haute fréquence sur des sites programmés de décondensation de la chromatine, les points chauds, régulés par des mécanismes épigénétiques. En effet, la triméthylation sur la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4) par la métyltransférase protéine PR domain-containing 9 (PRDM9) est une marque d'histone indispensable à l'activité de SPO11 (pour revue Grey, Baudat, et de Massy 2018; J. Pan *et al.* 2011; Petes 2001).

1.2.3.3.2. Signalisation des CDBs méiotiques

La reconnaissance des CDBs se fait grâce au complexe MRN composé de trois protéines : Meiotic recombination 11 (MRE11), DNA repair protein 50 (RAD50) et Nijmegen breakage syndrome protein 1 (NBS1) (Carney et al., 1998). Il permet la libération de SPO11 grâce à son activité endonucléolytique.

Le complexe MRN va permettre le recrutement de protéines de la famille des phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) comme Ataxia Telangectasia Mutated (ATM) et ATM and Rad3-related (ATR). Ces kinases vont phosphoryler de nombreux substrats et notamment le variant « X » de l'histone 2A en position γ (γ H2AX) au niveau de la serine 139. Cette phosphorylation permet le recrutement au niveau des CDBs des protéines de réparation.

En méiose, la kinase ATM est impliquée dans la première vague de phosphorylation de l'histone H2AX immédiatement après la génération des CDBs, au stade leptotène. Elle permet d'exercer un feedback négatif sur l'activité SPO11 (Lange et al. 2011; Bolcun-Filas et Schimenti 2012). En effet l'étude de souris *Atm*^{-/-} montre une augmentation des CDBs (Barchi et al. 2008; Cooper et al. 2014).

La kinase ATR est impliquée dans une deuxième vague de phosphorylation de H2AX plus tardive. Cette voie de signalisation serait cruciale pour la bonne réparation des CDBs méiotiques (Pacheco et al. 2018).

Le marquage γ H2AX disparaît progressivement au milieu de la prophase I (stade pachytène) lorsque les CDBs sont réparées.

1.2.3.3.3. La recombinaison homologue méiotique

La création d'extrémités simple-brin va être prise en charge par des protéines spécifiques de la méiose (Figure 7). L'activité exonucléasique 3'-5' de MRE11 suivie de celle 5'-3' de l'exonucléase 1 (EXO1), va générer des portions d'ADN simple-brin (ADNsb) libres de part et d'autre de la CDB. Replication Protein A (RPA) et ses paralogues méiotiques meiosis specific with OB-fold (MEIOB) / spermatogenesis associated 22 (SPATA22) se lient à l'ADNsb et sont indispensables pour la bonne réparation des CDBs par recombinaison homologue (RH) méiotique (Souquet et al. 2013).

La recombinaison DNA repair protein 51 (RAD51) et son homologue spécifique de la méiose DMC1 sont ensuite chargés sur l'ADNsb pour effectuer la recherche d'homologie et l'invasion d'une chromatide du chromosome homologue (Bishop 1994; Lao et al. 2013). DMC1 orchestrerait l'échange de brin tandis que RAD51 agirait comme un co-facteur de DMC1 (Cloud et al. 2012). Cette recombinaison aurait été sélectionnée au cours de l'évolution pour sa capacité plus grande à tolérer des mésappariements de triplets de bases, permettant la recombinaison entre allèles d'origine parentale différente (J. Y. Lee et al. 2015; Steinfeld et al. 2019).

La recherche d'homologie est un processus complexe qui est régulé pendant la méiose pour éviter l'envahissement entre chromatides sœurs grâce à DMC1 mais également grâce à de multiples facteurs comme les cohésines méiotiques, les EA ou les protéines HORMAD décrits précédemment. D'autres protéines sont nécessaires pour stabiliser l'ADN simple-brin, favoriser le synapsis avec le brin homologue et son invasion, notamment MutS homolog 4 et 5 (MSH4, 5), ou encore Postmeiotic segregation increased 2 (PMS2), MutL homolog-1 et -2 (MLH-1,-2).

Suite à l'envahissement, il se forme une connexion entre l'ADNsb de la CDB et la matrice d'ADN double-brin de la chromatide du chromosome homologue. Cette étape entraîne sur la chromatide homologue le déplacement du brin d'ADN de même polarité formant une structure appelée D-loop. A partir de ce moment, deux voies de réparation de l'ADN par RH peuvent se mettre en place : soit 1) la formation d'une double jonction de Holliday dont la résolution aboutit à des événements de conversion génique associés ou non à la formation de CO par la voie du double strand break repair (DSBR) soit 2) la libération du brin homologue sans formation de double jonction de Holliday ni CO par la voie du synthesis-dependent strand annealing (SDSA) à l'origine des non-crossovers (NCO).

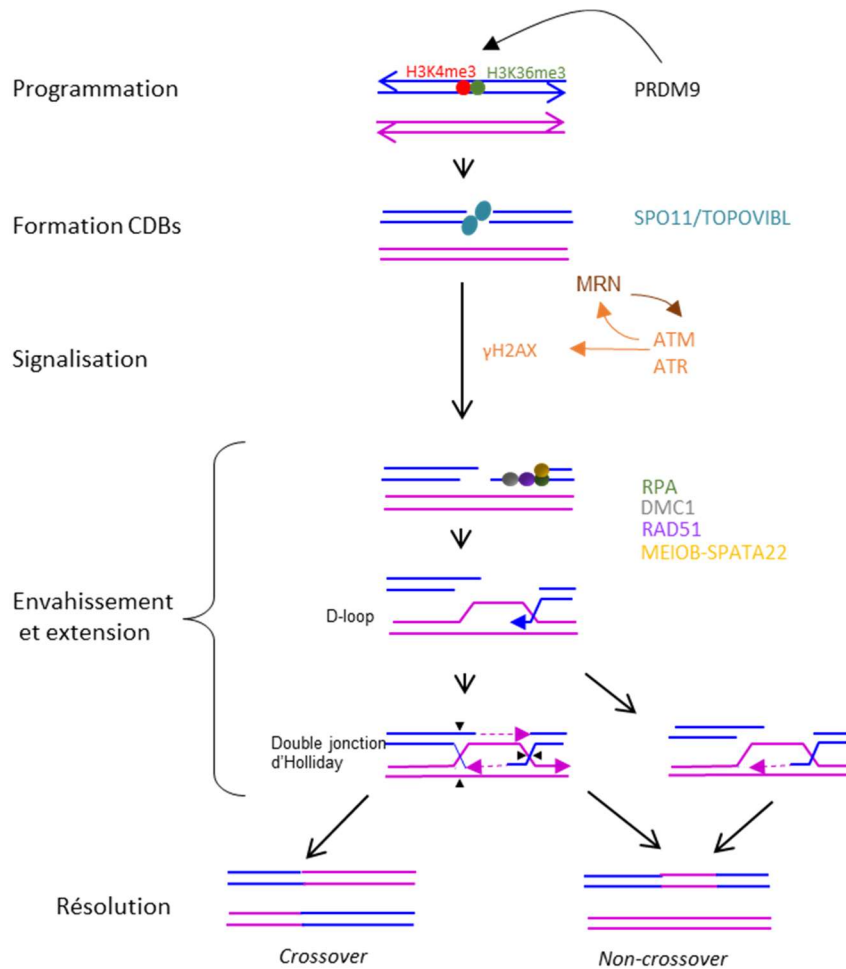


Figure 7 : Schéma simplifié de la recombinaison homologue méiotique.

En violet et en bleu deux chromosomes homologues (1 seule chromatide par chromosome est représentée), les extrémités avec les flèches indiquent la direction 3'. La formation des Cassures Double-brin (CDBs) est programmée dans le temps et l'espace grâce à la méthyltransférase PRDM9 qui catalyse les méthylations H3K4me3 (rouge) et H3K36me3 (vert) aux sites des cassures. Le complexe SPO11/TOPOVIBL catalyse les CDBs de l'ADN. La présence de CDBs est détectée par MRN puis signalée par les kinases ATM et ATR, qui phosphorylent H2AX (γ H2AX). Les extrémités simple-brin de l'ADN sont prises en charge par les protéines de liaison RPA, MEI0B et SPATA22 et par les recombinases RAD51 et DMC1. L'invasion par l'extrémité simple-brin du chromosome homologue crée une D-loop qui peut être résolue en CO, en passant par une double jonction d'Holliday ou bien en NCO.

L'objectif de la RH méiotique est de créer un nombre de CO et donc de chiasmata régulé. Ce nombre (≥ 1) varie selon les organismes mais est fixe par chromosome afin d'assurer la bonne distribution des chromosomes homologues entre les deux cellules filles (Carpenter 1979; Plug et al. 1998). Les CO induisent le transfert bidirectionnel entre chromosomes homologues sur de longs intervalles chromosomiques. Cela permet également le brassage de l'information génétique (Frédéric Baudat et de Massy 2007).

Il est intéressant de remarquer que beaucoup de CDBs sont générées par SPO11 (plusieurs centaines chez la souris) comparativement au nombre de CO nécessaires. En fait, chez les mammifères, environ 90 % des CDBs sont réparées par SDSA aboutissant à la formation de NCO au cours du stade zygotène. Ceux-ci ont un effet minime sur le brassage génétique car ils induisent le transfert unidirectionnel d'un court segment d'ADN. Par contre, ils sont essentiels pour l'appariement des chromosomes.

L'orientation de la prise en charge d'une CDB soit vers la formation d'un CO soit d'un NCO est capitale pour permettre la bonne ségrégation chromosomique et éviter des aneuploïdies comme le syndrome de Down, de Turner ou de Klinefelter.

De nombreuses anomalies peuvent survenir au cours de la méiose tant sur le plan du synapsis que de celui de la recombinaison homologue de méiose. Il existe des points de contrôle permettant une surveillance de la qualité de la méiose ovocytaire que nous aborderons dans la partie homéostasie des CGs.

1.3. La folliculogénèse

1.3.1. Définitions

Chez les mammifères, les follicules ovariens sont constitués d'un ovocyte, bloqué en fin de prophase I au stade diplotène, entouré de cellules somatiques (les cellules folliculaires). Ils sont localisés dans la périphérie de l'ovaire au niveau du cortex ovarien et nourris par un réseau de vaisseaux sanguins issus du centre de l'organe au niveau de la médulla. La folliculogénèse regroupe l'évolution des follicules ovariens depuis leur formation à partir des nids ovigères jusqu'à leur involution par atrophie ou jusqu'à leur rupture au moment de l'ovulation s'ils parviennent à maturité finale. C'est un processus continu qui aboutit majoritairement à la dégénérescence (ou atrophie) de plus de 99% des follicules en croissance chez la femme, l'ovulation étant un événement tout à fait exceptionnel.

Sur une coupe histologique d'ovaire adulte de souris, plusieurs types de follicules ovariens sont identifiables selon notamment leur taille, le nombre d'assises de cellules folliculaires et la présence d'un antrum (Gougeon 2010) (Figure 8).

- Les follicules primordiaux (FP) : follicules de petite taille avec un petit ovocyte (10-15 micromètres (μm) de diamètre chez la souris) entouré d'une fine assise non jointive de cellules de la granulosa aplaties. Ils représentent 95% de la population folliculaire et constituent la réserve ovarienne.
- Les follicules primaires : l'ovocyte a démarré sa croissance et est entouré d'une assise complète de cellules folliculaires cuboïdales prolifératives. La zone pellucide fait son apparition.
- Les follicules secondaires : l'ovocyte poursuit sa croissance et les cellules somatiques de la granulosa associées se sont divisées pour former au moins deux assises. Une différenciation du stroma ovarien adjacent s'opère avec l'apparition de la thèque interne à l'extérieur de la membrane basale délimitant les cellules de la granulosa (membrane de Slavjanski). La zone pellucide s'épaissit.
- Les follicules pré-antraux : une cavitation liquidienne, l'antrum, apparaît au sein des assises de cellules de la granulosa lorsque le follicule atteint une taille voisine de 200 μm . Elle accumule les produits de sécrétion des cellules folliculaires (granulosa et thèque) et des substances plasmatiques issues de la vascularisation thécale.

- Les follicules antraux ou tertiaires : la taille de l'antrum a fortement augmenté et quelques cellules de la granulosa restent autour de l'ovocyte formant le cumulus oophorus. La taille de l'ovocyte est stable, la prolifération des cellules de la granulosa diminue progressivement.
- Les follicules pré-ovulatoires : il s'agit du follicule le plus grand du fait de la croissance de la cavité antrale.
- Les corps jaunes : ils constituent le reliquat des cellules somatiques du follicule ovarien après l'ovulation. Les cellules se lutéinisent sous l'effet de la progestérone et sont identifiables par leur grande taille. Chez les espèces pluri-ovulantes comme chez la souris, plusieurs sont identifiables dans l'ovaire pubère contrairement à l'espèce humaine. Ils seront maintenus uniquement en cas d'implantation.

Après initiation de la croissance, la folliculogenèse dure environ dix-neuf jours chez la souris (Hoage et Cameron 1976), alors que chez la femme, ce processus représenterait environ 175 jours (Gougeon 2010).

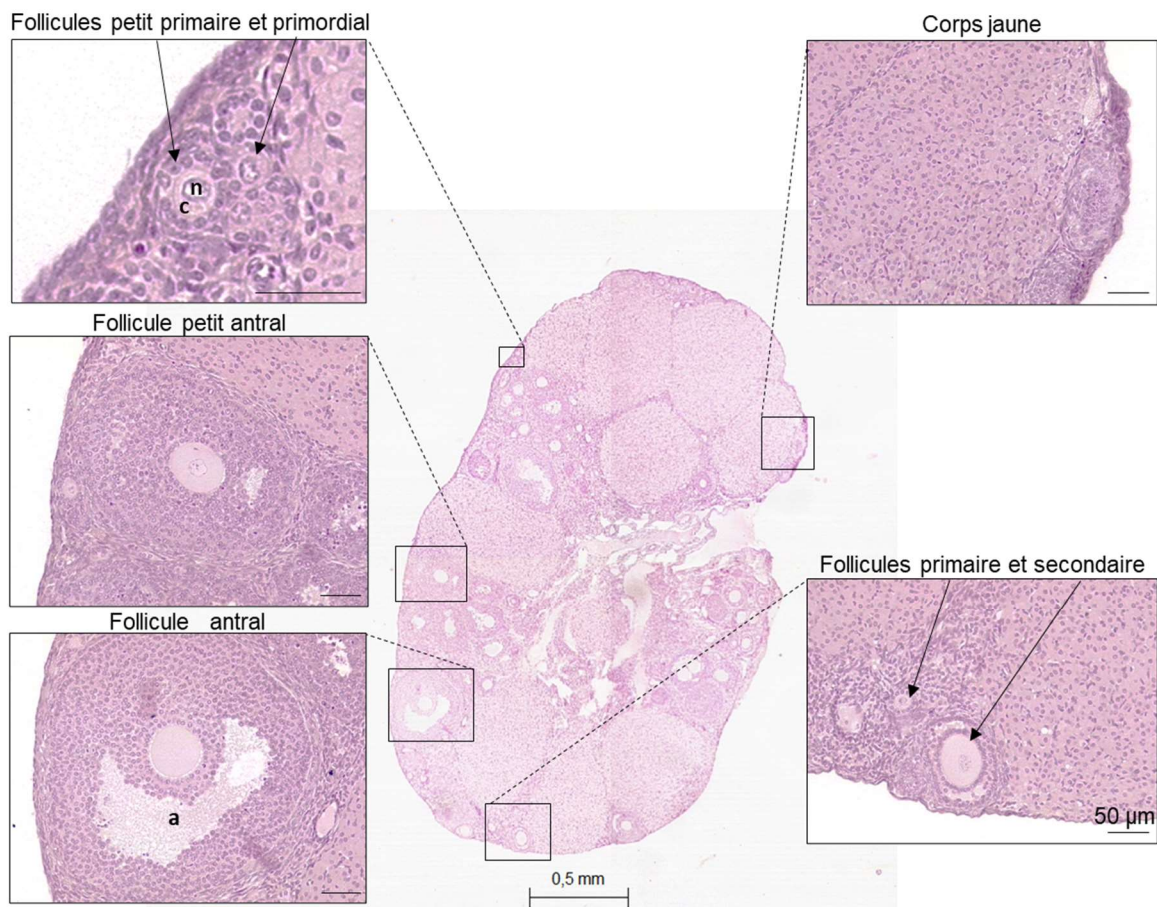


Figure 8 : Les différents stades de la folliculogenèse chez la souris adulte (données personnelles).

Section d'ovaire adulte chez la souris après fixation Bouin et coloration hématoxyline/éosine/safran.

a : antrum ; c : cytoplasme ovocytaire ; n : noyau ovocytaire

1.3.2. Les étapes de la folliculogénèse

La folliculogénèse peut être divisée en trois grandes étapes (Figure 9) :

- la mise en place du stock de petits FP, qui constituera la réserve ovarienne dont disposera la femelle pendant sa vie reproductive,

- la croissance folliculaire basale, indépendante des hormones gonadotropes hypophysaires (hormone folliculostimulante (FSH) et hormone lutéinisante (LH)), qui comprend l'entrée en croissance d'un pool de FP jusqu'au stade préantral chez la souris (Abel et al. 2000) et antral chez la femme. C'est une phase de croissance lente puisqu'elle représente 75% du cycle chez la souris et la femme (D. Monniaux et al. 1997; McGee et Hsueh 2000) et qui correspond à l'essentiel de la croissance ovocytaire. L'activité transcriptionnelle de l'ovocyte est forte avec la production spécifique des facteurs de croissance bone morphogenetic protein 15 (BMP15) et growth differentiation factor 9 (GDF9), les protéines de la zone pellucide (ZP), ainsi que de facteurs dont le rôle est encore inconnu (P. Zheng et Dean 2007). Les ARN produits seront soit traduits pour soutenir le métabolisme protéique soit stockés sous forme de particules ribonucléoprotéiques.

Une vague de reméthylation intervient aux alentours du stade antral précoce, à une taille ovocytaire d'environ 60 microns (Lucifero et al. 2004). Les cibles identifiées de cette reméthylation femelle sont les éléments transposables, les gènes soumis à empreinte maternelle et plusieurs gènes importants pour le développement (Borgel et al. 2010).

A la croissance ovocytaire est associée une forte prolifération des cellules folliculaires, ainsi que la différenciation du stroma ovarien adjacent (cellules de la thèque). La taille du follicule ovarien va donc augmenter passant d'environ 30 à 50 μm à environ 200 μm à partir de la formation de l'antrum chez la souris. En l'absence des hormones gonadotropes, ces follicules dégénéreront par apoptose,

- la croissance folliculaire terminale, dépendante des gonadotropines (FSH, LH), qui va du stade de follicule antral jusqu'à l'ovulation. En fin de folliculogénèse, l'expression génique repose essentiellement sur le contrôle post-transcriptionnel de la réserve d'ARN. En effet, l'activité transcriptionnelle décroît lorsque l'ovocyte approche de son diamètre maximal en fin de croissance basale, jusqu'à devenir indétectable. La chromatine se condense en un anneau périnucléolaire Surrounded Nucleolus (SN), qui coïncide avec l'inactivation des ARN polymérases (Debey et al. 1993).

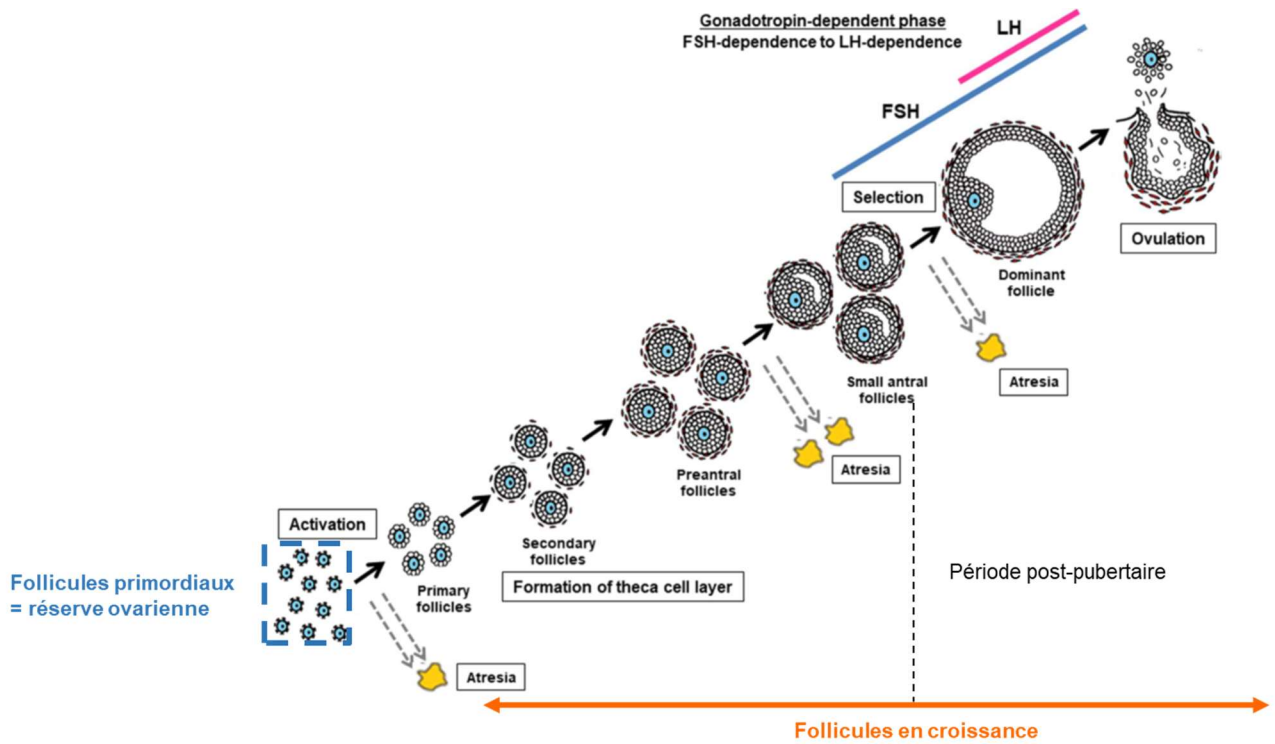


Figure 9 : Représentation schématique de la folliculogénèse (adapté d'Orisaka et al., 2021).

FSH : follicle stimulating hormone; LH : luteinizing hormone

Suite à cette croissance cellulaire singulière, l'ovocyte va acquérir de nouvelles compétences :

- La compétence méiotique, c'est-à-dire la capacité à reprendre la méiose une fois extrait du follicule. Il l'acquiert à la fin de la folliculogénèse basale lorsque l'ovocyte a atteint 80% de sa taille maximale.
- La compétence au développement, c'est-à-dire la capacité à assurer un développement embryonnaire normal après fécondation. Il l'acquiert au début de la folliculogénèse terminale à partir d'un diamètre folliculaire spécifique de chaque espèce (Mermillod et Marchal 1999).

1.3.3. Régulations de la folliculogénèse

1.3.3.1. Histogénèse folliculaire

L'histogénèse folliculaire correspond à la formation des FP. Elle se déroule dans un ovaire structuré (cortex/médulla), au sein des cordons ovigères chez la femme et des nids ovigères chez la souris. Leur rupture permet l'individualisation des ovocytes et donc la formation de FP grâce à la coopération des cellules pré-granulosa et des cellules parenchymateuses (Figure 4). Les cellules épithéliales (les pré-granulosa) s'insinuent entre les ovocytes qui sont alors individualisés, enveloppés d'une assise de cellules épithéliales aplaties (les granulosa) puis d'une membrane basale, formant les FP (Forabosco et al. 1991). Enfin, des cellules mésenchymateuses voisines envoient des processus cytoplasmiques entre les follicules nouvellement formés, les séparant tout à fait (Merchant-Larios et Chimal-Monroy 1989).

L'histogénèse folliculaire, fait intervenir une vague de mort cellulaire physiologique touchant les CGs spécifiquement dans les zones où les nids ovocytaires se fragmentent (M. E. Pepling et Spradling 2001) et où la membrane basale subit un remodelage (Rajah et Sundaram 1994; Mazaud et al. 2005). Ainsi, après fragmentation des nids, un tiers seulement des ovocytes ont survécu à la formation des FP (Melissa E. Pepling 2012).

La formation des FP se déroule dans une temporalité spécifique à chaque espèce. Elle a lieu soit en période fœtale (chez la femme mais aussi chez les ruminants) soit en période néonatale (chez les rongeurs et le lapin). Chez la femme les premiers FP seraient présents à partir de 16 SG (Rabinovici et Jaffe 1990; Motta, Nottola, et Makabe 1997; Albamonte et al. 2008).

Une première vague de quelques FP se forme en profondeur à l'interface entre cortex et médulla dès 18 jpc chez le rongeur (Mork et al. 2012; Melissa E. Pepling 2012). Ils seront les premiers à entrer en croissance lors de la première vague de folliculogenèse et accompagneront la mise en place de la régulation par l'axe hypothalamo-hypophysaire au moment de la puberté (W. Zheng et al. 2014). Les follicules de cette première vague ont une dynamique et un profil d'expression de gènes spécifiques. En effet, chez le rat, dès le stade de follicule primaire, les cellules de la granulosa des follicules de cette première vague expriment la sous-unité β de l'inhibine ainsi que l'aromatase P450 responsable de la conversion des androgènes en oestradiol (Guigon et al. 2003). À partir de 21 jpp en post-natal, leur expression est restreinte aux follicules ovariens à grand antrum et pré-ovulatoires (Guigon et al. 2003). Une mise en place plus tardive de FP se déroule dans la partie plus externe du cortex entre la naissance et le cinquième jour (Jagarlamudi et Rajkovic 2012).

Les mécanismes de régulations de l'histogenèse folliculaire sont multiples.

Le déclenchement de l'histogenèse est dépendant de la progression méiotique des ovocytes et notamment de l'arrivée au stade diplotène en fin de prophase I. L'inhibition de *Sycp1* par un Small interference RNA (siRNA) à 16,5 jpc permet l'accélération de la désorganisation du complexe synaptonémal et un passage plus rapide au stade diplotène. Il en résulte une formation plus précoce des FP (Paredes et al. 2005; Y. Wang et al. 2015). À l'inverse, l'inhibition de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) intra-ovocytaire retarde le processus méiotique et empêche la formation des FP *in vitro* (Y. Wang et al. 2015). Ainsi la progression méiotique des ovocytes est essentielle pour l'initiation de l'histogenèse folliculaire.

Elle dépend à la fois du développement des cellules ovariennes somatiques et de la présence d'ovocytes. Si le nombre d'ovocytes est trop fortement réduit comparativement au nombre de cellules somatiques, il n'y a pas de formation de follicules. En effet chez des rates irradiées *in utero*, la déplétion du stock d'ovocytes provoque la persistance de cordons ovariens stériles sans initiation de l'histogenèse (Mazaud Guittot et al. 2006). D'autre part si le nombre de cellules somatiques est insuffisant cela perturbe également la formation des FP. En effet, une diminution de l'activité proliférative des cellules de la granulosa par invalidation de *Foxl2* (Uda et al. 2004) ou par celle du gène du facteur de croissance NGF (Dissen et al. 2001), empêche l'histogenèse. Dès le début de la folliculogenèse, un équilibre du ratio CGs/ cellules somatiques est donc essentiel ; la présence d'ovocytes (McLaren 1991) devant être associée à un nombre approprié de cellules somatiques (Sawyer et al. 2002).

L'histogenèse est régulée de manière paracrine par un véritable dialogue entre CGs et cellules somatiques. La voie de signalisation Notch homolog (NOTCH) est par exemple active lors de

ce processus. Sa suppression dans l'ovaire néonatal de souris entraîne une diminution importante du nombre de FP formés (Trombly et al., 2009). Le récepteur Notch homolog 2 (NOTCH2) est exprimé par les cellules de la pré-granulosa et un de ses ligands, Jagged1 (JAG1), est sécrété par les ovocytes. Les ovocytes expriment également le facteur de transcription Folliculogenesis Specific Basic Helix-Loop-Helix (Figla). Lorsque ce facteur de transcription à motif hélice-boucle-hélice est muté chez la souris, les follicules ne se forment pas à la naissance (Soyal et al., 2000). De nombreux facteurs de croissance sont rapportés comme activateurs de l'assemblage folliculaire comme la Connective tissue growth factor (CTGF) et l'Activine A (facteur de croissance de la famille du TGF- β). En revanche, l'anti-müllerian hormone (AMH), Fibroblast growth factor 2 (FGF2) et le facteur de nécrose tumorale, Tumor necrosis factor alpha (TNF α) sont décrits comme inhibiteurs de l'assemblage des FP (Nilsson et al., 2013). L'assemblage correct des follicules résulte donc probablement d'une expression équilibrée entre facteurs activateurs et répresseurs dans le temps et dans l'espace.

A la fin du processus de formation des follicules (à 5 jpp chez les rongeurs ou à la naissance chez l'humain), le stock serait « fini », il n'y a plus de multiplication des CGs (Zuckerman 1951; H. Zhang et al. 2012). C'est sur ce pool de FP que repose la durée de fonctionnement de l'ovaire mammalien.

1.3.3.2. Croissance folliculaire basale

Deuxième étape de la folliculogénèse, la croissance folliculaire basale correspond au recrutement d'une cohorte de FP puis à leur développement associant croissance ovocytaire et prolifération des cellules folliculaires jusqu'à l'apparition des récepteurs à la FSH. Elle est régulée de manière paracrine voir endocrine, indépendamment de l'axe gonadotrope (Figure 9). En effet chez la souris, son déroulement n'est pas affecté en cas d'inactivation du gène codant la chaîne B de la FSH ou son récepteur (Kumar et al. 1997).

Après leur formation, certains FP vont entrer en croissance mais la plupart vont rester en quiescence plusieurs mois, plusieurs années voire plusieurs dizaines d'années chez la femme avant d'entrer dans la folliculogénèse basale. Morphologiquement, l'ovocyte quiescent n'augmente pas de taille, les cellules folliculaires restent aplaties, peu jointives et sont non cyclantes. Le signal déclenchant cette croissance est encore mal compris, est-il ovocytaire ? issu des cellules somatiques de la granulosa ? du cortex ovarien ? d'un facteur systémique (endocrinien ou autre) ? Ou est-ce l'échappement à un signal de maintien en quiescence ?

Des études ont rapporté l'implication de nombreux facteurs ovocytaires et somatiques localisés dans l'ovaire ayant un impact sur le recrutement des follicules primordiaux. Les deux principales voies de régulation ovocytaire sont celles de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) / Phosphatase and tensin homolog (PTEN) et Tuberous sclerosis complex (TSC) / mammalian target of rapamycin (mTOR) (Figure 10). L'inactivation de Pten entraîne l'accumulation de PIP3 à la membrane ovocytaire et l'activation d'AKT. Cela induit la phosphorylation de FOXO3a entraînant sa translocation du noyau vers le cytoplasme, signal d'activation ovocytaire. Chez la souris, l'invalidation génétique de FOXO3a ou PTEN entraîne un recrutement massif des FP et une insuffisance ovarienne prématurée (IOP) sévère (Castrillon et al. 2003; John et al. 2008; Reddy et al. 2008). De nombreux facteurs de transcription sont également impliqués dans l'activation ovocytaire comme NOBOX oogenesis homeobox (NOBOX), LIM Homeobox 8 (LHX8), Spermatogenesis And Oogenesis Specific Basic Helix-Loop-Helix 1 ou 2 (SOHLH1 ou SOHLH2) dont l'invalidation des gènes bloque le démarrage de croissance ovocytaire (Rajkovic et al. 2004; Choi et Rajkovic 2006; Pangas et al. 2006; Hao et al. 2008).

Un dialogue paracrine entre cellules de la granulosa et ovocytes permet d'activer ces voies. Par exemple, la production de KITL par les cellules de la granulosa active le récepteur KIT à la surface ovocytaire, stimulant sa croissance ovocytaire *in vitro* (Klinger et De Felici 2002). Le système KIT/KITL participerait à la transition du FP au follicule primaire en activant la voie de signalisation PI3K/AKT, entraînant la phosphorylation et l'inactivation de FOXO3 (Reddy et al. 2005).

Une régulation endocrine intervient également dans l'activation de la croissance folliculaire. L'AMH produite par les follicules en croissance exerce un feedback négatif sur l'ensemble de la folliculogénèse. Chez la souris l'invalidation génétique de l'*Amh* entraîne une augmentation de l'activation de croissance des follicules ovariens avec une diminution rapide de la réserve ovarienne. P. Monget et al (Monget et al. 2012), soulignent que le taux de recrutement des FP décroît avec l'âge chez le rat prépubère (Hirshfield et DeSanti 1995) mais augmente avant la ménopause chez la femme (Gougeon, Ecochard, et Thalabard 1994). Cela est lié à la production d'AMH par les follicules en croissance. Sa production par les cellules de la granulosa atteint son maximum à la fin de la croissance basale en conditions physiologiques, ce qui inhibe la croissance des follicules de plus petite taille (A. L. Durlinger et al. 1999; A. L. L. Durlinger, Visser, et Themmen 2002; Visser et al. 2006). A la ménopause, la baisse du nombre de follicules en croissance entraîne une baisse de l'AMH et donc une augmentation du taux de recrutement des FP.

Le recrutement des FP est donc une balance finement régulée entre facteurs activateurs de croissance et facteurs de maintien.

Après leur recrutement le développement du follicule ovarien du stade primaire au stade petit antral se poursuit grâce à des régulations paracrines entre cellules somatiques et ovocytaires. Spécifiquement à ce stade, la prolifération des cellules de la granulosa est dépendante de facteurs ovocytaires comme GDF9 et BMP15 (C. Yan et al. 2001; McNatty et al. 2005). Par exemple chez les souris *Gdf9* *-/-* la folliculogénèse reste bloquée au stade de follicule primaire. La production ovocytaire de GDF9 est donc cruciale pour le passage du stade primaire au stade secondaire.

En retour, les cellules de granulosa participent à la croissance ovocytaire par la production de KITL, dont l'expression est modulée par BMP15 et GDF9 d'origine ovocytaire (Shimasaki et al. 2004; Thomas et al. 2005). Cela illustre bien le dialogue entre ovocytes et les cellules somatiques.

L'existence d'un couplage métabolique entre ovocyte et granulosa constitue un autre élément déterminant du dialogue entre ces deux types cellulaires. Par exemple, l'ovocyte contrôle le transport actif d'acides aminés dans les cellules du cumulus, et ces acides aminés peuvent être ensuite transférés à l'ovocyte par l'intermédiaire de jonctions communicantes (John J. Eppig et al. 2005). La perte des jonctions communicantes entre ovocyte et granulosa (par invalidation du gène *Gja4* codant pour la connexine 37), a un effet délétère sur la croissance et la survie de l'ovocyte dès le stade antral (Carabatsos et al. 2000).

Les cellules thécales régulent également la croissance folliculaire basale par la sécrétion d'androgènes et de nombreux facteurs de croissance capables de stimuler la prolifération des cellules de granulosa. L'activité des cellules de thèque est elle-même régulée par des facteurs sécrétés par les cellules de granulosa, en particulier KITL (Kezele, Nilsson, et Skinner 2005). Enfin des régulations endocrines, même si elles ne sont pas indispensables, interviennent dans cette croissance folliculaire basale qui est stimulée par la FSH et la LH (D. Monniaux et al. 2009).

En fin de croissance basale, les follicules pré-antraux acquièrent à leur surface de nombreux récepteurs hormonaux tels que follicle stimulating hormone receptor (FSHR), Estrogen receptor 1/2 (ESR1/2) ; aux facteurs de croissance tels que l'insulin-like growth factor I receptor (IGF1R) (l'insuline et IGF1 sensibilisent le follicule préantral à la FSH (Mazerbourg et al. 2003)) et l'epidermal growth factor receptor (EGFR), important pour la sélection du follicule et la maturation de l'ovocyte (D. Monniaux et al. 2009; Sánchez et Smitz 2012).

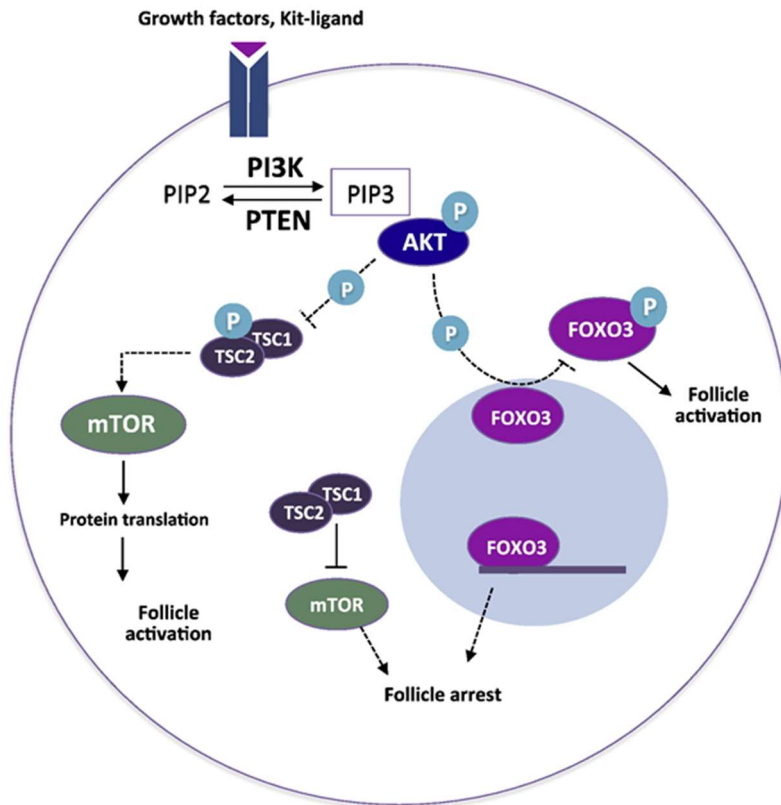


Figure 10 : Représentation schématique de l'implication des voies PI3K/PTEN et TSC/mTOR dans l'activation des follicules primordiaux (tiré de Flor Sanchez et Johan Smitz, 2012).

1.3.3.3. Croissance folliculaire terminale

A partir d'une taille critique spécifique à l'espèce (0,2 mm chez les rongeurs, 3-5 mm chez la femme), la croissance du follicule est strictement dépendante de niveaux minimaux de FSH (Figure 9). La croissance folliculaire terminale débute donc en phase pubertaire et se déroule par vagues folliculaires. Chaque vague folliculaire correspond à la croissance synchrone d'une cohorte de follicules ovariens ayant atteint la taille critique. Ainsi, le dialogue ovaire/axe hypothalamo-hypophysaire met en jeu initialement plusieurs follicules.

De par son panel de récepteurs, la cinétique de prolifération des cellules de la granulosa, sa position dans l'ovaire chaque follicule ovarien est unique. Un (espèce mono-ovulante) ou plusieurs (espèces pluriovulantes) follicules pourront atteindre le stade pré-ovulatoire par leur capacité à interagir avec l'axe hypothalamo-hypophysaire. La sensibilité à la FSH permet une augmentation de la production d'œstradiol via l'activité aromatasase (CYP19A1) et de l'inhibine qui exercent un rétrocontrôle négatif sur la production de FSH par l'hypophyse (D. Monniaux et al. 2009). Les follicules ovariens moins sensibles à la FSH de la cohorte initiale dégénèrent alors par atrophie. La croissance du(des) follicule(s) évolutif(s) est stimulée par une augmentation de la fréquence des pulses de LH via un rétrocontrôle positif de l'œstradiol parallèlement à une augmentation du nombre de récepteurs à la LH à la surface des cellules de la granulosa (pour revue Driancourt 2001). L'expression des deux marqueurs-clés de la différenciation folliculaire, CYP19A1 (aromatase) et récepteur à la LH, est donc critique à l'établissement de la sélection du(des) follicule(s) préovulatoire(s).

Le pic de pulses LH entraînera la reprise de la méiose ovocytaire puis la rupture du(des) follicule(s) ovarien(s) avec l'expulsion du(des) complexe(s) cumulo-ovocytaire(s). Les cellules thécales et murales de la granulosa se lutéinisent et produisent la progestérone nécessaire à l'implantation et à son maintien (pour revue D. Monniaux et al. 2009; Baerwald, Adams, et Pierson 2012).

1.3.4. Communication directe entre ovocyte et cellules somatiques

Une des spécificités de l'ovogenèse est la mise en place de communications cellulaires directes entre ovocyte et cellules somatiques : les jonctions gaps. Celles-ci permettent un véritable couplage métabolique au sein du follicule ovarien avec l'échange de substances de faibles poids moléculaire (<1KDa) comme des acides aminés mais également des acides ribo-nucléiques messagers (ARNm) (J. J. Eppig 1991; J. J. Eppig, O'Brien, et Wigglesworth 1996; Macaulay et al. 2014).

Des jonctions gaps impliquant la connexine 37 (CX37) permettent un couplage entre ovocyte et prolongements cytoplasmiques des cellules de la granulosa dès le stade de follicule primaire chez la souris (Simon et al. 1997). Leur rôle est essentiel dans la croissance folliculaire terminale chez le mammifère. Les souris *Gja4* *-/-*, ont une folliculogenèse perturbée à partir du stade de follicule antral (Simon et al. 1997; Carabatsos et al. 2000). Les apports nutritifs à l'ovocyte seraient réduits causant un arrêt de la croissance ovocytaire à 74% de sa taille normale (Carabatsos et al. 2000). Enfin, en fin d'ovogenèse, le pic de LH induit une phosphorylation MAP-Kinase dépendante des connexines 43 (CX43) des cellules de la granulosa entraînant leur fermeture. Il s'agit d'une des voies entraînant une chute de l'AMPc intra-ovocytaire, à l'origine de la reprise de la méiose ovocytaire (Norris et al. 2008).

1.4. L'homéostasie des cellules germinales

Au cours de l'ovogenèse, il existe une régulation du nombre de CGs. En effet si leur nombre est trop faible, il y a un arrêt prématuré du fonctionnement ovarien tandis qu'un excès de CGs aboutit à une folliculogénèse perturbée.

Le stock de CGs est fixé à la naissance et conditionne la fertilité chez les mammifères femelles.

Tout au long de l'ovogenèse, des variations physiologiques du nombre de CGs ont lieu (Figure 11). En effet, la mort des CGs physiologique au cours de la vie fœtale et en postnatal précoce intervient à diverses étapes, lors :

- De la prolifération mitotique des CGs
- De l'initiation de la méiose à la fin de prophase I (+)
- De la fin de prophase I (++)
- De la rupture des nids ovigères, alors appelée attrition ovocytaire (++)

Chez la souris, la gonade en développement compte plus de 100 CGPs vers 8 jpc (Ginsburg, Snow, et McLaren 1990). Le nombre maximum de CGs femelles serait atteint entre 13,5 et 15,5 jpc peu après l'entrée en méiose avec 15 000 ovogonies environ par ovaire (Myers et al. 2014). Ce nombre baisserait ensuite drastiquement autour de la naissance parallèlement à l'histogénèse pour atteindre plusieurs milliers de CGs vers 3 jpp avec une forte variabilité interindividuelle chez la souris (J. B. Kerr et al. 2006; Myers et al. 2014).

Chez la femme, peu de données sont disponibles en pré-natal mais on estime à 5-6 millions le nombre de CGs dans un ovaire autour de 19 SG (Baker 1963; Mamsen et al. 2011; Silber 2015). À la naissance le stock serait compris entre 1 et 2 millions (Baker 1963; Silber 2015; Ford et al. 2020) puis décroît à environ 400 000-500 000 à la puberté (Grive 2020). Le nombre moyen d'ovulations effectives sur la période reproductive serait seulement de 400 à 500 ovocytes matures.

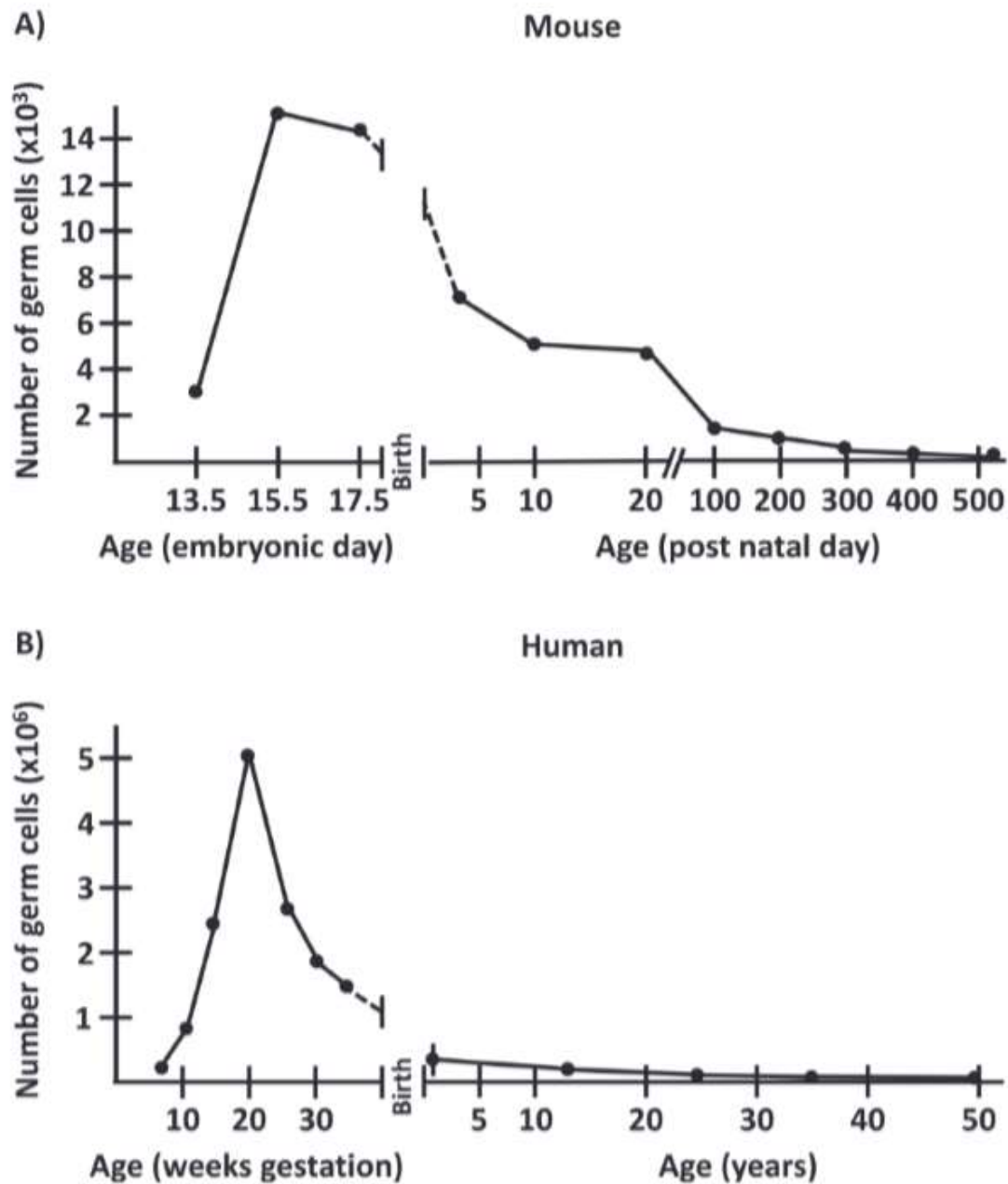


Figure 11 : Le nombre de cellules germinales dans l'ovaire chez la Souris (A) et chez l'Homme (B) au cours de l'ovogenèse (tiré de Findlay et al. 2015).

L'évolution du nombre de CGs dépend d'un équilibre entre activité proliférative et mort ovocytaire avant l'entrée en méiose puis ne dépendra plus que de la survie des CGs.

Au cours de l'ovogenèse, chez la souris, la mort ovocytaire augmenterait à partir de l'entrée en méiose alors que l'ovocyte a perdu son activité proliférative. La cinétique de cette mort ovocytaire fait débat. Elle serait en augmentation au moment de l'entrée en méiose puis constante jusqu'à la fin de prophase I. En période périnatale, la mort ovocytaire serait particulièrement prononcée. En période post-natale, la diminution de la réserve ovarienne sera croissante avec l'âge mais dans des proportions plus faibles. En conditions physiologiques, elle est essentiellement liée à l'atrésie folliculaire qui peut survenir tout au long de la croissance folliculaire (Yingjun Chen et al. 2021), mais concerne principalement le stade antral (Hirshfield 1991). Ce processus de dégénérescence des follicules ovariens découle de l'entrée en apoptose des cellules de la granulosa qui ne répondraient plus aux signaux de survie (notamment à la FSH) (pour revue Matsuda et al. 2012).

1.4.1. Les voies de mort des cellules germinales

Les informations disponibles quant à la mort des CGs physiologique au cours de l'ovogenèse ont principalement été obtenues à partir de modèles murins invalidés pour des gènes impliqués dans la voie de l'apoptose. L'invalidation du gène antiapoptotique *B Cell Lymphoma 2 (Bcl2)* réduit drastiquement le nombre d'ovocytes et de FP (Ratts et al. 1995) tandis que celle du gène proapoptotique *Bcl2 Associated X (Bax)* les augmentent d'environ trois fois, rallongeant la période reproductive chez la souris (Perez et al. 1999; Greenfeld et al. 2007). La principale voie de mort cellulaire décrite au cours du développement ovocytaire est donc l'apoptose ou mort cellulaire programmée (Figure 12). Deux voies alternatives conduisent à la mort cellulaire par apoptose. La voie extrinsèque passant par les récepteurs de mort et la voie intrinsèque secondaire à un stress intracellulaire.

La voie intrinsèque de l'apoptose :

Suite à un signal interne pro-apoptotique (lésion de l'ADN, stress oxydatif...), l'activation de P53 ou de ses isoformes (P63, P73) va i) inhiber les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 et ii) activer les protéines pro-apoptotiques comme la famille BH3 (P53 Upregulated Modulator of Apoptosis (PUMA), Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1 (PMAIP1 ou NOXA), Bcl2 Associated X protein (BAX), Bcl-2 interacting mediator of cell death (BIM)).

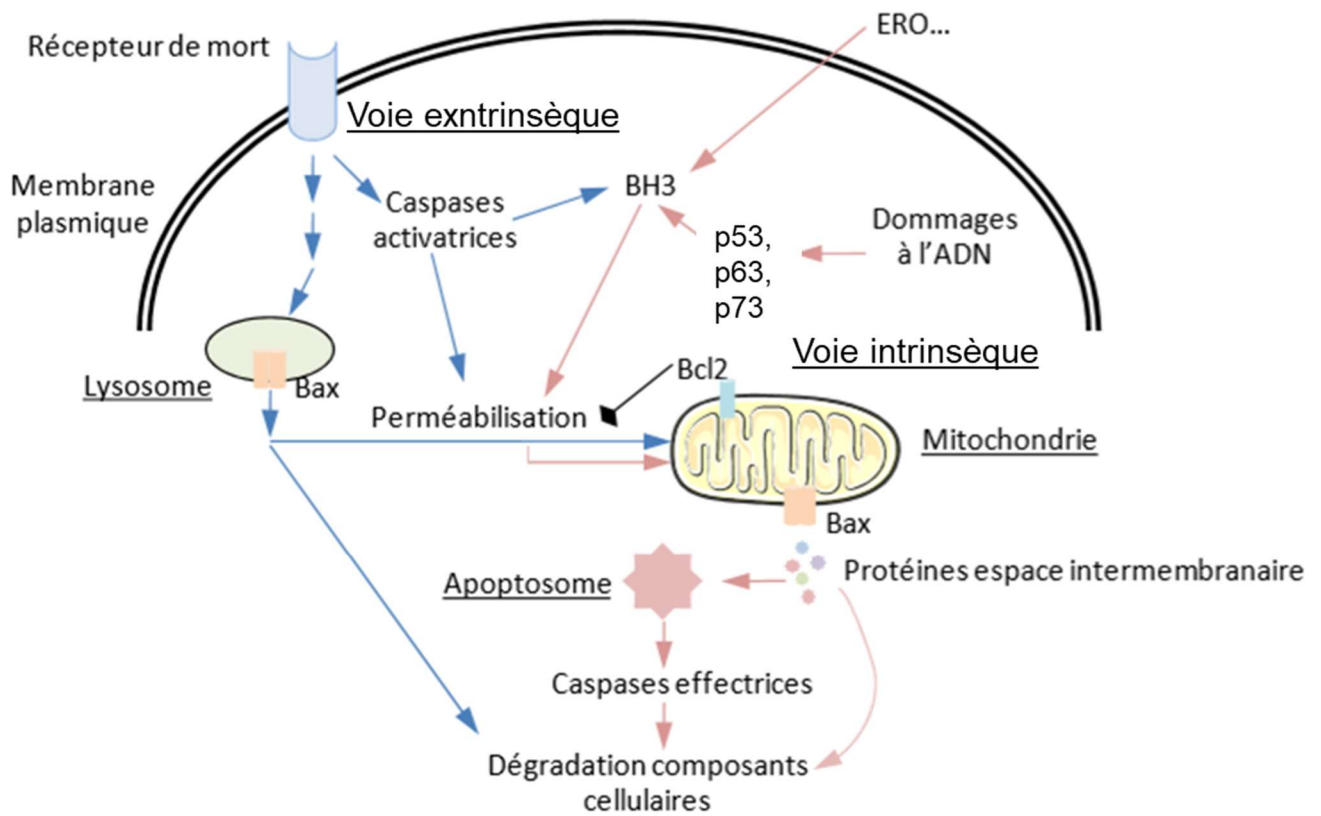


Figure 12 : Représentation schématique simplifiée des voies conduisant à l'apoptose.

BAX va alors être activé et va s'associer à Bcl2 homologous Antagonist/Killer (BAK) qui est constitutivement ancrée à la membrane mitochondriale. L'oligomère BAX/BAK nouvellement formé va permettre la formation du pore mitochondrial et, ainsi, entraîner une dépolarisation de la membrane mitochondriale entraînant la libération de protéines pro-apoptotiques tel que le cytochrome C initialement séquestrées dans la mitochondrie. Le cytochrome C relargué va s'associer avec la protéine *Apoptotic Protease Activating Factor-1* (APAF-1) pour former l'apoptosome. L'apoptosome néoformé va alors recruter et activer les pro-caspases 9 qui activent à leur tour les caspases exécutrices.

En l'absence de stimuli, peu de mort ovocytaire est observée avant blocage en fin de prophase 1 chez la femelle. L'étude de la mort ovocytaire après irradiation post-natale chez la souris a mis en évidence le rôle clé de P63 dans l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Aucune expression protéique ou de transcrite de P63 n'est présente dans l'ovaire fœtal de souris entre 12,5 et 16,5 jpc c'est-à-dire du stade leptotène au stade pachytène précoce (Gabriel Livera et al. 2008). La production de P63 débiterait au stade pachytène et serait la plus forte au stade diplotène chez la souris et la femme, coïncidant avec la fin de réparation des cassures double-brin méiotiques (G. Livera et al. 2008). Plus spécifiquement, ce serait *TA63α*, l'un des six isoformes de P63 (Yang et al. 1998) qui serait le plus transcrite au stade diplotène (G. Livera et al. 2008).

La voie extrinsèque de l'apoptose :

Elle peut être induite par un signal extérieur à la cellule (autocrine ou paracrine). Au moins une vingtaine de couples récepteur-ligand ont été décrit comme participant à la voie extrinsèque. Les mieux caractérisés chez la souris sont FAS/FAS ligand mais aussi *Death Receptor 5* (DR5) /*Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand* (TRAIL). Une fois liés à leur ligand, les récepteurs vont alors recruter et activer les caspases 8 et 10. Une fois activée, les caspases 8 et 10 entraîneront directement ou indirectement (*via BH3 interacting domain death agonist* « BID ») une cascade d'activations séquentielles des différentes caspases exécutrices.

(tnfr-F6)-Associated (FAS) et FAS ligand (FASL) sont exprimés constamment dans l'ovaire fœtal et post-natal. Ils jouent un rôle important, aussi bien au moment de la prolifération des CGs qu'au moment de la folliculogénèse participant au phénomène d'atrésie notamment (H.-J. Lee et al. 2016).

D'autres voies de mort cellulaire sont impliquées. L'implication de l'autophagie a été montrée dans la lignée germinale femelle au moment de l'attrition ovocytaire avec la période de famine néonatale (Rodrigues et al. 2009; Y.-Y. Wang et al. 2017; Watanabe et Kimura 2018). Elle est probablement impliquée tout au long de l'ovogénèse puisqu'elle partage des régulateurs communs avec l'apoptose. Par exemple BCL2 est un facteur anti-apoptotique qui inhibe aussi

l'autophagie par un mécanisme de liaison à BECN1. P53, impliqué dans la voie intrinsèque de l'apoptose module aussi l'autophagie (pour revue Gump et Thorburn 2011).

De manière moins importante, la nécrose est également un processus de mort cellulaire qui a été décrit dans la lignée germinale femelle. TNF α est impliqué dans cette voie de mort cellulaire et est exprimé dans les ovocytes de rate autour de la naissance au moment de l'histogenèse (Marcinkiewicz et al. 1994). De plus, de nombreuses CGs et somatiques nécrotiques ont été détectées dans des ovaires embryonnaires de souris (M. Pajokh et al. 2018; Mojdeh Pajokh et al. 2019).

Récemment, il a également été suggéré que la ferroptose serait impliqué dans la formation des FP. En effet, une augmentation de la production d'ARNm impliqué dans ce processus de mort cellulaire non apoptotique a été retrouvé à la fois dans les cellules de la granulosa et dans les CGs en périnatal chez la souris (J.-J. Wang et al. 2020).

Les preuves de l'implication de voies alternatives à l'apoptose dans la mort ovocytaire ne sont pas encore assez robustes aujourd'hui et d'autres études sont nécessaires pour mieux définir leur implication au cours de l'ovogenèse.

1.4.2. Les rôles de la mort ovocytaire

Tout comme les mécanismes impliqués, les rôles de la mort ovocytaire au cours de l'ovogenèse sont encore mal compris.

Une hypothèse serait que les ovocytes éliminés se « sacrifieraient » pour améliorer la qualité de ceux appelés à survivre. De la même façon que le GP lors de la méiose cède ses organites à la CG fonctionnelle, les ovocytes, qui communiquent par des ponts cytoplasmiques établis lors de la cytokinèse incomplète pendant la mitose, échangent du matériel cytoplasmique afin de garantir le meilleur équipement aux ovocytes lors de l'histogenèse. C'est notamment le cas des mitochondries dont la migration à travers les ponts cytoplasmiques a été décrite juste avant la fragmentation des nids ovocytaires (M. E. Pepling et Spradling 2001).

Elle permettrait l'élimination d'ovocytes qui ne bénéficient pas d'un environnement suffisamment nutritif pour leur développement. L'ajout de facteurs tels Stem cell factor (SCF ou kit-ligand) ou leukemia inhibitory factor (LIF) sur des CGPs en culture augmentent leur survie (Pesce et al. 1993). Nous avons vu qu'un nombre insuffisant de cellules somatiques peut aboutir à une perte ovocytaire notamment lors de l'histogenèse (cf. 1.3.3.1.).

Il existe une surveillance de la qualité de la méiose conduisant à la mort des ovocytes défectueux pour le synapsis et/ou pour la RH méiotique. Ce « tri » des ovocytes défectueux pour le processus méiotique survient plus tôt lors de défauts de réparation des CDBs associés à des problèmes de synapsing (quelques jours après la naissance) que lors de problèmes de synapse seule (~2 mois post-partum). Cela suggère que les ovocytes des mammifères ont des points de contrôle distincts pour les dommages à l'ADN et la synapse (Di Giacomo et al. 2005; Reinholdt et Schimenti 2005).

Au cours de la prophase I, des mécanismes spécifiques permettent la détection et l'envoi en apoptose des ovocytes n'ayant pas pris en charge correctement les CDBs méiotiques. En effet, la persistance de CDBs non réparées dans des souris *Dmc1* *-/-*, *Atm* *-/-* ou *Mre11* *-/-* entraîne une élimination complète des ovocytes (Di Giacomo et al. 2005; Inagaki, Roset, et Petrini 2016). Les ovocytes sont également éliminés en cas de mauvais appariement des chromosomes homologues. Les asynapsis constituent des signaux de mort cellulaire pour l'ovocyte au cours de la prophase I comme évoqué précédemment avec les protéines HORMAD et RNF212 (Lake et Hawley 2013). Un article suggère qu'elles interviendraient également dans la surveillance de CDBs non réparées en fin de prophase I vers 1-2 jpp chez la souris (Qiao et al. 2018). Leur recrutement induit le blocage de l'interaction entre chromatides sœurs nécessaire à la réparation de CDBs résiduelles à ce stade, conduisant à l'élimination de l'ovocyte endommagé. Les mécanismes sous-jacents à ce point de contrôle sont encore inconnus.

Le MSUC est également une réponse aux asynapsis qui peut mener à l'élimination des ovocytes mal appariés (Kouznetsova et al. 2009; Q. Li et Engebrecht 2021). Chez la souris, ATR serait localisé aux régions chromosomiques non synapsées au cours des stades zygotène et pachytène (Turner et al. 2005; Mahadevaiah et al. 2008). Son activité de phosphorylation de l'histone H2AX provoque la diméthylation répressive sur l'histone 3 en lysine 9 (H3K9) mais les mécanismes sous-jacents impliqués dans le silencing transcriptionnel du MSUC et l'envoi à la mort des ovocytes sont peu décrits et surtout étudiés chez le mâle (pour revue van der Heijden et al. 2007).

Cependant, il faut noter que la mort ovocytaire présentée ici comme gardienne de la qualité ovocytaire pourrait simplement constituer une limitation de la capacité reproductive femelle sans rôle protecteur particulier en conditions physiologiques chez les mammifères. En effet, les souris *Puma* *-/-* *Noxa* *-/-* ne présentent pas d'infertilité et ont même une période reproductive accrue avec une descendance phénotypiquement normale (Jeffrey B. Kerr et al. 2012). Le seul risque sur la fertilité décrit d'un défaut de mort ovocytaire serait l'augmentation du risque de syndrome des ovaires polykystiques chez la souris mais cette notion est débattue (Grive 2020).

1.4.3. La néo-ovogenèse

Le dogme selon lequel le pool de FP serait non renouvelable a été challengé. Tilly et al. ont suggéré qu'une néo-ovogenèse pouvait avoir lieu dans l'ovaire murin ou humain adulte au niveau de l'épithélium de surface ovarien à partir de cellules souches semblables à celles de la moelle osseuse (Johnson et al. 2004; 2005). Ces résultats n'ont pas été confirmés par d'autres expériences de transplantation dans l'ovaire (Eggan et al. 2006; Begum, Papaioannou, et Gosden 2008). Bien que de rares cellules prolifératives puissent exprimer des marqueurs de précurseurs germinaux et développer une activité transcriptionnelle de type ovocytaire (Virant-Klun et al. 2008), aucune étude n'a pu démontrer clairement à ce jour une véritable néo-ovogenèse post-natale permettant une fertilité chez les mammifères.

Par contre, la genèse de CGPs *in vitro* par la différenciation de cellules souches pluripotentes d'origine embryonnaire (ES) ou de cellules pluripotentes induites (IPS) sont des approches prometteuses pour renouveler le stock ovocytaire et améliorer le traitement des infertilités féminines (pour revue Bharti et al. 2020). Elles permettent aujourd'hui d'obtenir une descendance à priori saine chez la souris (Hayashi et Saitou 2013). Chez l'Homme, l'utilisation d'IPS permet d'obtenir des ovogonies mais pas des ovocytes matures à ce jour (Yamashiro et al. 2018).

2. Effets des rayonnements ionisants sur l'ovaire

2.1. Généralités sur les rayonnements ionisants

2.1.1. Définitions

Un rayonnement ionisant (RI) correspond au processus d'émission ou de propagation d'énergie et de quantité de mouvement impliquant une onde (rayonnement électromagnétique) ou une particule (rayonnement particulaire ou corpusculaire). Ces rayonnements peuvent être ionisants c'est-à-dire disposer d'une énergie cinétique suffisante pour arracher des électrons à la matière. Ainsi on distingue l'ionisation de la matière liée à :

- l'émission de particules :

* α (association de deux protons et de deux neutrons) : leur énergie est très élevée avec des effets biologiques importants mais ils sont peu pénétrants.

* β (β^- ou β^+), d'énergie un peu plus faible mais de pénétrance un peu plus élevée.

* les neutrons qui sont très pénétrants.

- des rayonnements électromagnétiques qui sont des photons X ou gamma (γ). Les photons sont caractérisés par leur énergie, inversement proportionnelle à leur longueur d'onde (Figure 13). Les photons de type X ou gamma diffèrent par leur fréquence mais surtout par leur origine.

Les rayons gamma sont produits par des transitions nucléaires permettant à des noyaux instables (^{137}Cs , ^{60}Co ..) de libérer de l'énergie directement. L'activité de la source s'exprime en becquerel qui correspond à une désintégration par seconde.

Les rayons X sont produits par des transitions électroniques provoquées par la collision d'un électron avec un atome, à haute vitesse.

Comme il est possible pour certaines transitions électroniques d'être plus énergétiques que des transitions nucléaires, il existe un certain chevauchement entre les rayons X de haute énergie et les rayons gamma de faible énergie.

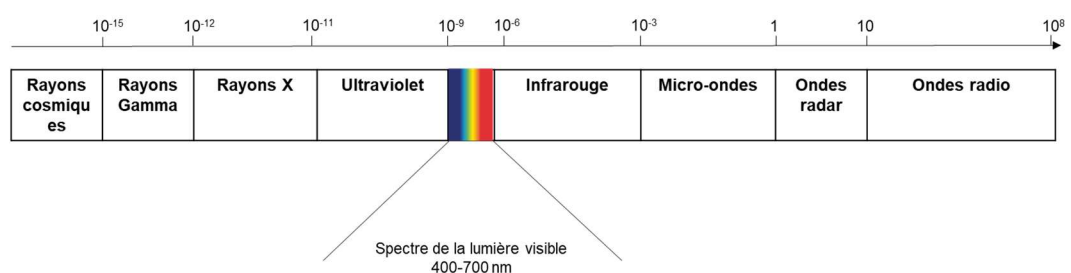


Figure 13 : Spectre électromagnétique.

L'interaction entre le milieu traversé et le rayonnement conduit à des transferts d'énergie qui varient selon le type de rayonnement et qui se caractérisent par le transfert d'énergie linéique (TEL). Il correspond à la quantité moyenne d'énergie cédée par unité de longueur de matière traversée, exprimée en $\text{keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$. Les RI à forte pénétrance ne dispersent que peu d'énergie le long de leur trajet. Ainsi, les rayons X et γ présentent un TEL peu élevé contrairement aux rayons α et β qui sont peu pénétrants.

La quantité d'énergie absorbée par unité de masse est quant à elle définie par la dose, exprimée en Gray (1 Gray = 100 rad = 1 Joule/kg de matière traversée).

La dose d'irradiation reçue dépend de plusieurs paramètres :

- la nature du rayonnement : il existe un facteur de pondération lié au rayonnement W_R , qui permet de calculer la dose équivalente.

- le type de tissu irradié : le facteur de pondération tissulaire W_T permet de prendre en compte la radiosensibilité des différents tissus. Les gonades possèdent le W_T le plus élevé, ce qui signifie qu'elles sont particulièrement sensibles à l'irradiation.

- le débit de dose : il correspond à la dose reçue par unité de temps.

La nature des particules, leur TEL, la dose d'irradiation et le débit de dose vont déterminer la nature des dommages biologiques et leur importance.

L'indicateur dosimétrique utilisé pour évaluer l'exposition aux RI des individus liés aux actes médicaux est la dose efficace exprimée en millisievert (mSV). La dose efficace est un indicateur du risque de détriment sanitaire à long terme (induction potentielle de cancers et d'effets héréditaires) lié à une exposition aux RI (effets stochastiques). Cet indicateur est un outil qui permet d'évaluer un risque global au niveau de l'organisme entier, que celui-ci soit ou non exposé en totalité, en tenant compte du type de rayonnement (nature et énergie), et de la radiosensibilité propre à chaque organe exposé (Nénot 2009).

2.1.2. Les sources d'exposition

Généralités :

Tous les organismes vivants sont exposés à diverses sources de RI (Figure 14). Les sources d'exposition naturelle sont soit externes d'origine tellurique, cosmique (réactions nucléaires dans les étoiles et explosion de supernovas) ou gazeuse (le radon, gaz radioactif) ; soit d'origine interne par incorporation de radionucléides (essentiellement ^{40}K et ^{14}C).

Les sources d'exposition artificielles correspondent aux activités médicales (radiodiagnostic, médecine nucléaire et radiothérapie) et aux activités civiles et militaires liées au nucléaire.

Utilisation dans le domaine médical :

A visée diagnostique :

Les RI sont fréquemment utilisés à visée diagnostique dans le monde de la santé avec environ 85 millions d'actes annuels en France (« Exposition de la population française aux rayonnements ionisants : bilan 2014-2019 – IRSN » 2021). En 2017, 1328 actes d'imagerie médicale ont été recensés pour 1000 femmes tous âges confondus, ce qui représente un nombre important d'expositions aux RI. Il s'agit d'expositions de radiologie conventionnelle (55.1%), de radiologie dentaire (29.6%), de scannographie (12.8%), de médecine nucléaire (2%) ou encore de radiologie interventionnelle diagnostique (0.5%). La dose reçue peut varier d'environ 0,1 mSv pour une radiographie pulmonaire à 15 mSv pour un scanner abdomino-pelvien ou un TEP-scanner (Figure 15). En 2017, la dose efficace individuelle moyenne par patient était d'environ 3,4 mSv avec une forte hétérogénéité de distribution de dose, la majorité étant inférieure à 0.15 mSv mais 5 % des patients ont reçu une dose supérieure à 18 mSv.

Ces expositions correspondent à des doses délivrées moyennes qui varient selon le type d'examen et la zone corporelle explorée.

Concernant les rayonnements X, l'exposition des ovaires pour un scanner abdomen-pelvis ou thoraco-abdomino-pelvien varie de 20 à 35 mGy ; pour une radiographie du segment lombaire de la colonne vertébrale elle est d'environ 6 mGy (IRSN 2010). Il est important de noter que ces expositions d'imagerie médicale peuvent être répétées presque quotidiennement sur plusieurs semaines notamment en oncologie que ce soit dans le cadre des bilans d'extension ou des préparations aux séances de radiothérapie (scanners de centrage pour détermination de la zone d'irradiation, scanners de positionnement avant irradiation).

Concernant l'exposition gamma, l'injection de ^{18}F FDG expose à 3,5 MBq/Kg soit un niveau de référence diagnostique de 1200 mGy/cm lors d'un TEP-TDM.

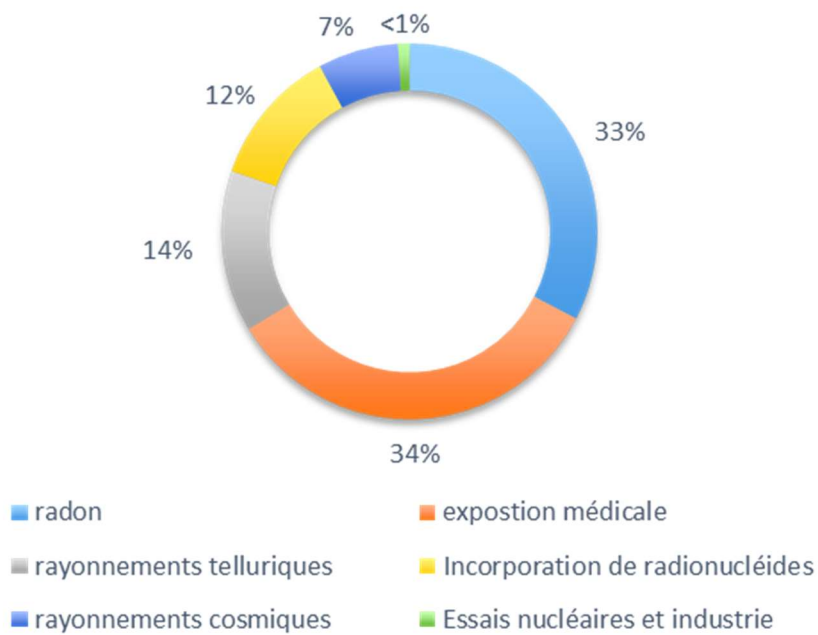


Figure 14 : Les différentes sources d'exposition radioactives en France (d'après le bilan IRSN 2020).

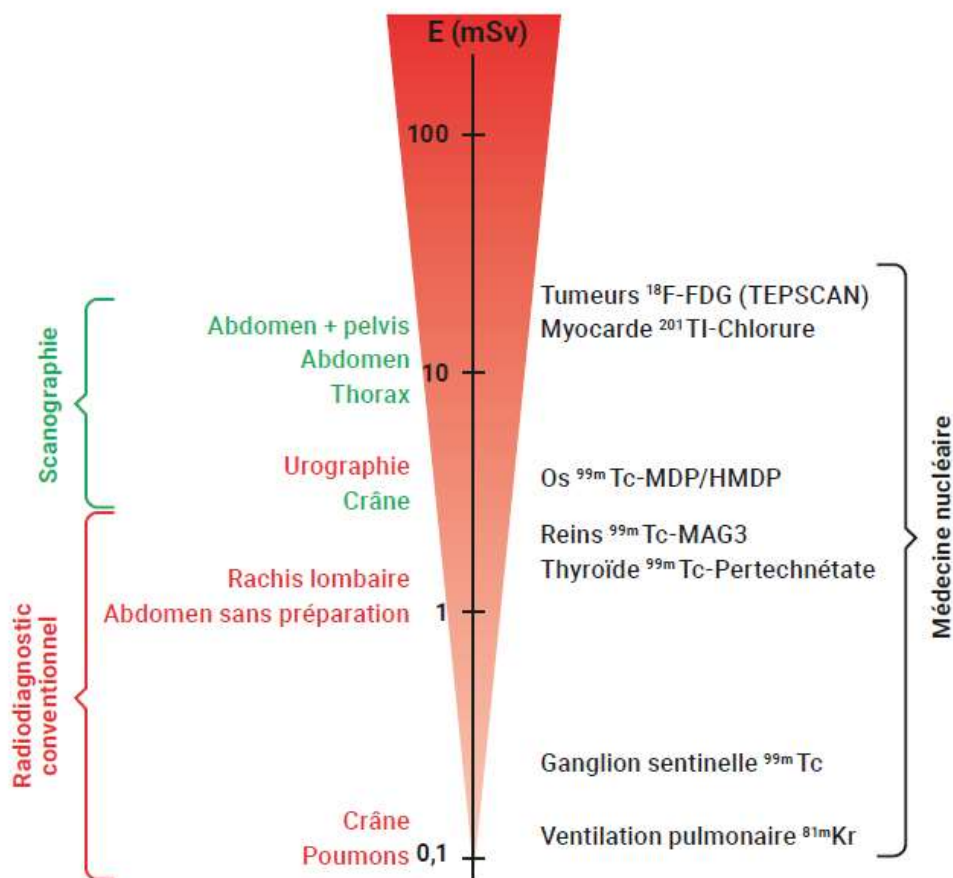


Figure 15 : Les différentes sources d'exposition aux rayonnements ionisants dans les prises en charge diagnostiques (d'après le bilan IRSN 2010).

A visée thérapeutique :

Les RI à visée thérapeutique sont délivrés en plusieurs sessions de plusieurs Gy (W. Hamish B. Wallace et al. 2005).

La curiethérapie consiste en la mise en place d'une source radioactive de type gamma à proximité du tissu cible. Ce traitement local est utilisé pour certains cancers pelviens, du col de l'utérus, de l'endomètre et du canal anal, à proximité des ovaires.

La radiothérapie externe avec exposition aux rayonnements X est utilisée chez près de 50% des patients cancéreux. Si les doses délivrées à l'ovaire sont faibles pour un traitement de cancer du sein avec des valeurs comprises entre 0,012 et 1,48 mGy environ (Mahdavi et al. 2019), le traitement des hémopathies expose à des doses beaucoup plus fortes avec une irradiation délivrée de 14,4 Gy lors d'un conditionnement pré-greffe (W. H. B. Wallace, Thomson, et Kelsey 2003; W. Hamish B. Wallace et al. 2005).

2.2. Effets des rayonnements ionisants sur l'organisme

2.2.1. Effets cliniques somatiques

Les effets des RI peuvent être :

- Déterministes : ils sont obligatoires et apparaissent précocement. Ils sont liés à une perte massive de cellules. Ces effets sont dose-dépendants et observables dès 0,2 Gy.

A forte dose, les RI peuvent impacter les grandes fonctions de l'organisme des mammifères (Tableau 1). Ils peuvent mettre en jeu le pronostic vital notamment par des effets sur le tube digestif entraînant une mort chez la souris en quelques jours pour des doses supérieures à 8 Gy.

Tableau 1 : Valeurs seuil des effets déterministes des rayonnements ionisants sur les grandes fonctions de l'organisme de mammifères.

Fonction	Humain	Souris
Peau	1 Gy (rougeur)	1 Gy (rougeur)
Digestion	10 Gy	8 Gy
Hématopoïèse	1 Gy	1 Gy
Neurologique (système nerveux central)	45 Gy	> 20 Gy
Respiratoire	10 Gy	10 Gy

A faible dose, les effets des RI sur la santé sont débattus notamment pour des expositions inférieures à 100 mSv. Toutefois, des irradiations à de faibles doses ont montré des effets toxiques sur lignées cellulaires comme les cellules souches hématopoïétiques adultes (Rodrigues-Moreira et al. 2017) ou les cellules souches de la peau (Cavallero et al. 2020).

- Stochastiques : ils sont aléatoires, plus tardifs et n'ont pas de dose seuil d'apparition. Ce sont principalement des effets génétiques et des cancers.

2.2.2. Effets sur la fertilité féminine

L'exposition aux RI est un facteur de risque connu d'altération de la fertilité féminine. Celle-ci peut être de deux types :

- soit quantitative avec un risque d'hypofertilité voire de stérilité (W. H. B. Wallace, Thomson, et Kelsey 2003; Sauvat et al. 2009; Edelman et al. 2014).
- soit qualitative, avec un risque héréditaire.

2.2.2.1. Le risque de diminution de la fertilité

L'exposition aux RI peut amener à une stérilité c'est-à-dire à l'incapacité définitive de concevoir. Maintenant quasiment abandonnée la suppression ovarienne radio-induite était l'un des moyens historiquement utilisés pour le traitement des néoplasies mammaires hormono-dépendantes à côté des ovariectomies chirurgicales puis des hormonothérapies. L'exposition fractionnée à 14 Gy (4 fractions/4 jours) permettait un taux de castration de 100% chez des femmes de plus de 40 ans (Leung et al. 1991). Cependant, celle-ci était insuffisante pour les femmes de moins de 40 ans qui nécessitaient une dose cumulée de 20 Gy (Leung et al. 1991; Richards et al. 1990). Les femmes de moins de 35 ans recevant une telle dose avaient encore certainement des ovocytes dans leurs ovaires puisque des cas de grossesse ont souvent été signalés (Gans, Bahary, et Levie 1963; Polishuk et Schreiber 1956).

Les effets iatrogènes de la radiothérapie sur la fertilité féminine apparaissent le plus souvent sur le long terme à distance des traitements et commencent par un tableau d'insuffisance ovarienne prématurée (IOP). L'IOP se définit par une aménorrhée de plus de quatre mois survenant avant l'âge de 40 ans, avec un taux élevé de gonadotrophines (FSH supérieure à 40 UI/l) sur au moins deux prélèvements distincts faits à quelques semaines d'intervalle (Goswami et Conway 2005). Il s'agit donc d'une définition clinico-biologique qui n'est pas forcément le

reflet du nombre d'ovocytes restant dans l'ovaire et qui ne peut pas être appréciée en période pré-pubertaire du fait de l'absence de cycle menstruel. L'évaluation du risque de survenue d'IOP après exposition aux RI est capitale pour l'information des patientes avant traitement et pour justifier l'orientation en préservation de la fertilité. Elle nécessite donc la connaissance de la radiosensibilité de l'ovocyte. Celle-ci peut être quantifiée et comparée selon les espèces via la dose létale pour 50% (DL50) des CGs.

2.2.2.2. Le risque héréditaire

Pour les CGs radio-résistantes, c'est-à-dire qui survivent à une exposition aux RI, les dommages à l'ADN radio-induits sont à risque de mutations et donc de transmission d'une information génétique modifiée. Soit il s'agit de réarrangements du génome non viables et sources de fausses couches, soit il s'agit de mutations viables pouvant être à risque héréditaire. Un tel risque est globalement peu rapporté dans les études épidémiologiques menées après exposition(s) accidentelle(s) aux RI (la descendance d'individus exposés, comme les survivants de la bombe atomique) bien que certains résultats soient contradictoires (Tableau 2).

Tableau 2 : Principales études du risque héréditaire après exposition accidentelle aux rayonnements ionisants chez l'Homme (adapté de Adriaens et al., 2009).

Author	Population studied	Type of exposure	Summary of results
UNSCEAR (1993)	Children of atomic bomb survivors	Average gonadal dose (parents combined) 0.4 Sv, but up to 2.5 Sv	
	Children whose fathers worked at the Sellafield nuclear plant	Dose to the fathers ≥ 100 mSv before conception and ≥ 10 mSv in the 6 months before conception	Little risk of hereditary damage from moderately low exposures to ionizing radiation
	Patients receiving radiation treatments	0.7-2.7 Gy maternal irradiation; 0.25-3.7 Gy paternal irradiation	
	Populations living in areas with elevated background radiation in India, Brazil, Canada, the Russian Federation and China	Fine particles of monazite containing radionuclides from the thorium and uranium series	
	Population in Hungary	Radionuclides from the Chernobyl accident	
Radiologic technicians	X-rays		
RERF (1999)	88 485 children of the A-bomb survivors	Parents received a mean dose of approximately 200 mGy	No evidence of clinical or sub clinical effects
Kallen et al. (1998)	19 494 infants born to 10 237 women	Early gonadal irradiation of the mothers with β -particles, γ -rays or X-rays, at the age of 18 months	Fewer infants; small excesses of perinatal deaths and congenital malformations
Byrne et al. (1998)	2198 offspring of 1092 cancer survivors and 4544 offspring of 2032 control parents	Of the cancer survivors, 72.8% received non-mutagenic therapy and the remainder received therapy that could be classified as mutagenic	No difference in the rates of genetic diseases in the 2 groups status of the parents

Sperling et al. (1994)	Population of West Berlin	Radionuclides from the Chernobyl accident	Significant increase in Down's syndrome
Burkart et al. (1997)	Population of Northern Bavaria	Radionuclides from the Chernobyl accident	Significant increase in Down's syndrome
Little (1993)	Populations of countries most exposed to Chernobyl accident	Radionuclides from the Chernobyl accident	No consistent evidence of congenital anomalies
Casara et al. (1993)	73 pregnancies in 70 women	Therapeutic doses of ^{131}I in differentiated thyroid cancer	No deleterious effects on subsequent pregnancies
Boice et al. (2003)	25 000 survivors of childhood cancer who gave birth to or fathered over 6000 children	46% with over 100 mSv to the gonads and 16% over 1000 mSv	No risk for inherited genetic diseases
Dubrova et al. (1996)	Children from Chernobyl survivors (79 families and 105 control families).	^{137}Cs surface contamination	Minisatellite mutations twice as high in children of exposed families as in controls
Kodeira et al. (2004)	Children from atomic bomb survivors (48 families and 49 control families)	Fathers or mothers exposed to mean doses of either 1.34 or 1.61 Sv, respectively	No increase of minisatellite mutations

2.2.2.3. La préservation de la fertilité féminine

Face aux risques connus des irradiations sur la fertilité féminine, les patientes se voient proposer plusieurs techniques différentes permettant de protéger leurs ovaires/ovocytes.

Transposition ovarienne

La transposition ovarienne (TO) est une technique chirurgicale permettant de placer les ovaires dans les deux gouttières pariéto-coliques afin de les éloigner du champ d'irradiation. Cette chirurgie est utile en cas d'irradiation abdomino-pelvienne ou pelvienne dans des pathologies où le risque de métastases sur l'ovaire transposé est très faible. De plus elle ne concerne que les femmes de moins de 40 ans car les résultats fonctionnels, en termes de maintien des fonctions endocrines, sont médiocres après cet âge.

Le taux de patientes ayant une préservation de leur fonction ovarienne après irradiation externe varie entre 50 et 72 % (Chambers et al. 1991; Feeney et al. 1995). Le taux de préservation des fonctions endocrines de l'ovaire après curiethérapie vaginale postopératoire est de 90 % (Morice et al. 2000). Il est de 60 % après irradiation externe postopératoire (Morice et al. 2000).

Transplantation ovarienne hétérotopique

Il s'agit du prélèvement d'un ovaire et de ses pédicules, qui seront ensuite immédiatement greffés en hétérotopique (Leporrier et al. 1987). Néanmoins cette procédure est lourde et ne peut être proposée en cas d'irradiation corporelle totale (TBI) ou de chimiothérapie intensive.

Préservation des ovocytes et/ou de tissu germinale

En évitant l'exposition à des agents reprotoxiques pour certains ovocytes/embryons cryoconservés, la préservation de la fertilité (PF) a amélioré le succès de la conception chez les femmes infertiles ayant survécu à un cancer (Garcia-Velasco et al. 2013; Marklund et al. 2021; Mayeur et al. 2021). Les stratégies de PF comprennent soit la vitrification d'ovocytes fécondés ou non fécondés obtenus après hyperstimulation ovarienne contrôlée (HOC) ou après maturation *in vitro* (MIV), soit la cryoconservation de tissu ovarien (CTO) (Grynberg et al. 2012; Donnez et Dolmans 2017) (Figure 16).

La cryoconservation d'ovocytes et/ou d'embryons après une HOC représente actuellement les méthodes de PF les plus établies car la stimulation hormonale augmente le rendement en ovocytes matures et le taux de naissances vivantes cumulées (Garcia-Velasco et al. 2013; Cobo et al. 2018). Le prélèvement d'ovocytes immatures associé à la MIV a également démontré son efficacité en cas de contre-indication à la stimulation hormonale (Shalom-Paz et al. 2010; Moria et al. 2011; Creux et al. 2018; Mayeur et al. 2021). Le nombre optimal d'ovocytes pour obtenir une naissance vivante a récemment été déterminé comme étant compris entre 10 et 20 dans une population de patientes en bonne santé (Ji et al. 2013; N. Wang et al. 2021). Compte tenu de la courte période précédant le début du traitement du cancer, les patients atteints de cancer ne bénéficient que d'un nombre limité de cycles de PF. Ainsi, un nombre élevé d'ovocytes matures est rarement obtenu.

La CTO permet de cryoconserver un grand nombre de FP et peut être considéré comme une technique prometteuse avec plus de 130 bébés nés dans le monde (Roux et al. 2010; Donnez et Dolmans 2017; Shapira et al. 2020). Cette technique nécessite des traitements chirurgicaux lourds qui peuvent ne pas être acceptés par certaines patientes fragiles. Cette stratégie de PF est actuellement recommandée lorsque la cryoconservation d'ovocytes/embryons n'est pas possible, ou à la préférence de la patiente, principalement dans des situations de toxicité ovarienne très attendue (Oktay et al. 2015; Gellert et al. 2018). L'une des principales préoccupations est la réintroduction possible de cellules malignes après une autogreffe, principalement chez les patientes atteintes de leucémie (Rosendahl et al. 2010).

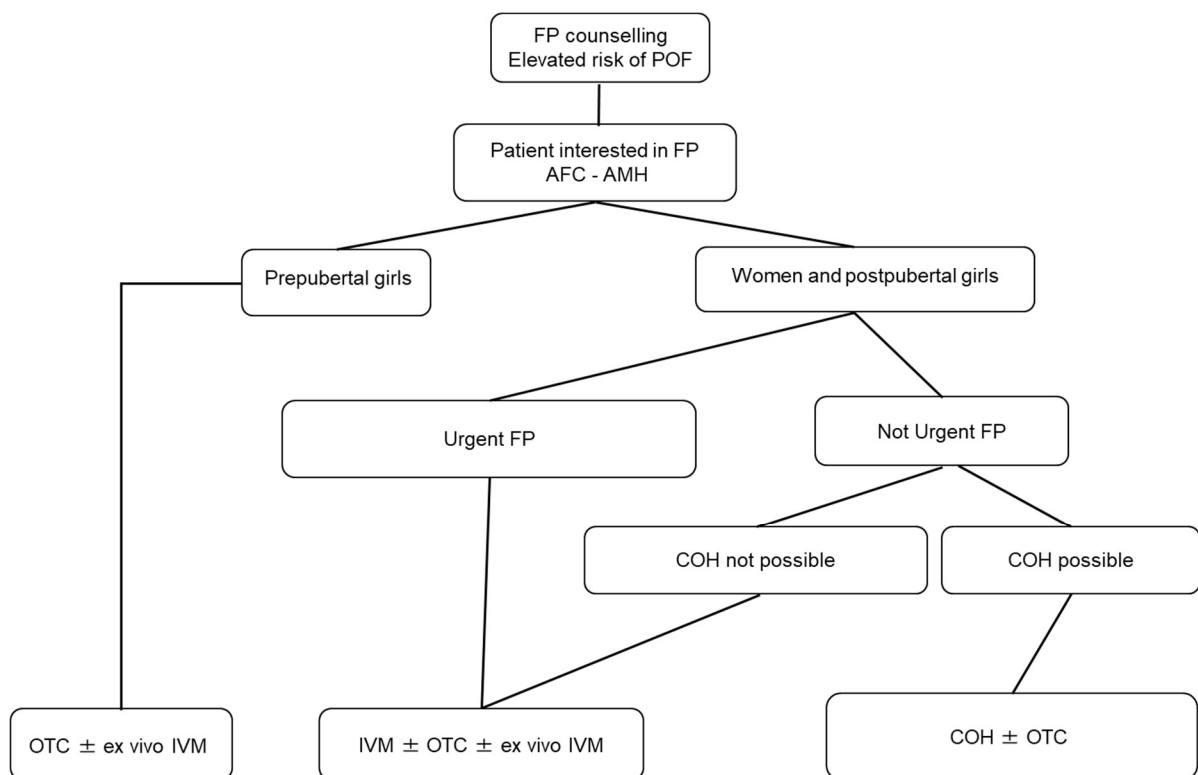


Figure 16 : Principales stratégies actuelles de préservation de la fertilité féminine.

AFC: antral follicle count; AMH: anti-mullerian hormone; COS: controlled ovarian hyperstimulation; IVM: *in vitro* maturation; FP: fertility preservation; OTC: ovarian tissue cryopreservation; POF: premature ovarian failure

Pour maximiser les chances de grossesse des jeunes patientes atteintes de cancer, on peut envisager une combinaison de plusieurs méthodes de PF chez les patientes subissant un traitement gonadotoxique à risque modéré/élevé. Huober-Zeeb et al. ont d'abord rapporté que l'ablation partielle initiale du tissu ovarien n'affectait pas substantiellement le nombre moyen et la qualité des ovocytes prélevés après HOC (Huober-Zeeb et al. 2011). L'intérêt de la CTO suivi de l'HOC a été confirmé par Dolmans et al. avec des taux de prélèvement d'ovocytes MII et de cryoconservation d'embryons de bonne qualité similaires à ceux des femmes stimulées dans un contexte d'infertilité masculine (Dolmans et al. 2014). En cas de contre-indication hormonale de patientes prépubères ou lorsque le délai avant le traitement curatif est une contrainte, la MIV peut également être associée avec succès à la CTO, augmentant ainsi le rendement de PF (Hourvitz et al. 2015). Ces stratégies mixtes de PF ne sont actuellement pas recommandées de manière systématique car leur force de preuve est considérée comme faible ou réservée aux programmes de recherche (The ESHRE Guideline Group on Female Fertility Preservation et al. 2020).

Elle est parfois même réalisée après traitement (Wikander et al. 2021) afin d'obtenir une quantité d'ovocytes suffisantes en banque, permettant d'augmenter les chances de grossesse en cas d'insuffisance ovarienne prématurée ou de stérilité iatrogène.

La fertilité des femmes à distance des traitements génotoxiques est le plus souvent évaluée sur le plan quantitatif à partir de marqueurs indirects de la réserve ovarienne (clinique, CFA, AMH, FSH, oestradiol). Pourtant si des ovocytes ont réparé de manière infidèle des dommages à l'ADN n'entraînant pas la mort cellulaire, alors le risque de transmission d'anomalies génomique/génétique n'est pas à exclure.

2.3. Effets cellulaires des rayonnements ionisants

Les effets cliniques des RI sont la conséquence directe ou indirecte de leurs effets cellulaires.

2.3.1. Les lésions cellulaires radio-induites

L'exposition aux RI peut altérer les composants cellulaires par atteinte des protéines, des lipides et des acides nucléiques. Ces altérations peuvent survenir de manière directe par exemple par la rupture de liaisons covalentes. Elles peuvent également être secondaire à la radiolyse de l'eau, source d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Figure 17).

L'exposition aux RI induit différentes lésions de l'ADN : les cassures simple-brin ou double-brin, les mésappariements de nucléotides, les pontages inter-brins, les pontages ADN-protéines, les pontages ADN-ADN ou encore les modifications de base. Ces lésions peuvent aussi survenir physiologiquement en conséquence du métabolisme cellulaire (stress oxydatif, réplication de l'ADN..) qui induit des dizaines de milliers d'altérations de l'ADN journalières.

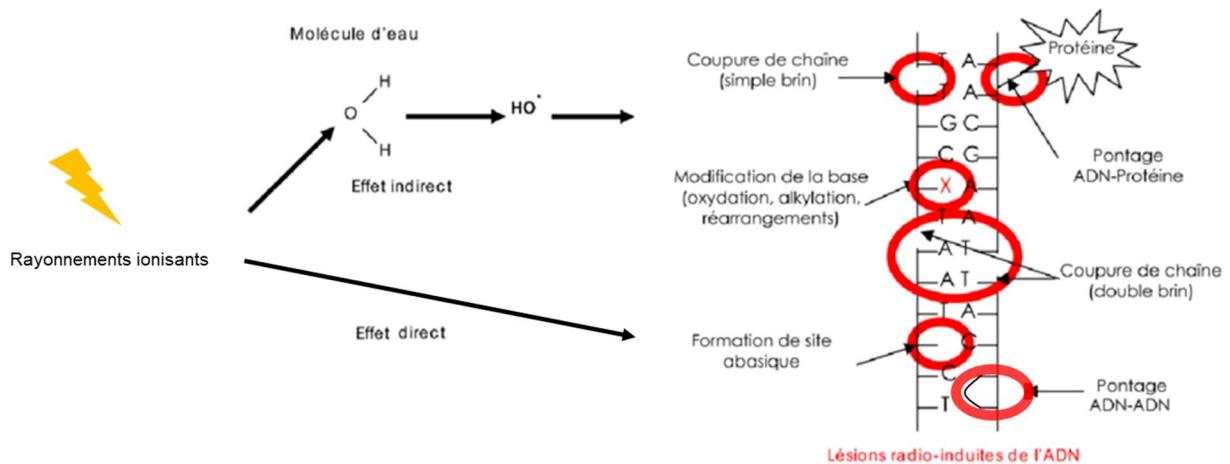


Figure 17 : Le large spectre des lésions radio-induites de l'ADN.

Les CDBs sont des lésions de l'ADN très toxiques, sources à la fois de mort cellulaire mais aussi d'instabilité génomique. Leur prise en charge peut aboutir à des mutations favorisant la survenue de cancers par engagement de cellules somatiques dans des processus tumorigènes ou la transmission d'une information génétique modifiée dans le cadre des CGs. De plus, l'incidence des CDBs est fortement augmentée suite à l'exposition aux RI comparativement aux autres types de dommages (Tableau 3).

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés en particulier aux CDBs radio-induites au niveau du follicule ovarien qui est constitué, comme nous l'avons vu, de cellules somatiques, les cellules folliculaires et d'une CG, l'ovocyte.

2.3.2. Les effets sur la cellule somatique

Lorsque l'ADN des cellules est endommagé, trois mécanismes distincts se mettent en place (Figure 18). Tout d'abord, l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire va arrêter la progression des cellules dans le cycle et ainsi leur division. Le blocage du cycle va permettre la réparation de l'ADN endommagé, qui constitue le deuxième mécanisme. Enfin, si les dommages sont trop importants, les cellules vont être éliminées par apoptose.

La défaillance d'un de ces systèmes peut aboutir à des phénomènes de cancérisation liés à la mutagenèse de l'ADN chez l'individu concerné.

Tableau 3 : Estimation du nombre de lésions à l'ADN en condition physiologique et après une irradiation de 1Gy (d'après Pouget et al. 1999; Biau et al. 2019).

Type de lésion	Conditions physiologiques	Irradiation 1 Gy	Rapport Irradiation / physiologique
Cassures simple-brin	20 000 - 40 000	1 000	1/30
Cassures double-brin	Très faible	40	Très fort > 40
Lésions de bases	20 000	2 000	1/10
Autres lésions	5 000	200	1/25

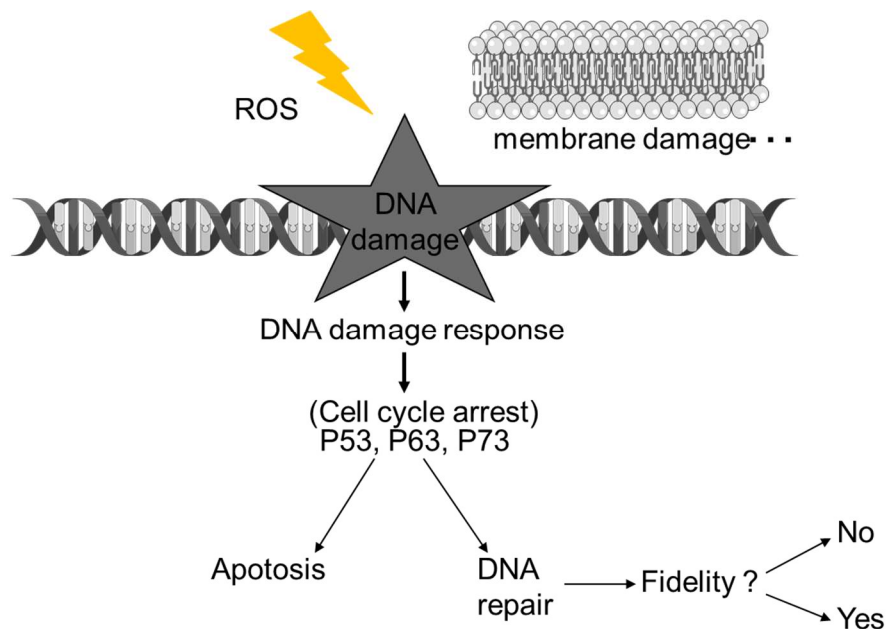


Figure 18 : Schéma simplifié des effets cellulaires des rayonnements ionisants.

Dans les cellules somatiques, les lésions de l'ADN entraînent un arrêt du cycle puis la réparation plus ou moins fidèles (risque de cancérisation) des lésions ou la mort cellulaire par voie apoptotique via l'activation de P53.

L'ovocyte post-natal est lui bloqué en fin de prophase I. De telles lésions peuvent entraîner la mort ovocytaire par apoptose (risque de diminution de la fertilité) ou la survie après réparation plus ou moins fidèles des lésions (risque héréditaire). Ces conséquences sont orientées par l'activation de P63 et P53 (Suh et al. 2006; G. Livera et al. 2008; Bolcun-Filas et al. 2014).

2.3.3. Les effets sur l'ovocyte

Les deux grands risques sur la fertilité féminine des RI (quantitatif et qualitatif) sont la conséquence de deux types d'altérations de l'ovocyte :

- La diminution de la fertilité est directement liée à la radiosensibilité qui correspond à la mort de CGs.
- le risque héréditaire est lié à des modifications du génome.

2.3.3.1. Radiosensibilité de la cellule germinale femelle

En prénatal chez la souris, la radiosensibilité des CGs varie selon leur stade de différenciation puis leur progression en méiose. Ainsi, si les ovogonies sont fortement radiosensibles, les ovocytes deviennent de plus en plus radio-résistants du stade leptotène au stade pachytène puis la radiosensibilité est forte à partir du stade diplotène chez la souris (Baker 1971; Hanoux et al. 2007). Cela est lié en partie à des états chromatinien différents et à l'implication de différents médiateurs de la mort cellulaire au cours de l'ovogénèse. Ainsi en période post-natale, les ovocytes au stade diplotène dans les FP sont fortement radiosensibles du fait de l'expression de TAp63 α (cf. section 1.4.1.) (G. Livera et al. 2008; Suh et al. 2006).

2.3.3.1.1. L'apoptose ovocytaire radio-induite

Le principal mécanisme de mort cellulaire radio-induite concernant l'ovocyte est la voie de l'apoptose comme pour les cellules somatiques (Figure 12).

Au stade diplotène, l'irradiation active TAp63 et notamment TAp63 α (G. Livera et al. 2008) (Suh et al. 2006) qui induit la production des protéines BH3 (PUMA/NOXA) initiateurs d'apoptose via l'activation des facteurs proapoptotiques de la famille BCL-2. En effet, chez des souris *Puma*^{-/-} *Noxa*^{-/-}, les ovocytes survivent à des doses de 0,45 Gy et même de 4,5 Gy et les souris seraient normalement fertiles (Jeffrey B. Kerr et al. 2012). De plus, après irradiation gamma, l'induction de ces deux membres de la famille BH3 a été retrouvée dans les ovocytes de la réserve des souris sauvages mais pas dans les souris déficientes pour TAp63 (Jeffrey B. Kerr et al. 2012). Une voie apoptotique non canonique impliquant l'activation de la caspase 2 est également impliquée dans l'activation des caspases effectrices (caspases-3 et caspase-9 clivées) 6 heures après irradiation (Hanoux et al. 2007).

Récemment des études se sont intéressées aux médiateurs en amont de la voie apoptotique dans la lignée germinale femelle. ATM phosphoryle CHK2 une protéine régulatrice du cycle cellulaire impliquée dans la signalisation des CDBs de l'ADN (cf. 3.). L'utilisation de souris

Chk2 -/- (Bolcun-Filas et al. 2014) ou l'inhibition de CHK2 en culture organotypique (Coutandin et al. 2016) ont montré une survie ovocytaire significative après irradiation malgré la présence de la protéine P63. CHK2 participe à l'activation de P63 mais également de P53 lors d'irradiation à forte dose (3Gy) (Bolcun-Filas et al. 2014; G. Livera et al. 2008).

Cette mort ovocytaire radio-induite augmenterait significativement à 9h, atteindrait son pic à 12h et serait achevée à 48h post irradiation avec 0,5 Gy à 1 jpp chez la souris (Hanoux et al. 2007). L'augmentation de la dose d'irradiation augmente les dommages radio-induits ce qui accélère la cinétique de mort ovocytaire (Suh et al. 2006). En effet le ratio ovocyte normal/atrélique diminue dès 6h après une irradiation à 8,5 Gy (Chang et al 2000).

2.3.3.1.2. Les modèles d'étude de la radiosensibilité ovocytaire

La radiosensibilité ovocytaire peut être quantifiée et comparée selon les espèces via la DL50 des CGs.

Les études rétrospectives chez la femme :

La détermination de la DL50 est capitale pour informer les patientes quant au risque de survenue d'IOP/stérilité et pour les orienter en préservation de la fertilité. Il n'existe pas, à ce jour, de détermination expérimentale de la DL50 des ovocytes chez la femme. Des approches indirectes basées sur des relations entre dose d'irradiation et survenue d'une IOP/stérilité chez la femme ont permis d'estimer la radiosensibilité ovocytaire humaine. Il s'agit d'études rétrospectives observationnelles pour lesquelles les quantifications des doses effectivement reçues à l'ovaire sont rarement décrites (Tableau 4).

Wallace et al. ont ainsi utilisé un premier modèle de décroissance de la réserve ovarienne et calculé une DL50 des ovocytes inférieure à 2 Gy (Wallace et al, 2003) au lieu de 6-18 Gy (Bianchi, Potten, et Hendry 1983) ou 4 Gy (W. H. Wallace et al. 1989). A partir du modèle de déclin de la réserve ovarienne de Faddy et Gosden chez des femmes en bonne santé (Faddy et al. 1992) et de la DL50 de la réserve ovarienne fixée à 2 Gy, Wallace et al. ont ensuite proposé un modèle de prédiction de l'âge d'insuffisance ovarienne selon la dose reçue à l'ovaire (W. Hamish B. Wallace et al. 2005). Le degré d'atteinte ovarienne est lié au volume traité, à la dose totale d'irradiation, au schéma de fractionnement et à l'âge au moment du traitement (Lushbaugh et Casarett 1976; Meirou et Nugent 2001; W. Hamish B. Wallace et al. 2005). La dose stérilisante effective pour laquelle l'IOP est radio-induite dans 97,5% des cas est inversement corrélée à l'âge : 20,3 Gy à la naissance ; 18,4 Gy à 10 ans ; 16,5 Gy à 20 ans et 14,3 Gy à 30 ans ((W. Hamish B. Wallace et al. 2005). D'après ces études on peut estimer la dose à partir de laquelle les premiers FP sont éliminés à environ 0,12 Gy ce qui

représente une radiosensibilité élevée comparée aux cellules somatiques. Ce nouveau modèle permet également d'estimer le risque d'insuffisance ovarienne avant la puberté ce qui n'est cliniquement pas réalisable. Cette approche indirecte de la DL50 a toutefois des limites. En effet, les variations interindividuelles de la réserve ovarienne peuvent expliquer des cas ne respectant pas ce modèle de prédiction. De plus, il est important de noter que la majorité de ces patientes avait bénéficié d'un traitement conjoint par chimiothérapie qui peut avoir surestimé la valeur de DL50 liée à l'exposition aux RI. Aucune approche expérimentale n'a pu confirmer ou infirmer la radiosensibilité du follicule ovarien en période post-natale chez la femme mais des études ont été menées chez d'autres mammifères.

Tableau 4 : Principales études relatives au risque de survenue d'insuffisance ovarienne prématurée après expositions aux rayonnements ionisants.

Auteurs	Âge au moment de la radiothérapie	Dose totale délivrée	Dose délivrée aux ovaires	Seuil IOP
Haie-Meder 1993	24,8 ans (moy)	ND	5 Gy (med)	> 5 Gy
Sudour 2010	11 ans (med)	40 Gy (med)	5 Gy (med)	< 4 Gy ovaires : pas de risque 4-15 Gy ovaires : hypofertilité (dépend âge et TTs associés)
Schuck 2005	15 ans (med)	ND	15 Gy	> 15 Gy ovaires : IOP 100 %
Chemaitilly 2017	8 ans (med)	ND	< 1 G à ≥ 20 Gy	< 10 Gy : 27 % des patientes ≥ 10 Gy : 74 % des patientes
Reinmuth 2013	10 ans (med)	32,5 Gy (moy) 15-54 Gy	ND	OR infertilité = 20,24
Chiarelli 1999	< 20 ans	ND	ND	IOP significatif à partir de ≥ 35 Gy Hypofertilité OR = 3,39 avec irradiation abdomino-pelvienne
Thibaud 1998	10 ans (moy)	Corps entier : 6 x 2 Gy ou 10 x 1 Gy Thoraco-abdominal : 5 ou 6 x 1 Gy	ND	21/23 patientes

IOP : insuffisance ovarienne prématurée ; med : médiane ; moy : moyenne ; ND : non disponible ; TTs : traitements

Les approches expérimentales chez les autres mammifères :

En post-natal, il existe de nombreuses données historiques sur la radiosensibilité des follicules ovariens montrant de grandes variations selon (i) l'âge, (ii) les espèces, (iii) la présence d'une consanguinité, (iv) le stade de la folliculogénèse, (v) l'état chromatinien (pour revue Adriaens, Smitz, et Jacquet 2009).

Dans ces études historiques visant à déterminer la DL50 des follicules ovariens les protocoles d'irradiation sont parfois peu détaillés. Or le débit de dose, par exemple, peut jouer sur la quantité d'énergie déposée si le laps de temps est trop court ou bien sur l'ionisation de l'eau si le temps d'irradiation est trop long. De plus, dans la plupart de ces études, ce sont soit les rayons X soit les rayons gamma qui sont utilisés et aucune ne s'est intéressée à l'impact du type de rayonnement sur la survie ovocytaire dans une large gamme de doses. Pourtant les effets biologiques de ces deux types de RI pourraient être différents selon la dose et le type de cellules (Gott et al. 2020; Scott et al. 2013; Underbrink et al. 1976; Wittenborn et al. 2021). Enfin, aucune étude ne s'est intéressée au cumul de faibles doses qui sont pourtant fréquemment délivrées à des patientes prises en charge en radiothérapie par exemple (cf. 2.1.2.).

Les variations de la radiosensibilité des follicules ovariens selon les espèces (Tableau 5) témoignent probablement de mécanismes cellulaires différents concernant l'orientation vers la mort cellulaire et/ou les mécanismes de réparation de l'ADN.

Tableau 5 : La radiosensibilité des follicules ovariens chez les mammifères (d'après Baker 1974).

Espèce	Follicules primordiaux		Follicules en croissance
	Juvénile	Adulte	
Souris ¹	0,15 (0,07)	0,5 (0,10-0,15)	20 (nd)
Rat ¹	1 (nd)	3,15 (1)	4,4 (nd)
Cocon d'Inde	nd (nd)	150 (5)	nd (nd)
Cochon	nd (5)	nd (>5)	nd (nd)
Vache	nd (9)	nd (>9)	nd (nd)
Singe	20 (nd)	70 (50)	50 (nd)
Femme ²	nd (nd)	50 (20)	nd (nd)

Dose létale pour 100% des ovocytes (dose létale pour 50% des ovocytes), valeurs exprimées en Gy.

¹ Variable selon l'âge, la lignée et le protocole d'irradiation.

² Pour un âge ≤ 35 ans et avec des doses fractionnées.

Gy : gray ; nd : non déterminé

2.3.3.2. Le risque héréditaire

2.3.3.2.1. Les anomalies chromosomiques

Les RI peuvent induire des aberrations chromosomiques de type anomalies de nombre et/ou de structure des chromosomes (Figure 19).

Les anomalies chromosomiques de nombre résultent d'erreurs de ségrégation chromosomique lors de la division cellulaire qui entraînent une aneuploïdie, c'est à dire une anomalie du lot chromosomique au sein d'une cellule. Ces aberrations de nombre dans les ovocytes aboutissent la plupart du temps à la mort *in utero*. Les aneuploïdies viables sont des maladies génétiques dont beaucoup sont associées à un retard mental et à des malformations congénitales. Chez la souris irradiée, des travaux ont montré la relation entre l'exposition aux rayonnements et l'induction de l'aneuploïdie (Reichert et al., 1975; Hansmann et al., 1982; Tease, 1982, 1985; de Boer et van der Hoeven, 1991). Deux voies principales peuvent être envisagées : une non-disjonction primaire de chromosomes structurellement normaux ou, plus fréquemment, une mauvaise ségrégation secondaire, conséquence d'un réarrangement chromosomique, tel qu'un échange de chromatides pour produire une trisomie tertiaire (Tease et Fisher, 1986; de Boer et van der Hoeven, 1991). Les conceptus présentant une polyploïdie induite, soit au moins trois lots complets de chromosomes (triploïdie, tétraploïdie etc.) ont peu de chances de survivre jusqu'aux premiers stades post-implantation et ne sont pas viables dans l'espèce humaine (Reichert et al., 1975; Tease et Fisher, 1996). Quant aux monosomies, seule la monosomie du chromosome X (syndrome de Turner) est viable chez la souris et chez la femme.

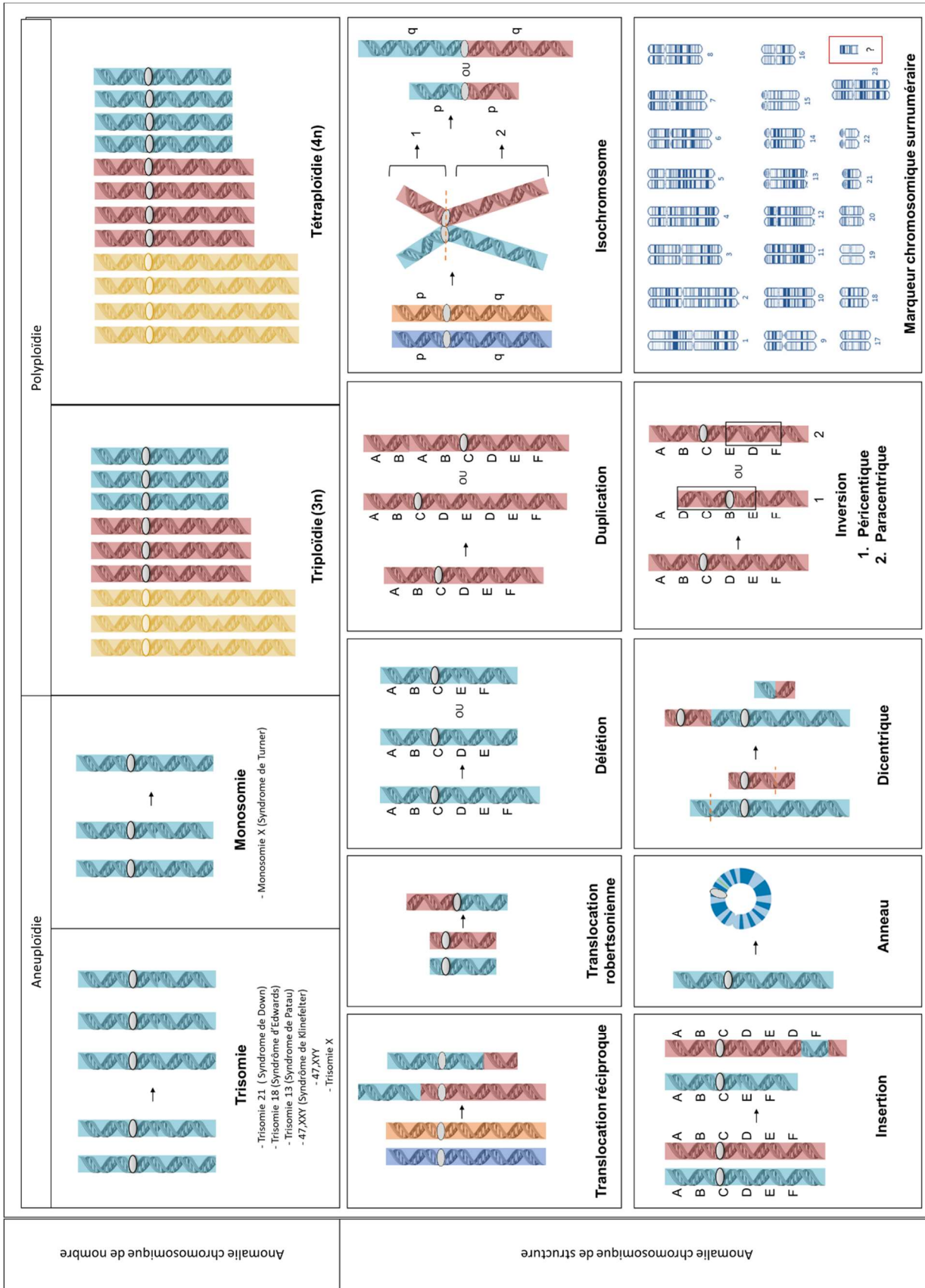


Figure 19 : Les principales aberrations chromosomiques (adapté des données de A. Mouka).

En plus des anomalies chromosomiques de nombre, on retrouve des anomalies de structure des chromosomes qui sont la conséquence de cassures chromosomiques suivies d'un ou plusieurs recollements anormaux et qui peuvent soit être équilibrées (sans perte de matériel génétique) soit déséquilibrées (avec perte ou gain de matériel génétique). Parmi elles, on retrouve les translocations (robertsoniennes ou réciproques), les inversions, les insertions, les duplications, les délétions, les chromosomes en anneaux chromosomiques, les chromosomes dicentriques ou encore les marqueurs chromosomiques.

Les translocations réciproques (généralement appelées échanges de chromatides) sont un exemple des anomalies stables qui peuvent être transmises à la descendance. S'il n'y a pas de matériel perdu ou de gain alors l'anomalie chromosomique est dite équilibrée. En revanche, lors de la méiose, lorsqu'il y a appariement de séquences chromosomiques homologues suivi d'un CO, des multivalents peuvent apparaître, entraînant de mauvaises ségrégations chromosomiques et des gamètes déséquilibrés (Figure 20). Les patients porteurs de translocations réciproques sont donc à risque d'infertilité et de fausses couches à répétitions. Plus un zygote est déséquilibré, plus ce risque augmente. Une large étude menée au Québec a permis d'estimer qu'une translocation était présente chez 2,2% des parents avec une fausse couche, 4,8 % après deux fausses couches et 5,7% après trois fausses couches (De Braekeleer et Dao 1990).

Le risque héréditaire concernant les anomalies chromosomiques est débattu. Les quelques études menées chez le rat concernent la descendance de mâles irradiés et sont contradictoires (Vorobtsova 2000; Kropáčová, Slovinská, et Misúrová 2002; Slovinská, Elbertová, et Misúrová 2004). Une seule étude a été menée dans la lignée germinale femelle et n'a pas montré d'augmentation des anomalies cytogénétiques chez le cochon d'Inde (Jacquet et al. 1997).

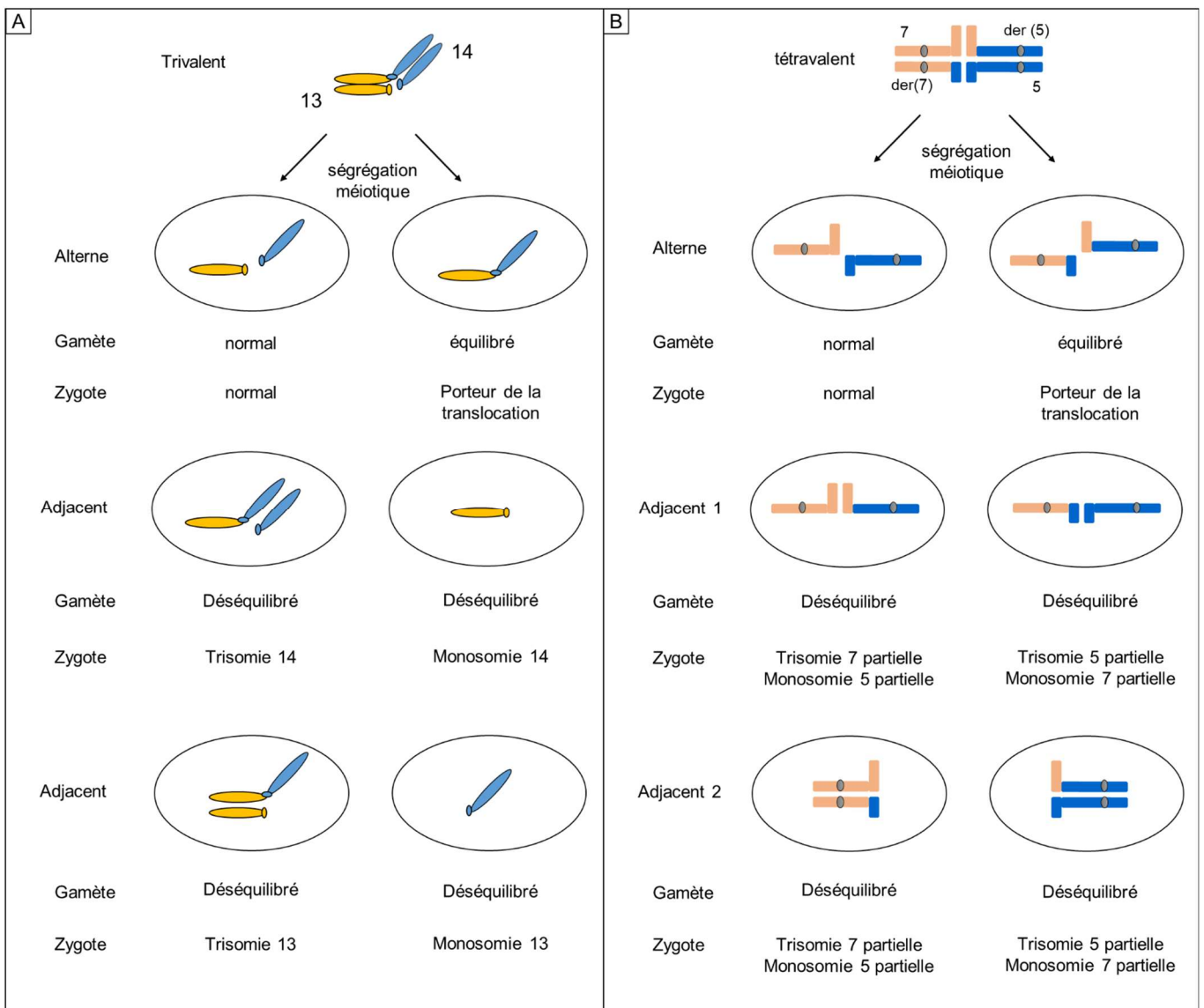


Figure 20 : Illustration des différents modes de ségrégation d'une translocation robertsonienne et d'une translocation réciproque au cours de la méiose (d'après les données de A. Mouka).

La formation des bivalents ne peut pas s'effectuer normalement et il y a formation de trivalents ou de tétravalents.

(A) Translocation robertsonienne impliquant la fusion des deux bras longs des chromosomes 13 et 14 et modes de ségrégation méiotique possibles. Les ségrégations de type adjacentes conduisent à la génération de gamètes déséquilibrés soit à un risque de trisomie ou de monosomie pour la descendance.

(B) Translocation réciproque entre les chromosomes 5 et 7 et modes de ségrégation possibles. Les différents modes de ségrégation (2:2) possibles (alterne, adjacent 1 et adjacent 2) sont représentés.

2.3.3.2.2. Les mutations ponctuelles radio-induites

L'exposition aux RI est un facteur connu de modification de la séquence de l'ADN. Cependant l'évaluation de l'instabilité génomique de la lignée germinale femelle est difficile car le nombre de CGs est limité et qu'elles sont difficiles d'accès comparativement aux CGs mâles. Il existe donc très peu d'études s'étant intéressées à l'éventuelle transmission de mutations ponctuelles radio-induites chez les mammifères femelles.

D'autre part, l'analyse et l'interprétation de l'instabilité génétique est un défi technique qui avant l'émergence du séquençage a été estimé seulement de manière indirecte.

Les premières études menées chez la souris se sont intéressées aux effets dominants léthaux ou tératogènes induits par l'exposition aux RI (Baker 1971). Ils sont augmentés de l'ordre de 38% après accouplement de souris femelles adultes préalablement irradiées à la dose de 3,6 Gy (West et al. 1985). Toutefois ce ne sont que des approches indirectes qui ne rendent compte que des taux élevés de mutation dans la descendance des exposés.

Afin d'évaluer l'instabilité génétique, d'autres approches génétiques ont été utilisées dans la lignée germinale femelle. L'analyse de mutations locus spécifique n'a pas montré de surrisque après irradiation de souris après la naissance à la dose faible de 0,3 Gy (Selby et al. 1991). L'analyse de séquence répétées, les minisatellites, a permis d'identifier des événements mutationnels radio-induits et transmissibles chez la souris mais principalement après irradiation de mâles (Y. E. Dubrova, Jeffreys, et Malashenko 1993; Y. E. Dubrova et al. 1998; Barber et al. 2002). Une seule étude a été menée dans la descendance de rates irradiées et n'a pas retrouvé de sur-risque mutationnel après irradiation de femelles adultes mises en accouplement 80 jours après irradiation (Asakawa et al. 2014). Cette approche a été transposée dans le modèle humain en étudiant l'instabilité génétique dans la descendance des survivants de Chernobyl. L'instabilité génétique était augmentée indiquant un risque accru de mutations transmissibles après exposition aux RI lorsqu'il s'agissait d'un homme mais pas pour les femmes (Y. E. Dubrova et al. 1998; 1996; Yuri E. Dubrova et al. 2002). La lignée germinale femelle aurait, d'après cette approche, une meilleure fidélité dans la réparation des dommages radio-induits de l'ADN ou bien moins de risque de transmettre une anomalie génétique.

Toutefois toutes ces approches historiques ne sont pas sensibles pour détecter des changements de séquence de l'ordre de quelques nucléotides. Deux études seulement ont évalué le risque héréditaire après irradiation de la lignée germinale femelle par séquençage du génome. Satoh et al, ont irradiés des souris adultes femelles à 4 Gy et les ont mises en accouplement le même jour afin d'analyser le séquençage du génome entier des parents et

de la descendance. Ils montrent une augmentation du nombre de mutations de novo avec 4,7 indels et 3,1 mutations multi-sites, moins de 5 % de ces événements se situant dans des séquences codantes (Y. Satoh et al. 2020). Notamment, ils ont trouvé deux types de délétions, à savoir des petites délétions (principalement 1~12 nucléotides) dans des séquences non répétitives, dont beaucoup avaient une micro-homologie à la jonction du point de cassure, et des délétions d'un seul nucléotide dans des séquences répétées. Les résultats suggèrent que ces délétions et mutations multi-sites pourraient être une signature typique des mutations induites par l'irradiation parentale chez les mammifères. Mais ces résultats ne concernent que l'induction de mutations concernant des ovocytes pré-ovulatoires ce qui est moins pertinent pour extrapoler à la fertilité future de patientes qui ne conçoivent pas dans la période de leur traitement. Stringer et al ont séquencé la descendance de souris femelles irradiées avec une période longue entre l'irradiation et la mise en accouplement pour cibler la réserve ovarienne. Leurs résultats montrent l'absence d'un surrisque mutationnel dans la descendance (Stringer et al. 2020). Aucune analyse du risque héréditaire par séquençage génome entier n'a été réalisée chez la femme à ce jour.

Les études qui ont porté sur l'intégrité de l'information génétique après irradiation de la lignée germinale femelle sont donc peu nombreuses et ne permettent pas d'être certain que la conception à partir de gamètes irradiés soit sans conséquence sur la descendance humaine.

2.3.3.2.3. Les modifications de l'épigénome

Les dommages à l'ADN radio-induits sont des causes connues de modifications épigénétiques. Plusieurs études ont montré que la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones régissent les effets transgénérationnels. Ces deux modifications, ainsi que d'autres modifications épigénétiques, sont connues pour être cruciales dans la gamétogenèse et l'embryogenèse précoce. Dubrova et al. ont montré que la méthylation de l'ADN est un mécanisme majeur conduisant à des défauts génomiques transgénérationnels (Yuri E. Dubrova et al. 2000). Kamstra et al. ont irradié un modèle de poisson zèbre et ont évalué le profil de méthylation de l'ADN dans leurs embryons F1. Après l'exposition des parents à 8,7 mGy/h pendant 27 jours, ils ont mis en évidence 5658 régions différenciellement méthylées dans les embryons F1 après fécondation, parmi lesquelles des effets persistants ont été observés dans 5 régions jusqu'aux générations F3. Cela indique que le signal épigénétique du père F0 peut être transmis à l'œuf fécondé et faciliter la dérégulation de la stabilité génomique (Kamstra et al. 2018).

Aucune étude a porté sur les épimutations après irradiation du mammifère femelle à ce jour.

Le risque héréditaire après irradiation de la lignée germinale femelle est donc actuellement largement méconnu. Une première approche simple est de s'intéresser aux mécanismes de réparation des dommages à l'ADN dont le niveau de fidélité garantit ou non l'intégrité génétique des cellules (Figure 21).

Nous aborderons dans la troisième partie les grandes les voies de réparation et les mécanismes moléculaires sous-jacents à la prise en charge des CDBs, car ce sont les lésions de l'ADN les plus toxiques (Huang et Zhou 2020) et dont l'incidence augmente fortement après exposition aux RI (cf. 2.3.1.).

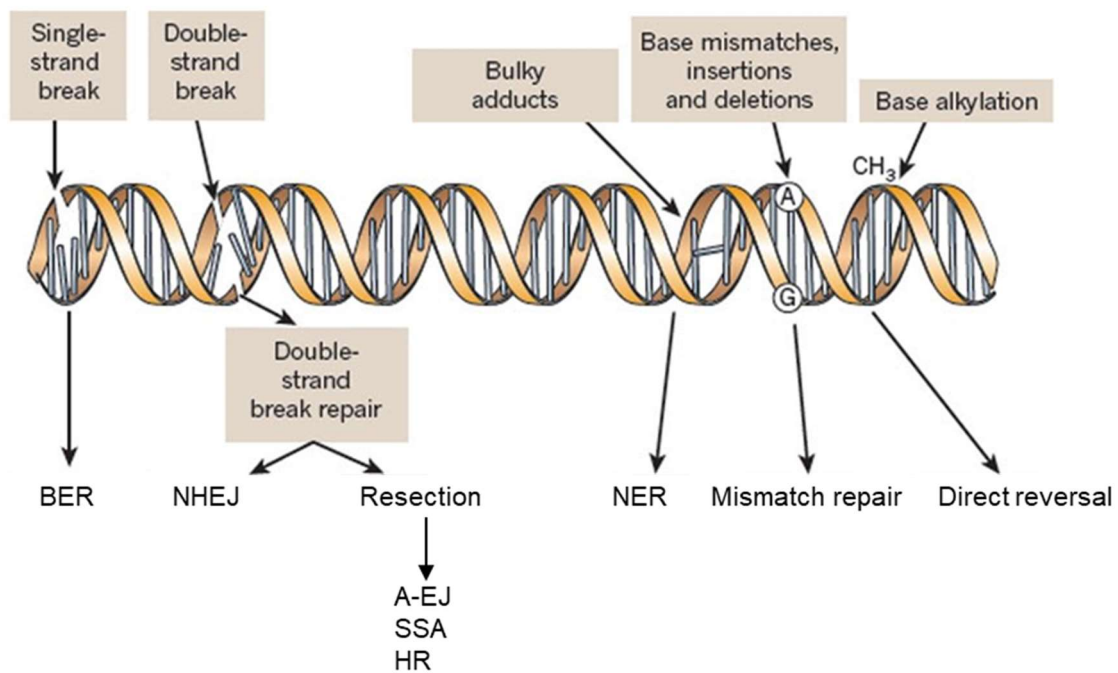


Figure 21 : Les principales voies de réparation des dommages de l'ADN radio-induits (adapté de Lord et Ashworth 2012).

A-EJ: alternative end-joining ; BER: base excision repair ; HR: homologous recombination ; NER: nucleotide excision repair ; NHEJ: non-homologous end joining ; SSA: single strand annealing

3. Origine et prise en charge des cassures double-brin de l'ADN

L'ADN cellulaire est une structure bicaténaire antiparallèle sous forme de double hélice (Watson et Crick 1953). Chaque brin d'ADN est constitué d'un enchaînement de nucléotides (Adénine, Thymine, Cytosine et Guanine) associés via des liaisons covalentes phosphodiester. C'est au niveau de ces liaisons que peut être induit une cassure simple-brin ou double-brin. Si l'induction de CDBs est indispensable à certains grands processus biologiques contrôlés (notamment immuns et méiotiques), elle est le plus souvent délétère à la survie cellulaire (Rich, Allen, et Wyllie 2000) ou à risque pour l'intégrité de l'information génétique (Richardson et Jasin 2000). Nous aborderons dans cette partie les aspects moléculaires des réponses cellulaires aux CDBs.

3.1. Origines

Des facteurs exogènes tels que l'exposition à des RI comme la radiothérapie, l'utilisation de chimiothérapies anticancéreuses comme les inhibiteurs de topoisomérases, peuvent générer des CDBs. Elles sont également générées physiologiquement par le métabolisme cellulaire. C'est le cas par exemple lorsqu'une fourche répliquative bute sur une lésion bloquante (simple-brin, pontages interbrins..) ou lorsque la cellule est en situation de stress générant des ROS (Lindahl 1993; Mehta et Haber 2014; So et al. 2017). Les CDBs sont aussi un moyen de diversification de l'information génétique utilisée par la cellule dans d'importants processus biologiques. Elles sont alors induites de manière contrôlée par des complexes enzymatiques couplés à des mécanismes de réparation dédiés. Dans la réponse immunitaire lymphocytaire, la recombinaison V(D)J et la commutation isotypique permettent la diversité de la réponse humorale et cellulaire (Mehta et Haber 2014; Schatz et Ji 2011; Y. Zhang et al. 2019). En prophase I de méiose, les CDBs permettent la recombinaison homologue méiotique, source de diversité génétique et sont induites par le complexe SPO11-TOPVIB-like (Scott Keeney 2001) (cf. 1.2.3.3.).

3.2. Détection et signalisation des cassures double-brin

3.2.1. Détection

Le complexe MRN (MRE11, RAD50, NBS1) ou MRX (MRE11, RAD50, XRS2) chez *S. cerevisiae*, est le principal détecteur dont dispose la cellule pour repérer les dommages à l'ADN (Figure 22). RAD50 forme un hétéro tétramère avec MRE11 qui s'attache aux extrémités de

l'ADN endommagé et ponté la cassure (de Jager et al. 2001; Williams et al. 2008). RAD50 va dérouler l'ADN facilitant l'accès au site de cassure (Lavin 2007; Park et al. 2017). NBS1 va se lier à RAD50-MRE11 et permettre le recrutement et l'activation de kinases transductrices (Falck et al. 2012; Dupré, Boyer-Chatenet, et Gautier 2006; J.-H. Lee 2005).

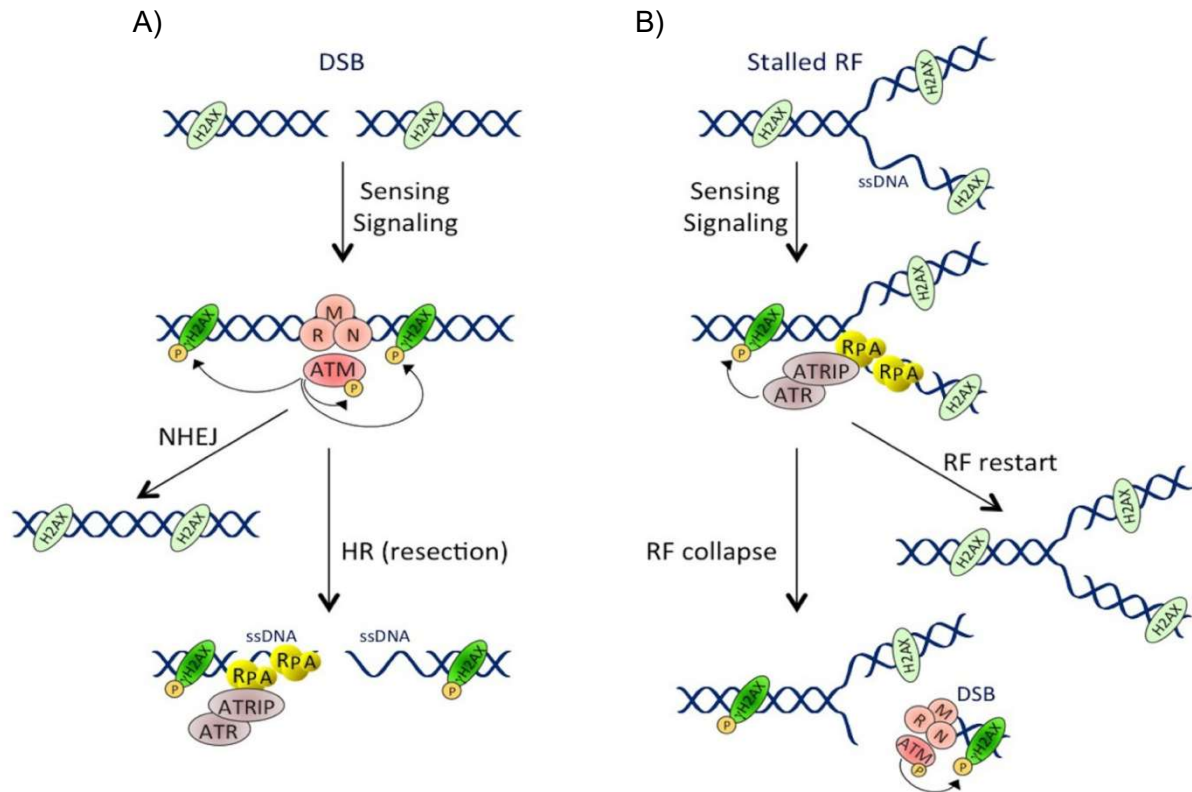


Figure 22 : L'activation des voies ATM et ATR (Bezine, Vignard, et Mirey 2014).

A) Une CDB induit un recrutement MRN dépendant d'ATM. ATM phosphoryle ensuite de nombreux substrats, dont lui-même et H2AX autour du site de la CDB. La réparation de la cassure s'effectue par la jonction des extrémités non homologues, par recombinaison homologue ou par d'autres mécanismes de réparations abordés dans les prochaines sections de cette partie.

B) Pendant le stress répliatif. Le blocage de la fourche de réplication (RF pour replication fork) induit la formation d'ADNsb qui est rapidement recouvert par RPA. Cette structure est reconnue par ATRIP, qui entraîne le recrutement et l'activation d'ATR. En plus de phosphoryler ses autres substrats, ATR phosphoryle localement H2AX. Le RF peut redémarrer en cas de stress transitoire ou s'effondrer après des stress prolongés. L'effondrement du RF induit la formation de CDB et l'activation de la voie ATM, conduisant à une seconde et plus importante vague de phosphorylation de H2AX.

3.2.2. Signalisation et conséquences cellulaires

Les kinases transductrices activées par MRN sont notamment ATM en cas de CDB et ATR en cas de présence d'ADNsb, kinases de la famille des PI3K (Durocher et Jackson 2001) (Figure 22).

La présence de MRN sur un site de CDB induit des autophosphorylations d'ATM sur plusieurs sérines qui induisent son activation (Kozlov et al. 2006). Le recrutement d'ATM est régulé par de nombreuses modifications post-traductionnelles comme des activités phosphatases (Ali et al. 2004; Goodarzi et al. 2004) ou acétyl-transférases (Sun et al. 2005).

Lors d'arrêts de réplication de fourche, en phase S du cycle cellulaire, c'est le recrutement d'ATR qui prévaut (Nam et Cortez 2011; Paulsen et Cimprich 2007). Cela est lié à la formation d'ADNsb au site de cassure sur lequel se lie la protéine de lésion à l'ADN simple-brin RPA qui va ensuite recruter ATR Interacting Protein (ATRIP) permettant enfin le recrutement de la kinase ATR (Ball et al. 2007; Mordes et al. 2008). Cette prise en charge de lésion simple-brin peut aboutir soit à un redémarrage de la fourche soit à son effondrement entraînant l'apparition d'une CDB alors prise en charge conjointement avec le recrutement d'ATM.

Le système ATM/ATR va activer des protéines kinases checkpoint du cycle cellulaire. La phosphorylation de checkpoint kinase 2 (CHK2) par ATM et de checkpoint kinase 1 (CHK1) par ATR induit l'activation des effecteurs P53 et Cell Division Cycle 25C (CDC25) responsables de l'arrêt du cycle cellulaire (Yue Chen et Poon 2008; Liu et al. 2020). Ces blocages peuvent intervenir à 3 points de contrôles du cycle : en G1/S en cas de lésion de l'ADN en phase G0/G1 ; en intra-S en cas de dommage au cours de la réplication et en G2/M, avant l'entrée en mitose, si des lésions sont survenues en phase G2 (Figure 23).

Comme évoqué précédemment, si la cellule n'est pas en capacité de réparer les dommages à l'ADN par défaut de facteur de réparation ou parce que les lésions sont trop importantes, un processus d'activation de la mort cellulaire par apoptose est enclenché (Roos et Kaina 2006). Dans le cas contraire, les CDBs vont pouvoir être prises en charge par des voies de réparation spécifiques détaillées ci-après. Ces voies de réparation sont plus ou moins fidèles, pouvant être à l'origine de processus tumorigènes dans les cellules somatiques mitotiques ou de transmission à la descendance de mutations dans le cadre de la CG (Figure 18).

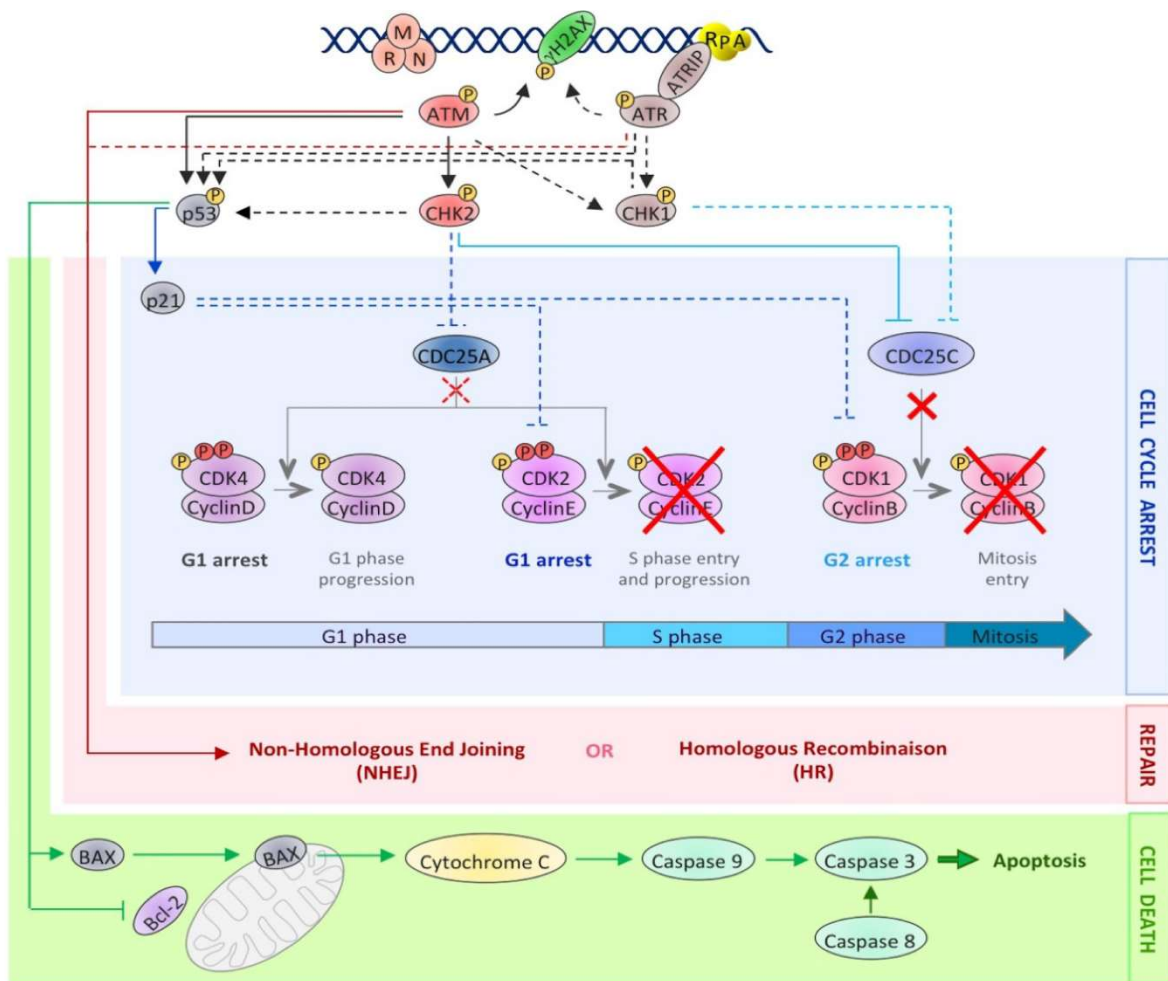


Figure 23 : Les voies de réponse cellulaire aux dommages de l'ADN (Bezine, Vignard, et Mirey 2014).

Le système ATM/ATR va engendrer une cascade de phosphorylations qui vont amplifier le signal de dommage à l'ADN. Elles vont notamment intéresser le complexe MRN ainsi que l'histone H2AX sur la sérine 139 en position gamma (γ H2AX) sur de larges domaines chromatiniens autour du point de cassure (Shroff et al. 2004). Cette formation de foyers γ H2AX intervient rapidement, dans les minutes qui suivent la survenue de la lésion. Après irradiation, leur nombre est corrélé avec le nombre de CDBs induites et le pic intervient vers 30 min (Beyreuther et al. 2009; Costes et al. 2010; Rogakou et al. 1999). Ainsi, l'étude de lignées cellulaires somatiques a montré qu'une irradiation à la dose de 1 Gy engendrait environ entre 20 (phase G0-G1) et 40 CDBs (phase G2) soit environ 0.4 à 0.9 CDB par chromosome chez l'homme (Rothkamm et Lobrich 2003; Asaithamby et al. 2008; Schultz et al. 2000; Marková, Schultz, et Belyaev 2007). L'accumulation de γ H2AX amplifie la signalisation de la CDB et la rend accessible par un remodelage chromatinien. Ces cascades de phosphorylations vont notamment promouvoir le recrutement de Tumor Protein P53 Binding Protein 1 (53BP1) et/ou breast cancer 1, early onset (BRCA1) aboutissant à la formation de foyers de réparation qui seront déterminants pour orienter le choix de la voie de réparation (Bohgaki et al. 2013; J. Yan et Jetten 2008).

3.3. Le choix des voies de réparation des CDBs : résection ou pas ?

Après signalisation, la CDB peut être réparée soit (i) directement par jonction des extrémités non homologues (Non Homologous End Joining, NHEJ) dont le premier facteur spécifique recruté à la CDB est l'hétérodimère KU70/KU80 ; soit (ii) après une étape de résection initiée par le complexe MRN-CTBP-interacting protein (CtIP) permettant une réparation par recombinaison homologue (HR pour Homologous Recombination) ou d'autres voies comme le NHEJ alternatif (alt-NHEJ), ou le « single-strand annealing » (SSA). Deux voies supplémentaires nécessitant une résection sont décrites : le BIR (Break-induced Replication) pour des stress réplcatifs et le contrôle télomérique (Guirouilh-Barbat et al. 2014; Kramara, Osia, et Malkova 2018) et la voie de l'anémie de Fanconi en cas de présence de pontages inter-brins de l'ADN en phase S que nous n'aborderons pas dans ce travail (pour revue Renaudin et Rosselli 2020). Comme nous le verrons dans les prochaines parties, ces voies de réparation ne conduisent pas à la même fidélité de réparation, la RH étant considérée comme fidèle contrairement au NHEJ. L'engagement dans la voie de la résection est donc un choix crucial dans la prise en charge d'une CDB.

Ce choix entre NHEJ et résection dépend de la phase du cycle cellulaire. Le NHEJ ou l'alt-NHEJ sont actifs durant tout le cycle cellulaire, alors que la RH ou le SSA sont actifs seulement à la fin de la phase S et pendant la phase G2 (Katsuki et al. 2020; Symington 2016; Hustedt

et Durocher 2016) car ils nécessitent une matrice de réparation qui est la chromatide sœur présente en post-répliatif dans le cadre du cycle mitotique (Moynahan et Jasin 2010).

Historiquement, chez les eucaryotes, le choix de la voie de réparation était considéré comme dépendant de la fixation initiale soit de l'hétérodimère KU70/KU80 soit de MRN dictant une orientation vers le NHEJ ou la RH respectivement (Shim et al. 2010; Kochan et al. 2017). Il existe en fait une compétition beaucoup plus complexe autour du site de CDB entre facteurs pro-résectifs et facteurs de stabilisation des extrémités de la CDB. Le choix entre résection et NHEJ est notamment contrôlé par les activités antagonistes de deux protéines : BRCA1 qui favorise la résection (Tarsounas et Sung 2020) et 53BP1 qui limite la résection et favorise le NHEJ (Setiaputra et Durocher 2019) (Figure 24).

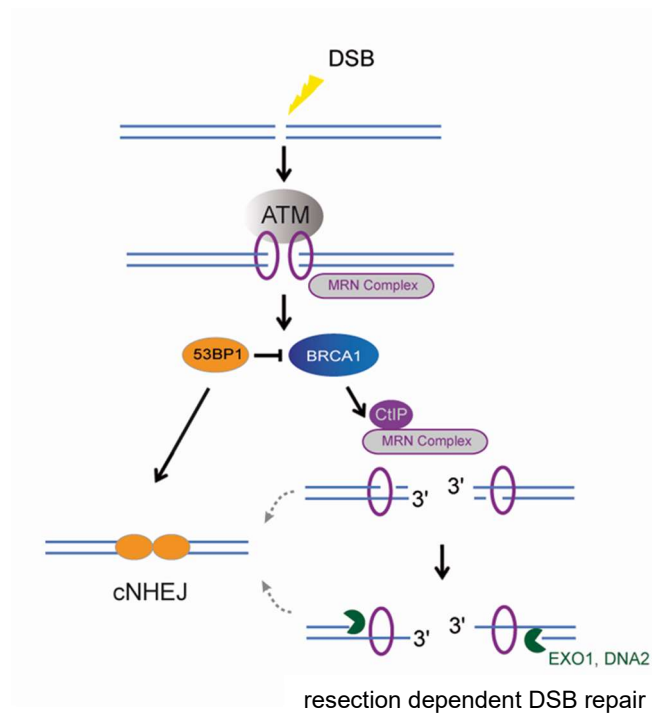


Figure 24 : Schéma simplifié de la régulation de la résection par 53BP1 et BRCA1 dans la prise en charge des CDBs.

DSB : double strand-breaks

Au sein des foyers de réparation de cassure, BRCA1 est recruté par une interaction avec NBS1 du complexe MRN orientant vers la RH (Figure 24). BRCA1 forme un hétérodimère avec BARD1 permettant une activité E3 ubiquitine ligase. Le recrutement du complexe BRCA1/BARD1 au site de la CDB permet l'ubiquitinylation de CtIP qui interagit avec MRE11 du complexe MRN pour initier la résection (Yu et al. 2006; Rass et al. 2009; Bennardo et al. 2008). L'enzyme MRE11 possède une double activité endonucléasique et exonucléasique dans le sens 3' vers 5'. L'interaction entre CtIP et MRE11, favorisée par le complexe BRCA1/BARD1, stimule l'activité endonucléasique de MRE11 créant une incision de l'ADN

double-brin à proximité et de part et d'autre du site de cassure. Puis l'activité exonucléasique de MRE11 va permettre la dégradation des nucléotides dans le sens 3'-5' révélant de courtes portions d'ADNsb (<100 nucléotides) de part et d'autre de la CDB. C'est à cette étape qu'intervient le choix d'étendre ou non la résection via l'activation de la fonction exonucléasique des nucléases exonuclease 1 (EXO1) et DNA replication helicase/nuclease 2 (DNA2).

Le recrutement de 53BP1 va, quant à lui, orienter la prise en charge de la CDB vers le NHEJ en antagonisant BRCA1. Il a également été proposé que le complexe 53BP1-RIF1-Shieldin (53BP1-RIF1-REV7-SHLD1-SHLD2-SHLD3) empêche l'extension de résection des extrémités de l'ADN et favorise le NHEJ (Setiaputra et Durocher 2019). Son recrutement fait intervenir des modifications postraductionnelles des histones. L'accumulation de γ H2AX sur les nucleosomes autour de la CDB recrute l'ubiquitine ligase ring finger protein 8 (RNF8) grâce à la fixation de mediator of DNA damage checkpoint 1 (MDC1). RNF8 catalyse la poly-ubiquitinylation de l'histone H1 en lysine 63 qui permet le recrutement de ring finger protein 168 (RNF168). L'ubiquitinylation de l'histone H2A en lysine 15 par RNF168, associée à la méthylation de H4 en lysine 20 (H4K20), permet le recrutement de 53BP1. 53BP1 recrute RIF1 de manière ATM dépendante, qui recrute le complexe shieldin à la CDB. SHLD2 avec ses 3 domaines de fixations aux oligonucléotides fixe la courte portion d'ADNsb issue de l'activité exonucléasique de MRE11 et inhibe la résection 5'-3' médiée par les EXO1 et DNA2 / BLM RecQ like helicase (BLM) (Setiaputra et Durocher 2019).

La limitation de l'orientation vers des voies de réparation résectives par 53BP1 est donc multifactorielle, la perte de 53BP1 dans des cellules déficientes en BRCA1 restaurant la RH parallèlement à l'activation de la résection des extrémités (Bunting et al. 2010).

De manière intéressante le recrutement différentiel de 53BP1 et BRCA1 au site de CDB est finement régulé par des modifications post-traductionnelles des histones orientant le choix de la voie de réparation selon les phases du cycle cellulaire (Nakamura et al. 2019) (Figure 25). La méthylation de l'histone 4 en lysine 20 (H4K20) joue un rôle sur le recrutement de BRCA1 et de 53BP1 sur l'ADN endommagé (Nakamura et al. 2019). H4K20 est préférentiellement sous forme mono- ou diméthylée (H4K20me1 et H4K20me2 respectivement) sur des histones anciens dans la chromatine pré ou post-répllicative tandis qu'il n'est pas méthylé en phase S (H4K20me0) dans les nucléosomes néo-synthétisés (Becker et al. 2021). BRCA1 a une affinité augmentée à H4K20me0 tandis que 53BP1 est préférentiellement recruté aux sites H4K20me1 et H4K20me2. Ainsi la cellule favoriserait une réparation par RH plus fidèle en phase S.

Du modèle compétitif à celui séquentiel dans l'initiation des voies de réparation des CDBs :

Récemment le modèle compétitif a été challengé pour un modèle séquentiel de prise en charge des CDBs (Paull 2021). Les facteurs du NHEJ s'associeraient plus rapidement au site de cassure que ceux de la RH. Ils seraient même nécessaires à l'initiation de la résection par le complexe MRN-CtIP (Deshpande et al. 2020).

La prise en charge des CDBs est donc un processus dynamique finement régulé qui met en jeux des mécanismes épigénétiques. Elle dépend notamment de la phase du cycle cellulaire, de la nature des extrémités de cassure, de la balance entre BARD1-BRCA1 et du complexe Shieldin-53BP1 entre autres.

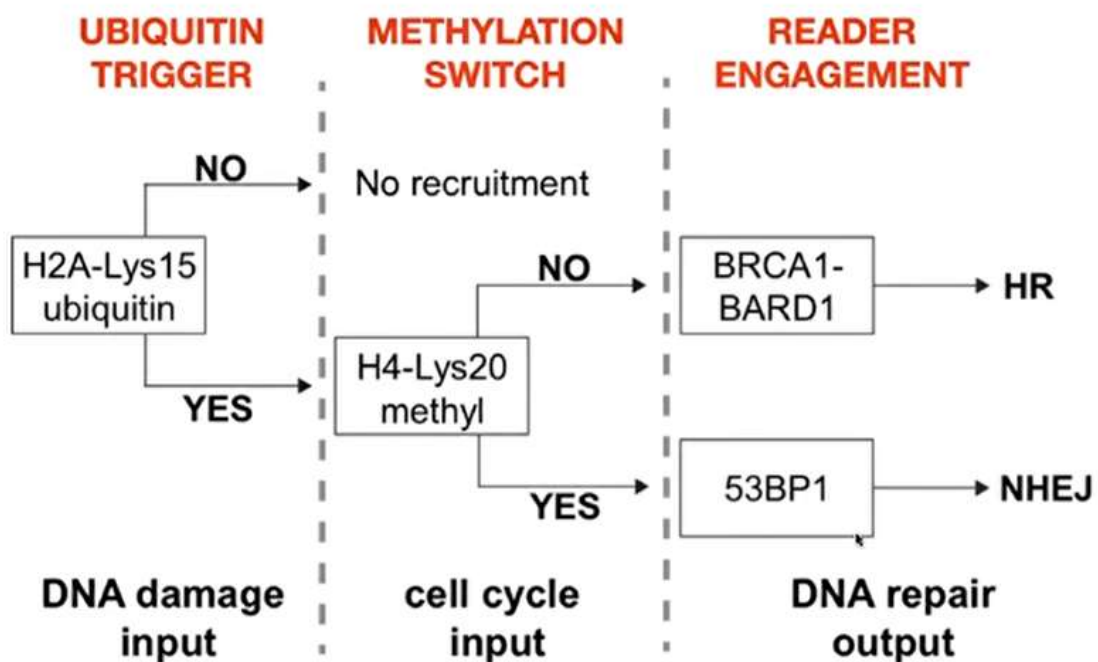


Figure 25 : Les modifications post-traductionnelles des histones dans le recrutement différentiel de 53BP1 et BRCA1 (d'après Becker et al., 2021).

3.4. Voies de réparation des CDBs

Comme évoqué précédemment, on distingue le NHEJ canonique des voies de réparation nécessitant une résection (alt-NHEJ, HR, SSA) (Figure 26). Il est important de noter que l'engagement dans la résection n'est pas définitif et que de nombreuses passerelles sont possibles entre voies de réparation avant un engagement ferme dans telle ou telle voie. Nous nous focaliserons plus particulièrement sur la voie de réparation du NHEJ canonique, la plus fréquemment utilisée, et celle de la RH, prédominante en phase répllicative chez les mammifères et à l'origine des CO dans les cellules méiotiques.

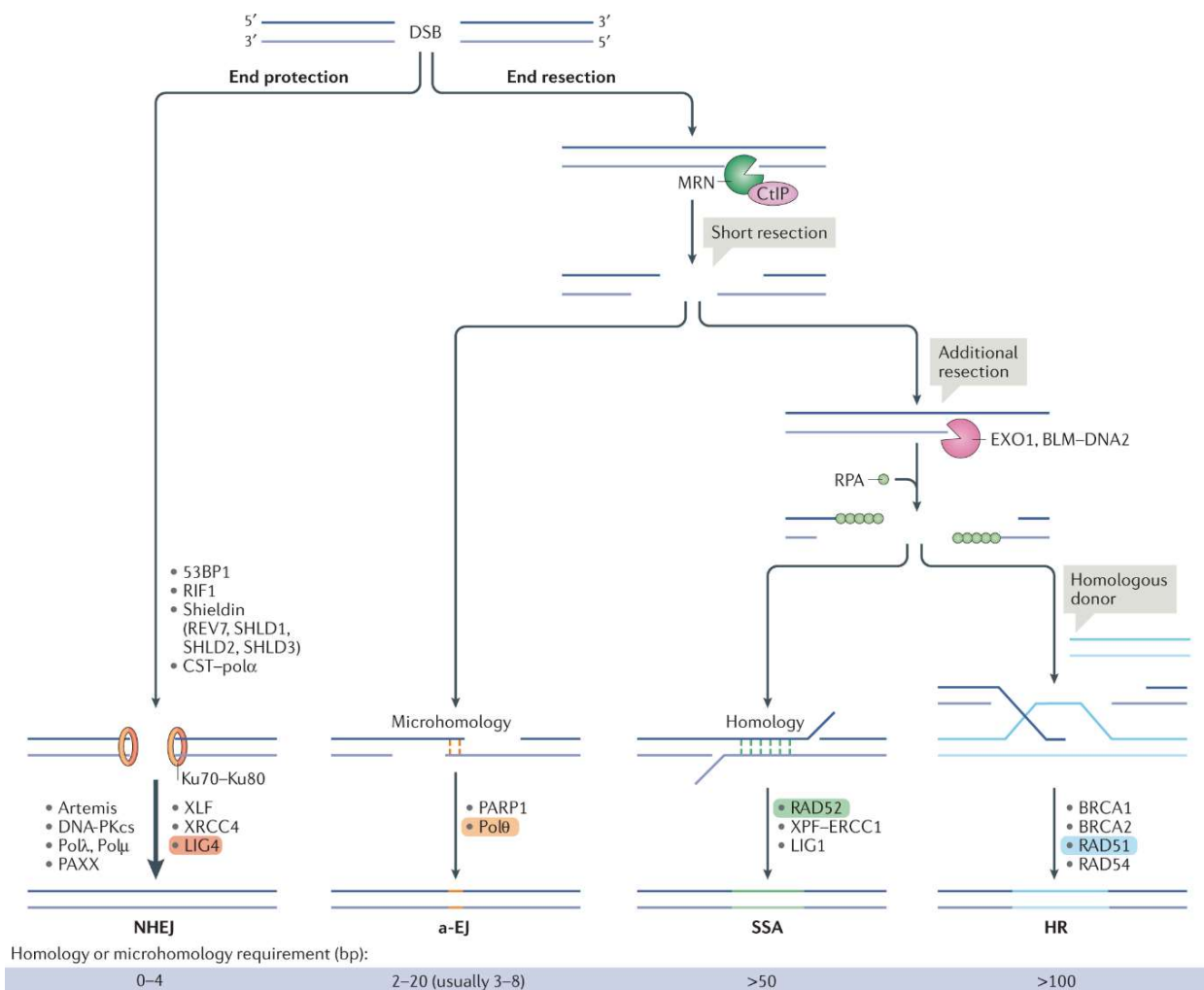


Figure 26 : Le choix des voies de réparation des CDBs de l'ADN (d'après Zhao et al., 2020).

DSB : double strand-breaks

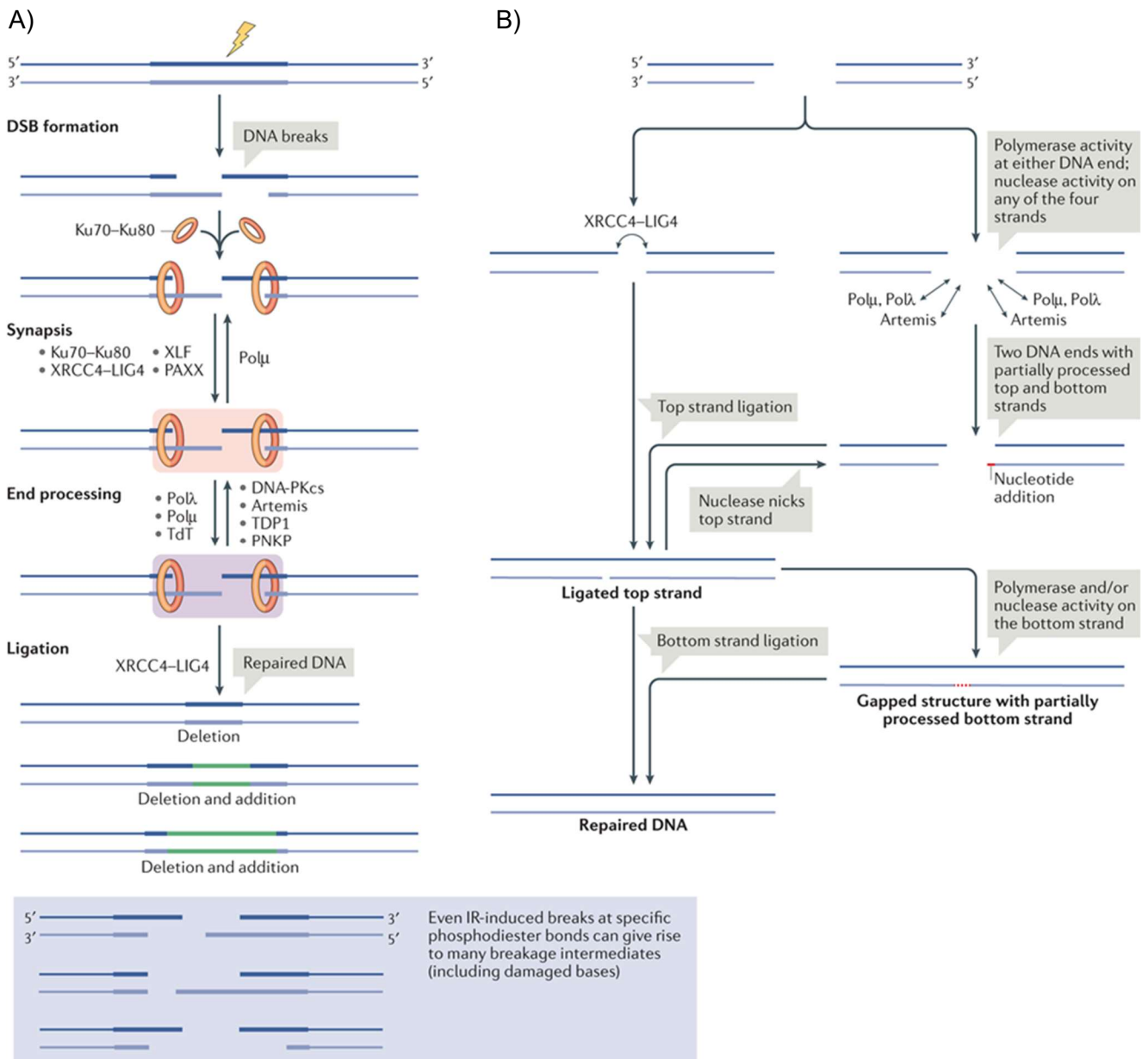


Figure 27: La voie du NHEJ après cassure double-brin de l'ADN (d'après Zhao et al., 2020).

A) Présentation générale de la voie du NHEJ.

B) Le processus de jonction des extrémités est flexible et itératif permettant de multiples cycles de révision de la cassure. Cela signifie que des extrémités d'ADN de configurations diverses peuvent être ligaturées de manière covalente après diverses modifications. XRCC4-LIG4 peut ligaturer chaque brin indépendamment de l'autre. Les ADN polymérases (Polμ et Polλ) peuvent ajouter des nucléotides pour créer des micro-homologies ou pour combler des lacunes afin de faciliter la ligature des brins d'ADN. L'ajout de nucléotides par les polymérases peut également générer un rabat (non représenté), qui nécessite un clivage endonucléolytique.

DSB : double strand-breaks

3.4.1. NHEJ canonique

3.4.1.1. Les grandes étapes

Chez les eucaryotes, la voie de réparation des CDBs par jonction des extrémités homologues peut être activée rapidement et indépendamment du cycle cellulaire puisqu'elle consiste en une « suture » par religation des extrémités ne requérant pas de « modèle » de réparation via une séquence homologue (Rothkamm et Lobrich 2003; Guirouilh-Barbat et al. 2007) (Figure 27). Elle permet la réparation de lésions exogènes et participe à la diversité de la réponse immunitaire des lymphocytes dans le cas de cassures programmées. C'est un processus de réparation dynamique impliquant (i) un synapsis permettant un alignement des extrémités stabilisées ; (ii) une éventuelle maturation des extrémités si elles sont endommagées et enfin (iii) une religation.

Synapsis

La reconnaissance des extrémités s'effectue par le chargement de l'hétérodimère Ku70/Ku80 de part et d'autre de la CDB (Walker, Corpina, et Goldberg 2001). La fixation du complexe Ku va permettre le recrutement de la sous-unité catalytique DNAPKcs (DNA-Protein Kinase catalytic subunit), pour former le complexe DNA-PK (DNA-Protein Kinase) (Gell et Jackson 1999; Singleton et al. 1999). Le complexe DNA-PK va s'autophosphoryler pour faciliter le recrutement de la protéine ligase (LIG4) et de ses cofacteurs X-ray repair cross complementing 4 (XRCC4), XRCC4-like factor (XLF) et PAXX non-homologous end joining factor (PAXX) et stabiliser les extrémités de la CDB (Davis, Chen, et Chen 2014).

Des études menées *in vitro* ont montré que le complexe Ku70-Ku80-XRCC4-LIG4 serait capable de synapser seul deux extrémités d'ADN double-brin compatibles (Chang et al. 2016) et même endommagées (Zhao et al. 2020). Ce synapsing serait flexible et la stabilisation serait renforcée par des facteurs tels que XLF et PAXX (Reid et al. 2015; Tadi et al. 2016).

Une autre voie de synapse indépendante de KU70-KU80 serait permise par l'ADN polymérase mu ($Pol\mu$) qui pourrait synapser et stabiliser deux extrémités chevauchantes 3' partageant une micro-homologie d'au moins une paire de base (Zhao, Watanabe, et Lieber 2020).

Maturation des extrémités

Si la CDB est franche et les extrémités joignables, la ligation peut intervenir sans maturation préalable permettant une réparation fidèle. La modification des extrémités non joignables peut nécessiter de nombreuses enzymes comme des phosphatases, des kinases, des nucléases ou des hélicases telles que EXO1, MRE11, Artémis et Werner syndrome RecQ like helicase

(WRN) (Kusumoto et al. 2008; Weterings et al. 2009; Xie, Kwok, et Scully 2009) (Figure 27). De plus, il peut être nécessaire, dans certains cas, de re-synthétiser quelques nucléotides par l'action de polymérases de la famille des ADN polymérases X : Pol λ et Pol μ (Capp et al. 2007; Fan et Wu 2004) ou la terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dans le développement lymphocytaire (X. S. Wang, Lee, et Zha 2020). Cette maturation des extrémités peut conduire à des délétions, substitutions, voir plus rarement à des insertions de nucléotides et donc être source d'instabilité génétique (pour revue Chang et al. 2016; Bétermier, Bertrand, et Lopez 2014).

Ligation des extrémités

C'est l'étape finale du NHEJ au cours de laquelle le complexe XRCC4-LIG4 effectue la ligation des extrémités endommagées. C'est une étape indispensable à l'efficacité du NHEJ ; le défaut de ces protéines étant létal chez la souris (Barnes et al. 1998). Cette étape est favorisée par XLF et PAXX qui est également un des acteurs présent mais dont le rôle reste à définir (Chang et al. 2016; Ahnesorg, Smith, et Jackson 2006).

De manière intéressante, le type de voie de réparation influence la survenue de réarrangements chromosomiques. Le NHEJ canonique peut être responsable de translocations dans les cellules somatiques (Guirouilh-Barbat et al. 2007; Piganeau et al. 2013). Le séquençage du génome entier des tumeurs a révélé l'existence de réarrangements complexes inter- et intra-chromosomiques dans un phénomène appelé chromothripsis pour lesquels le NHEJ canonique et l'alt NHEJ seraient impliqués (pour revue Holland et Cleveland 2012; Jones et Jallepalli 2012).

3.4.1.2. Focus sur XLF

XLF aussi appelée Cernunnos, est un facteur clé spécifique du NHEJ canonique (pour revue Menon et Povirk 2017) (Figure 27). Il participe à l'alignement des extrémités endommagées avec XRCC4 et stimule l'activité de ligation des extrémités de XRCC4-LIG4 comme évoqué précédemment (Ahnesorg, Smith, et Jackson 2006). Cette protéine a été identifiée chez des patients porteurs d'un déficit immun sévère combiné radiosensible avec immunodéfiance, radiosensibilité accrue, retard de croissance, microcéphalie et lymphopénie. La forte radiosensibilité des cellules dérivées de ces patients pouvait être corrigée en les complémentant avec un ADN complémentaire (ADNc) XLF sauvage (Buck et al. 2006). L'inactivation de *Xlf* chez la souris entraîne donc une immunodéfiance modérée mais n'est pas indispensable à la survie (Roch et al. 2019; G. Li et al. 2008).

3.4.2. Les voies résectives

Les courtes portions d'ADNsb générées par l'activité exonucléasique de MRE11 peuvent être directement prises en charge par alt-NHEJ ou bien être plus extensivement ressectées (Figure 24) pour former une extrémité 3' d'ADN simple-brin qui sera protégée et stabilisée par la protéine RPA. Les extrémités extensivement ressectées seront alors prises en charge par RH ou SSA (Figure 26). Il est important de noter que cet engagement dans la résection n'est pas définitif, surtout avant extension de la résection, car une néosynthèse de nucléotides peut être réalisée par des polymérases permettant une réparation par NHEJ (Figure 27).

3.4.2.1. L'alt-NHEJ

Après initiation de la résection par le complexe MRN (Mre11/Rad50/Nbs1)-CtIP, la réparation de la CDB peut s'effectuer par alt-NHEJ (Guirouilh-Barbat et al. 2014; Rass et al. 2009) en utilisant les micro-homologies (2-4 nucléotides) des séquences monobrans qui se trouvent de part et d'autre de la cassure. Ces micro-homologies sont reliées par le complexe XRCC1-ligase III (Audebert et al. 2006) en entraînant le plus souvent des délétions au niveau de la CDB. Elles peuvent aussi conduire à des translocations et des réarrangements en reliant des extrémités non adjacentes (pour revue So et al. 2017; Bétermier, Bertrand, et Lopez 2014).

3.4.2.2. La recombinaison homologue

Contrairement aux autres mécanismes, la RH est un mécanisme de réparation de l'ADN considéré comme fidèle de car elle utilise comme matrice de réparation une séquence homologue (chromatide sœur en cycle mitotique, homologue en prophase I méiotique).

Formation du complexe présynaptique

Après extension de la résection et stabilisation des portions d'ADNsb par RPA, le complexe BRCA2/PALB2 favorise le remplacement de RPA par RAD51 pour former un filament nucléoprotéique formé de RAD51 et de l'ADNsb ou complexe pré-synaptique, signant l'engagement définitif dans la voie de la RH. La formation de ce nucléofilament est favorisée par BRCA1 et les paralogues de RAD51 (Mehta et Haber 2014; Guirouilh-Barbat et al. 2014).

Phase synaptique

Le complexe pré-synaptique va scanner l'ADN à la recherche d'homologie de triplets nucléotidiques (Lee et al, 2015). *In vivo*, un minimum de 70 bases d'homologie chez la levure et de 90-200 bases chez le mammifère serait nécessaire (Ira et Haber 2002). Cette recherche d'homologie est cruciale pour la fidélité de la réparation de la cassure et le type de voie de réparation mis en jeu. Lorsqu'une matrice d'ADN suffisamment compatible est trouvée, le nucléofilament RAD51-ADNsb 3' l'envahit par appariement de bases aboutissant à la formation d'une D-loop (boucle de déplacement). Cet envahissement peut être rejeté via le complexe TOP3-RMI1 (Haber 2015).

Phase post-synaptique

Après stabilisation de la D-loop, la phase post-synaptique consiste en l'extension de l'ADN envahissant par action d'une ADN polymérase afin de recopier l'information manquante (Krejci et al. 2012; Mehta et Haber 2014; Guirouilh-Barbat et al. 2014; Jasin et Rothstein 2013). Plusieurs polymérases peuvent participer à ce processus mais Pol δ joue un rôle majeur (McVey et al. 2016). Une structure complexe formée des deux ADN interagissant reliés par un ADNsb est alors formée, c'est la jonction de Holliday (JH).

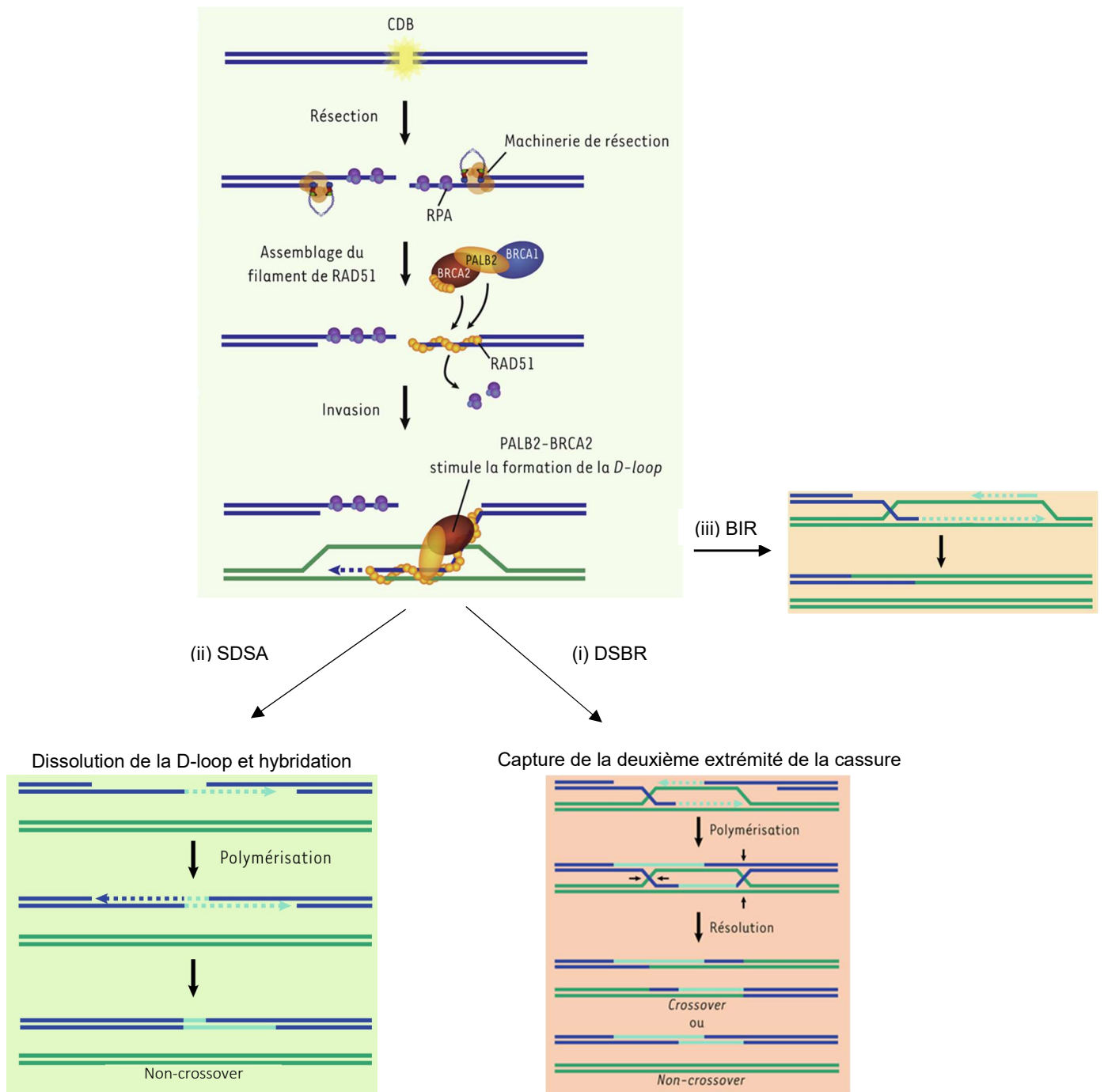


Figure 28 : La recombinaison homologue (adapté de Buisson et Masson 2013).

Résolution

Après l'étape d'extension, trois mécanismes différents peuvent être utilisés pour compléter la réparation en fin de RH : (i) le double-strand break repair (DSBR), (ii) le SDSA (synthesis-dependent strand annealing) ou (iii) le BIR (Figure 28).

(i) Une invasion miroir, de l'autre côté de la CDB, peut avoir lieu sur la même matrice formant une double jonction de Holliday (dHJ) (Ciccica et Elledge 2010) qui sera résolue par la voie du DSBR (double-strand break repair) en créant des produits de recombinaison type CO ou non-NCO selon l'orientation de la résolution.

(ii) La D-loop peut être dissoute avant la formation de la dHJ pour hybrider l'ADN simple-brin envahissant avec la deuxième extrémité de la cassure. Le produit de recombinaison sera alors de type NCO (réparation par SDSA).

(iii) Dans la troisième voie appelée BIR, la structure D-loop se convertit en fourche de réplication pour recopier le bras entier du chromosome et aboutit à une perte d'hétérozygotie. La voie du SDSA est prédominante dans la réparation par RH de l'ADN, tandis que la voie du BIR est la moins fréquente. Cette dernière est principalement utilisée dans le processus de rallongement des télomères des cellules déficientes pour la télomérase en induisant une perte de la deuxième extrémité de la cassure (Krejci et al. 2012; San Filippo, Sung, et Klein 2008).

3.4.2.3. Single strand annealing (SSA)

Après extension de la résection des extrémités de la CDB, le SSA consiste en une hybridation directe entre molécules d'ADN simple-brin homologue (pour revue Bhargava, Onyango, et Stark 2016) (Figure 26). Cet appariement est indépendant de RAD51 et dépend fréquemment de Rad52 chez les mammifères. Ce mécanisme de réparation aboutit à la perte de la séquence comprise entre les régions homologues, synonyme de perte d'information génétique. De plus, il peut générer des translocations en cas de réparation de CDB adjacentes (Richardson et Jasin 2000; Guirouilh-Barbat et al. 2014). C'est donc un processus source d'instabilité génétique.

3.5. Prise en charge des CDBs dans l'ovocyte post-natal

Peu d'études se sont penchées sur les acteurs des voies de réparation dans l'ovocyte mammalien.

Pan et al. ont analysé le transcriptome d'ovocytes de souris obtenus à partir de FP à 2 jpp jusqu'à des follicules antraux 22 jpp (H. Pan et al. 2005). Il y a une surreprésentation des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et la réponse aux dommages de l'ADN tout au long du développement de l'ovocyte, ce qui suggère un mécanisme de protection pour assurer l'intégrité génomique de la lignée germinale femelle (H. Pan et al. 2005; Hamatani et al. 2008). Su et al. ont également utilisé une approche par puces pour étudier la dégradation sélective des transcrits pendant la maturation méiotique des ovocytes de souris (Su et al. 2007). Ils ont comparé les profils de transcription entre vésicule germinale (VG) et les ovocytes MII et ont constaté, entre autres, que de nombreux transcrits associés à la réparation de l'ADN étaient dégradés pendant la maturation des ovocytes.

Si l'ovocyte dispose de la machinerie nécessaire à la réparation de l'ensemble des dommages radio-induits, quelles sont les voies de réparation privilégiées concernant la prise en charge des CDBs, lésions les plus toxiques ? Bloqués en stade méiotique réparent-ils exclusivement par RH ou utilisent-ils aussi la voie moins fidèle du NHEJ ?

Concernant la prise en charge des cassures double-brin, l'équipe de J. Hutt et al a montré que Rad51 serait majoritairement présent dans les heures suivant une irradiation (Stringer et al. 2020) ou une administration de cisplatine (Q.-N. Nguyen et al. 2021) chez la souris. Peu de DNA-PKcs serait présent et les ovocytes seraient capables de réparer ces dommages. Dans des souris *P63* *-/-*, les ovocytes présenteraient également une majorité de foci RAD51 permettant une réparation des CDBs (Q.-N. Nguyen et al. 2021). L'ovocyte post-natal qui a terminé sa recombinaison méiotique à la fin du stade pachytène *in utero* chez la souris garderait un programme de RH en post natal. Pourtant chez le mâle une transition permettrait l'activation de la voie du NHEJ plus précocément, dès le stade mid-pachytène (Enguita-Marruedo et al. 2019).

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Les études concernant les effets des RI sur l'ovocyte et ses conséquences pour la fertilité féminine sont peu nombreuses et ne se sont intéressées pour la plupart qu'au risque d'IOP après de fortes doses d'irradiation. Aucune étude ne s'est intéressée à l'impact des faibles doses et notamment de leur cumul sur la fertilité féminine. De plus, aucune étude n'a comparé les effets du type de RI (X ou gamma) sur la fertilité féminine.

Aujourd'hui, la fertilité de la femme est, en dehors du facteur âge, trop souvent résumée à un « nombre » d'ovocytes. Par ailleurs tous les ovocytes ont tendance à être considérés égaux alors qu'une labilité de la radiosensibilité ovocytaire transparaît dans de nombreuses études. Après exposition à des traitements génotoxiques, l'ovocyte, s'il survit, est-il véritablement indemne de tout effet mutagène au point de ne pas recommander l'utilisation des gamètes difficilement cryoconservés en PF avant traitement ? Peut-on vraiment proposer une cryoconservation d'ovocyte à distance de tels traitements ? Quelles sont les conséquences de la conception à partir d'ovocytes préalablement irradiés ? Les données cliniques actuelles concernant l'évaluation du risque héréditaire chez la femme sont contradictoires et non-exhaustives.

Ce travail visait donc à améliorer les connaissances concernant les effets des RI sur la fertilité féminine. J'ai donc choisi une approche expérimentale dans le modèle murin puis humain pour étudier i) la radiosensibilité ovocytaire et ii) l'étude de la prise en charge de dommages radio-induits de l'ADN selon le stade folliculaire, ainsi que iii) leur conséquences quantitatives et qualitatives sur la fertilité.

RÉSULTATS

Partie 1

Radiosensibilité ovocytaire au cours de la folliculogénèse et évaluation de la fertilité résiduelle après exposition aux RI chez la Souris

Cette première approche avait pour objectif de mieux caractériser la radiosensibilité ovocytaire ainsi que la fertilité femelle résiduelle après irradiation dans notre modèle d'étude murin. Les études antérieures montraient une forte radiosensibilité de la réserve ovarienne sans quantification précise notamment pour les faibles doses (< 0,1 Gy). D'autre part, les follicules en croissance seraient plus radiorésistants que les FP chez la Souris mais aucune étude n'avait quantifié leur radiosensibilité ni évalué la fertilité résiduelle après irradiation. Pour la première fois, nous voulions dans le modèle murin i) utiliser une large gamme de doses d'irradiation pour calculer une DL50 ovocytaire la plus précise possible pour les FP et les follicules ovariens en croissance, ii) évaluer l'impact du type de RI (comparaison X et gamma tous les deux utilisés dans le domaine médical). De plus nous souhaitions, en utilisant une forte dose d'irradiation similaire à une exposition curative médicale (2Gy), évaluer iii) la folliculogénèse et iv) la fertilité résiduelle à partir d'ovocytes radiorésistants.

Ce travail a permis la rédaction d'un article publié dans Reproductive BioMedicine Online (RBMO).

MESSAGES CLÉS :

Chez la Souris, la radiosensibilité des ovocytes ne dépend pas du type de RI (X ou gamma), les FP étant très radiosensibles dans les deux cas. Les ovocytes survivants ont permis une fertilité transitoire chez les souris irradiées malgré un taux d'avortement fœtal plus élevé. La ploïdie des ovocytes survivants était altérée, ce qui questionne l'intégrité de la lignée germinale féminine après une exposition aux RI.



ARTICLE

Mouse model of radiation-induced premature ovarian insufficiency reveals compromised oocyte quality: implications for fertility preservation



BIOGRAPHY

Vincent Puy is completing his PhD under the supervision of Professors G. Livera and N. Frydman at the CEA (Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives). He is a university hospital assistant at Assistance Publique-Hôpitaux de Paris and at Paris-Saclay University, France. His major interests are radiobiology and gamete quality assessment.

Vincent Puy^{1,2}, Vilma Barroca³, Sébastien Messiaen²,
Véronique Ménard⁴, Claire Torres⁵, Caroline Devanand³,
Delphine Moison², Daniel Lewandowski⁵, Marie-Justine Guerquin²,
Emmanuelle Martini², Nelly Frydman^{1,2}, Gabriel Livera^{2,*}

KEY MESSAGE

Oocyte radiosensitivity does not depend on the radiation type, with primordial follicles being highly radiosensitive. Surviving oocytes allowed transient fertility in irradiated mice despite a higher fetal abortion rate. The ploidy of surviving oocytes is altered, questioning the integrity of the female germline after radiation exposure.

ABSTRACT

Research question: What is the impact of radiation exposure on oocyte quality and female fertility?

Design: Prepubertal mice underwent whole-body irradiation with a single dose (0.02, 0.1, 0.5, 2, 8 Gy) of gamma- or X-rays. Oocytes were quantified in irradiated ($n = 36$) and sham-treated ($n = 8$) mice. After a single exposure to 2 Gy, formation of DNA double-strand breaks ($n = 10$), activation of checkpoint kinase (Chk2) ($n = 10$) and dynamics of follicular growth ($n = 18$) were analysed. Fertility assessment was performed in adult irradiated mice and controls from the number of pups per mouse ($n = 28$) and the fetal abortion rate ($n = 24$). Ploidy of mature oocytes ($n = 20$) was analysed after CREST immunostaining, and uterine sections were examined.

Results: Radiation exposure induced a massive loss of primordial follicles with LD₅₀ below 50 mGy for both gamma and X-rays. Growing follicles survived doses up to 8 Gy. This difference in radiosensitivity was not due to a different amount of radio-induced DNA damage, and Chk2 was activated in all oocytes. Exposure to a 2 Gy dose abolished the long-term fertility of females due to depletion of the ovarian reserve. Detailed analysis indicates that surviving oocytes were able to complete folliculogenesis and could be fertilized. This transient fertility allowed irradiated females to produce a single litter albeit with a high rate of fetal abortion (23%, $P = 0.0096$), related to altered ploidy in the surviving oocytes (25.5%, $P = 0.0035$).

Conclusions: The effects of radiation on surviving oocyte quality question natural conception as a first-line approach in cancer survivors. Together, the data emphasize the need for fertility preservation before radiation exposure and call for reassessment of the use of cryopreserved oocytes.

¹ Reproductive Biology Unit, University Hospital Antoine-Béclère-AP-HP, Clamart, France

² Laboratoire de Développement des Gonades, UMRE008 Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, Université de Paris, Université Paris-Saclay, Fontenay-aux-Roses, France

³ Animal Experimentation Platform-UMR Genetic Stability – Stem Cells & Radiation, INSERM U1274, CEA-Universities Paris Diderot and Paris Saclay, Fontenay-aux-Roses, France

⁴ CEA Irradiation platform-UMRE008 Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, INSERM U1274, Université de Paris, Université Paris-Saclay, Fontenay-aux-Roses, France

⁵ CEA/DRF/IBFJ/RCM/LRTS, INSERM UMR1274, Université Paris-Diderot (Paris 7), Université Paris-Sud (Paris 11), Paris, France

KEYWORDS

Aneuploidy
Embryonic loss
Fertility preservation
Oocyte quality
Premature ovarian insufficiency
Radiotherapy

INTRODUCTION

The adult ovary in mammalian females contains a finite number of follicle-enclosed oocytes (Kim *et al.*, 2016). Primordial follicles constitute the ovarian reserve that gradually decreases with ageing through follicular atresia and the change in folliculogenesis (Gougeon, 2010; Monniaux *et al.*, 2014). Growing follicles show an association of the mitotic development of follicular cells with oocyte growth. In both primordial follicles and growing follicles, oocytes are meiotically arrested at the diplotene stage of meiosis I. As the oocyte stock is not renewable, the physiological alteration of fertility can be drastically accelerated by gonadotoxic exposure to, for example, radiation.

In young prepubescent female patients suffering from cancer, radiotherapy has improved long-term survival but induces iatrogenic effects on fertility ranging from reduced fertility to premature ovarian failure to complete sterility (Edelmann *et al.*, 2014; Sauvat *et al.*, 2009; Wallace *et al.*, 2003). To improve the fertility of cancer survivors, different fertility preservation strategies are available including oocyte, embryo and/or ovarian tissue cryopreservation (ESHRE Guideline Group on Female Fertility Preservation *et al.*, 2020). These are currently advised for women before the delivery of highly gonadotoxic treatment such as radiation. So far, data on human oocyte radiosensitivity are heterogeneous and have been collected from women who were irradiated years previously under highly variable conditions. Such human studies are retrospective and not standardized, making it difficult to assess the dose effect of radiation exposure directly on oocytes. Experimental approaches in animal models are required to precisely characterize oocyte radiosensitivity.

In mice, the effects of radiation exposure on female fertility have previously been investigated in several studies (Benova *et al.*, 1985; Kimler *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2000; Pesty *et al.*, 2010). Although most are in agreement about the high radiosensitivity of primordial follicle oocytes, some discrepancies exist regarding the determinant of oocyte radiosensitivity. Mouse oocyte radiosensitivity may depend on strain, age and follicle stage. In CD-1 adult

female mice, In CD-1 adult female mice, Kimler and colleagues found that 0.1 Gy radiation exposure did not alter the total number of ovarian follicles, while other authors have reported median lethal dose (LD50) values ranging from 0.084 Gy in 101 prepubertal mice (Kimler *et al.*, 2018; Oakberg, 1962) to 0.15 Gy (Baker, 1971). Altogether this calls for a clarification of parameters affecting the radio-induced death or survival of oocytes.

For diagnostic or therapeutic purposes, X- and gamma (γ)-radiation are used in a wide range of doses. For instance, X-radiation is used for abdominal scans or for total-body irradiation prior to the transplantation of haemopoietic progenitors, exposing the ovaries to doses up to 0.03 Gy or 14.4 Gy, respectively (IRSN, *InVS*, *n.d.*; Wallace *et al.*, 2005). X- and gamma-rays are ionizing radiation and elicit DNA damage directly by base oxidation or indirectly by the generation of reactive oxygen species. They differ by their origin (X-ray generators, and radioactive sources for gamma-rays) and wavelength, which may lead to variations in the energy delivered. The relative biological effectiveness of X- and gamma-rays may vary according to the dose and the type of cells (Gott *et al.*, 2020; Scott *et al.*, 2013; Underbrink *et al.*, 1976; Wittenborn *et al.*, 2021). Most fertility studies have used either X- or gamma-rays, and no study has yet compared the impact of these different types of radiation in oocytes in a complete range of doses.

Several studies performed in mammals after radiation exposure have reported the presence of surviving oocytes with the persistence of natural pregnancies (Adriaens *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2021). These pregnancies occurring after radiation exposure question the genetic integrity of the oocyte and of the progeny. Indeed radio-induced DNA damage has so far been poorly quantified in oocytes. If not repaired properly such damage can result in cell death or heritable genetic mutations (Adriaens *et al.*, 2009). Oocyte quality has been reported to be impaired with chromosome alterations or induced mutations following radiation exposure in mice, albeit at specific stages that poorly reflect clinical situations (i.e. peri-natal or mature oocytes) (Reichert *et al.*, 1975; Selby *et al.*, 1991). Few reports have described an increased abortion rate following high radiation exposure of the

ovary (Kalapurakal *et al.*, 2004; Winther *et al.*, 2008). However, these studies did not include very early abortions that are probably not noticed by the women themselves. Thus, special attention needs to be paid to the quality of the surviving gametes.

This study used an experimental approach in mice to analyse the quantitative and qualitative impact of radiation on the oocyte as a function of the follicular stage and the type of radiation. A wide range of doses (from 0.02 to 8 Gy) of X- and gamma-rays was used to assess (i) oocyte survival, (ii) the amount of damage induced by radiation exposure, and (iii) the evolution and fertility potential of the surviving oocytes.

MATERIALS AND METHODS

Animals and irradiation

As radiation effects have been reported to vary among mouse strains, two common strains were used in this study: NMRI mice, an outbred strain, and C57BL/6J mice, the most commonly used inbred strain. All mice were housed individually under a controlled photoperiod. Experiments were performed in compliance with European legislation and with the Ethics Committee of the French Ministry of Agriculture (Agreement D9203202; reference 2020012414542835 [APAFIS#23783], approved 27 January 2020).

Irradiation was performed using GSR D1 (662 KeV, ^{137}Cs source) and linear accelerator (LINAC; 18 MV) to deliver single doses of gamma-rays and X-rays, respectively. Eight days post-partum (dpp) NMRI mice ($n = 33$) underwent whole-body irradiation with a single dose of radiation and were compared with sham-treated mice ($n = 5$) to quantify oocyte radiosensitivity. In order to obtain an acute dose delivery for low doses of gamma-rays, two dose rates were used and the effects of the dose rates were compared using the 0.5 Gy dose. Gamma-rays were delivered at 0.02, 0.1 and 0.5 Gy with a dose rate of 35.57 mGy/min, and at 0.5, 2 and 8 Gy with a dose rate of 1.03 Gy/min. X-rays at 0.02, 0.1, 0.5, 2 and 8 Gy were delivered with a dose rate of 0.6 Gy/min. Two-month-old C57BL/6J mice underwent total-body irradiation of 0.1 Gy (X-rays, $n = 4$) and were compared with controls ($n = 4$). Additionally, 8 dpp C57BL/6J mice ($n = 3$) and 84 dpp NMRI mice

($n = 3$) underwent whole-body irradiation at 2 Gy (gamma-rays) with a dose rate of 1.03 Gy/min and were compared with controls ($n = 3$ for each group) to analyse the oocyte response to radiation as a function of the strain or age. After a single exposure to 2 Gy (gamma-rays, 1.03 Gy/min) at 8 dpp, NMRI mice were used to analyse the formation of DNA double-strand breaks (DSB) at 4 h and 48 h in irradiated and sham-treated mice, and activation of checkpoint kinase 2 (Chk2) was analysed 4 h post-radiation ($n = 5$ each). The dynamics of follicular growth was assessed 2 days (10 dpp, $n = 3$), 14 days (22 dpp, $n = 3$) and 28 days (36 dpp, $n = 3$) after radiation exposure and compared with controls ($n = 3$ mice in each group).

Fertility assessment was performed on C57BL/6J mice 10 days after whole-body radiation exposure to 2 Gy (gamma-rays, 1.03 Gy/min) at 84 dpp ($n = 33$) and compared with controls ($n = 19$). The same protocol was applied to assess oocyte ploidy in irradiated ($n = 10$) and sham-treated mice ($n = 10$).

Tissue processing and quantitative assessment of oocytes, follicles and corpora lutea

Ovaries and uteri were collected fixed in Bouin's fixative or 4% paraformaldehyde for 24 h, dehydrated in alcohol, paraffin embedded and then cut into 5 μ m sections and stained with haematoxylin-eosin-saffron (HES). Ovarian follicles were counted every 20 sections using the oocyte nucleus as a marker. The stage of follicular development was determined as previously described (Livera *et al.*, 2008). Briefly, follicles were classified according to the shape and number of layers of somatic cells surrounding the oocyte: primordial follicles with flattened cells, and growing follicles (primary with one layer of cuboidal cells, secondary with two layers of cells, and antral with an antrum). The Abercrombie formula was used to correct any double-counting resulting from the appearance of a single cell in two successive sections (Abercrombie, 1946; Angenard *et al.*, 2010).

Immunohistochemistry

Mouse ovarian sections were placed on dewaxed glass slides, rehydrated and boiled for 30 min in HIER citrate buffer pH 6 (Zytomed; Diagnostics, France) in an autoclave (Retriever 2100; Proteogenix, France) for unmasking. Endogenous peroxidase activity was blocked with

3% hydrogen peroxide for 10 min. Sections were incubated for 30 min in 2.5% normal horse serum (Vector Laboratories, Eurobio, France) and then incubated with mouse monoclonal anti-Ki67 (1:50, BD Biosciences, France), mouse monoclonal anti-P63 (1:200, Eurobio-ABCYS, France), mouse monoclonal anti-DDX4 (DEAD-box helicase 4; 1:200, Abcam, France) or goat polyclonal anti-Müllerian hormone (AMH; 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Germany) primary antibodies diluted in phosphate-buffered saline (PBS) for 1 h at 37°C. Primary antibodies were revealed using the secondary antibody ImmPRESS kit (Vector Laboratories, Eurobio) according to the manufacturer's instructions. Peroxidase activity was visualized using 3,3'-diaminobenzidine as a substrate. Sections were counterstained with haematoxylin. The same protocol was applied to mouse uterine sections using a rat monoclonal anti-endomucin primary antibody (1:200, Santa Cruz Biotechnology). Isotype-specific immunoglobulins (mouse IgG isotype control, Abcam; goat IgG isotype control, Abcam; rat IgG2a isotype control, Abcam) were used as negative controls (Supplemental Figure S1).

Tissue immunostaining

To assess radio-induced DNA damage immunostaining was performed on ovary sections. Fixed ovarian sections were incubated in blocking buffer (0.2% bovine serum albumin [BSA], 0.2% cold water fish gelatin, 0.05% Tween 20 in PBS 1X) for 1 h and overnight with mouse monoclonal primary anti- γ -H2AX (H2A.X variant histone; 1:500; Sigma-Aldrich Chimie, France) or rabbit polyclonal anti-phospho-Chk2 (1:200; Cell Signaling Technology, USA) diluted in blocking buffer at room temperature. After washing in PBS-Tween 20, slides were incubated for 1 h at 37°C with a donkey anti-mouse or a donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody (1:500; Fisher Scientific SAS, France) diluted in blocking buffer. The dilution of secondary antibodies was determined to produce the lowest unspecific staining (i.e. producing no staining in the absence of the primary antibody). Three washing steps using 0.05% Tween 20 in PBS 1X were performed at room temperature (5 min each). DNA was stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1/10,000 in PBS; Eurobio Ingen, France) for 10 min at room temperature. Slides were mounted with ProLong Gold (Fisher

Scientific SAS), imaged on a PROVIS AX70 epifluorescent microscope (Olympus, France) and analysed with ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Combined 3Disco clearing and fluorescent immunostaining of ovaries

To precisely determine oocyte radiosensitivity according to oocyte diameter, in-toto analysis of irradiated versus non-irradiated mouse ovaries was performed. After fixation, a bleaching step in methanol-PBS and H₂O₂ (6%) was performed, followed by permeabilization in PBS-0.2% gelatin-0.5% Triton X-100 at 37°C for 1 week. Ovaries were incubated with polyclonal rabbit anti-mouse DDX4 primary antibody (1:600; Abcam) for 1 week at 37°C. After washing in PBS, the ovaries were incubated for 3 days with a goat anti-rabbit Alexa Fluor 633-conjugated secondary antibody (1:400, PBS-0.2% gelatin-0.5% Triton X-100-0.1% saponin; Invitrogen). After washing in PBS-GT at room temperature, the ovaries were embedded in agar gel (2%) and cleared using the 3D imaging of solvent-cleared organs (3Disco) technique as previously described (Belle *et al.*, 2017). Ovaries were imaged on a light-sheet microscope (Lavis, Germany) and analysed with IMARIS software (version 9.5.1; BitPlane, UK). As expected, only large round-shaped cells were stained with DDX4 antibody, confirming the specific detection of oocytes.

Fertility assessment

To assess fertility, adult C57BL/6J females were either irradiated with 2 Gy at 84 dpp ($n = 33$) or not irradiated ($n = 19$). Whereas folliculogenesis lasts more than 6 months in humans, it takes only 19–21 days in mice (Gougeon, 2010; Hoage and Cameron, 1976). Fertility was therefore analysed at a 10 days post-irradiation timepoint to ensure that the offspring in the irradiated group were derived from growing oocytes. Mating started from 94 dpp on. One non-irradiated male was housed with two females, and females were checked daily for the presence of a vaginal plug. For litter analysis, non-irradiated ($n = 7$) and irradiated ($n = 21$) females were left with males throughout the experiment (60 days). Newborn pups were counted and kept with their mother until 2 dpp to check sex status as determined by anogenital distance and lethality. Mothers were left with the non-irradiated males for new mating. To evaluate fecundity (number of fetuses, fetal abortion rates)

non-irradiated ($n = 12$) and irradiated ($n = 12$) females were similarly mated. Pregnant females were sacrificed at 13.5 days post-conception (dpc) to analyse the fetal abortion rate.

Gonadotrophin stimulation and MII oocyte chromatin spreads

These experiments were performed to assess oocyte ploidy in irradiated versus sham treated mice ($n = 10$ each) using DAPI and anti-centromere calcium-responsive transactivator (CREST) antibody as markers. C57BL/6J adult mice were superovulated with an i.p. injection of 6 IU of pregnant mare serum gonadotrophin (Folligon, Intervet, France) followed 48 h later by an i.p. injection of 7 IU human chorionic gonadotrophin hormone (Merck-Serono, Denmark) to trigger ovulation. Cumulus–oocyte complexes from superovulated mice were collected in M2 medium (Sigma-Aldrich). Cumulus cells were removed by addition of mouse spermatozoa for 20 min. This technique improved oocyte survival and no fertilization occurred in this time frame.

After 1 h, oocytes in metaphase II (MII) were transferred into a drop of Tyrode solution for zona pellucida removal. Chromosomal spreading was performed in spreading solution (3 mmol/l dithiothreitol, 0.15% Triton X-100 and 0.6% paraformaldehyde) on Teflon-printed diagnostic slides. Slides were dried and stored at -20°C until immunostaining. Slides were washed three times in PBS and then incubated in blocking solution (PBS with 0.2% gelatin, 0.05% Tween, 0.2% BSA) before adding monoclonal human anti-CREST (1:1000; ImmunoVision, Arkansas, USA) antibody overnight. After three washes, goat anti-human secondary antibodies conjugated with Alexa 488-conjugated (1:500; Life Technologies, France) were added. Three washing steps using 0.05% Tween 20 in PBS 1X were performed at room temperature (5 min each). DNA was stained with DAPI and slides were mounted with ProLong Gold for imaging as described above. As expected, anti-CREST antibody specifically recognized two foci per chromosome corresponding to the centromeric regions.

Statistical analysis

Data collected were analysed using GraphPad Prism software (version 6.0; GraphPad Software, USA) and were expressed as mean \pm SEM. For small samples, non parametric Mann–Whitney

tests were performed to compare unpaired values. For larger samples ($n \geq 30$), t-tests we used to compare means between groups. Qualitative analyses were performed using chi-squared tests. The threshold for statistical significance was set to $P < 0.05$.

RESULTS

Resting and growing oocytes display different radiosensitivity

To assess oocyte radiosensitivity as a function of the follicle stage, prepubertal mice were used, which contain ovaries with a high number of primordial follicles and growing follicles in a limited volume. NMRI mice were chosen for these experiments due to their high prolificity and their historical use in radiobiology.

The mice were irradiated at 8 dpp and ovaries were harvested 48 h post-irradiation (FIGURE 1A). First, oocytes were identified with two specific markers: P63 (nuclear staining) and DDX4 (cytoplasmic staining). AMH was used to specifically label growing follicles (FIGURE 1B, C). In non-irradiated ovaries, numerous primordial follicles (P63 and DDX4 positive and AMH negative) were located in the cortex, whereas growing follicles were found deeper in the ovary. From 0.1 Gy onward a loss of primordial follicles was observed that was almost complete at 0.5 Gy. Conversely, AMH-positive growing follicles displayed no obvious change in abundance and position whatever the stage of growth from primary to early antral follicle. This difference in radiosensitivity was confirmed by an in-toto analysis of mouse ovaries after radiation exposure to 2 Gy (FIGURE 1D). This exhaustive approach identified a higher number of DDX4-positive objects, with large oocytes (diameter $>26 \mu\text{m}$) being drastically more radioresistant than small ones (Supplemental Figure S2).

Next, to precisely determine the radiosensitivity of oocytes in primordial and growing follicles, the number of oocytes was quantified in HES-stained sections using various doses (0.02, 0.1, 0.5, 2 and 8 Gy) and types of ray (X and gamma; FIGURE 1E). The interindividual variation in the number of primordial follicle oocytes was greater in the non-irradiated group compared with irradiated female mice. Exposure to the 0.02 Gy dose induced a slight decrease in primordial follicles compared with non-irradiated ovaries (3428 ± 536

follicles) that was significant for X-rays (gamma-rays, 2748 ± 463 follicles, $P = 0.39$; X-rays, 2258 ± 20 follicles; $P = 0.04$). At a dose of 0.1 Gy, 72% and 77% of primordial follicles were lost using X- and gamma-rays, respectively. Because two dose rates (0.036 and 1.03 Gy/min) were needed for gamma-irradiation, their effect was compared at 0.5 Gy and no difference was found (data not shown). The dose that killed half of the oocytes in the primordial follicle population (LD_{50}) ("Probit Analysis," 1971) was calculated, showing an LD_{50} of 47 mGy for gamma-rays and 38 mGy for X-rays. Thus, small resting oocytes displayed high radiosensitivity to both X and gamma-rays. No difference was found in the number of growing oocytes counted in non-irradiated and irradiated ovaries with doses up to 8 Gy.

To ensure that this differential in oocyte radiosensitivity was specific to neither the strain nor the prepubertal period, 8 dpp C57BL/6J mice and adult NMRI mice were given 2 Gy irradiation. No primordial follicles were found in irradiated prepubertal C57BL/6J mice. Similarly, a complete loss of primordial follicles and persistence of growing follicles from all stages was observed after 48 h in adults (Supplemental Figure S3). Along the same lines, irradiation of adult C57BL/6J mice with a low dose (0.1 Gy, X-rays) triggered a significant decrease in the ovarian reserve (609 ± 80 , $n = 4$ and 128 ± 53 , $n = 4$ for primordial follicles in control and irradiated ovaries, respectively; $P = 0.029$).

Taken together these results indicate that oocyte radiosensitivity depends mostly on the follicular stage (primordial follicle or growing follicle) and that the type of irradiation (gamma or X), the dose rate, the strain and the post-natal age have a limited impact.

Level of radio-induced DNA damage is similar in primordial follicle and growing follicle oocytes

The authors questioned whether the difference in oocyte radiosensitivity could be due to a different initial number of radio-induced DNA lesions. For this purpose, a 2 Gy dose was used as it is most relevant in terms of radiotherapy protocols. DSB, the most deleterious DNA lesions, were thus quantified in oocytes 4 h after exposure to 2 Gy (gamma-rays, $n = 5$) and compared with those from control mice ($n = 5$) using

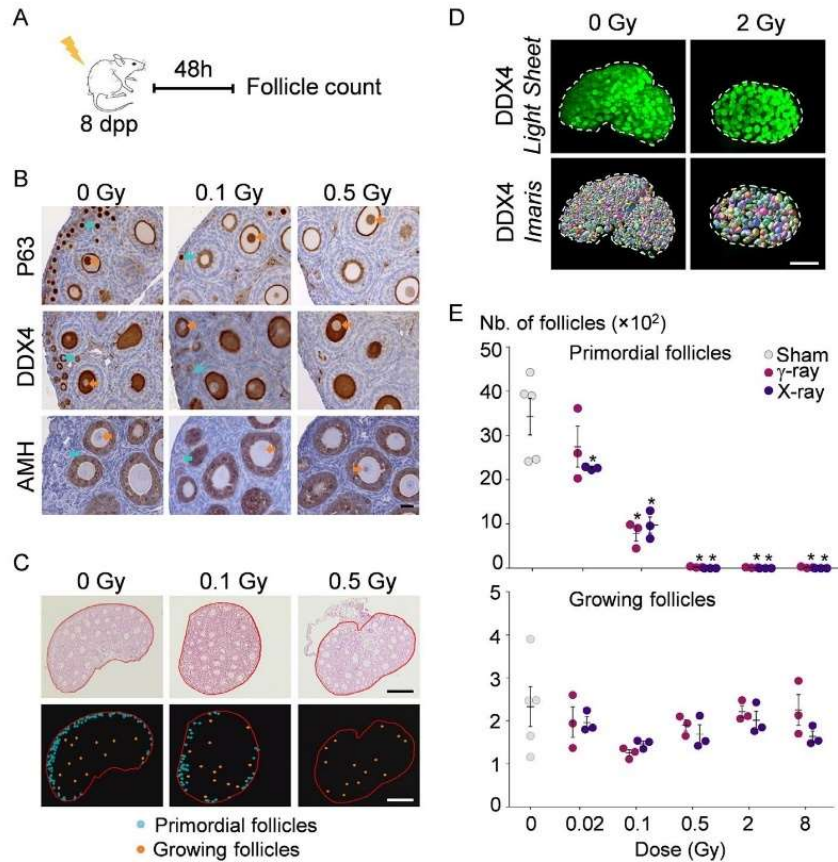


FIGURE 1 Effects of X- and gamma-ray irradiation on oocytes. (A) NMRI ($n = 35$) mice were exposed to single doses of gamma-rays or X-rays at 8 dpp or sham treated and killed at 10 dpp. Ovaries were taken for histological analysis. Sections of 5 μm taken every 50 sections were stained with HES and used for oocyte counting. For gamma-rays, a ^{137}Cs source was used to deliver single doses of 0.5, 2 and 8 Gy with a dose rate of 1.03 Gy/min, or 0.1 or 0.02 Gy with a dose rate of 35.57 mGy/min. Single doses of X-irradiation were delivered using a linear accelerator with a dose rate of 0.6 Gy/min. (B) Immunostaining of oocytes with nuclear (P63) and cytoplasmic (DDX4) specific markers showed the high radiosensitivity of primordial follicles (blue arrows) compared with growing follicles (orange arrows). AMH staining was unchanged after radiation exposure of growing follicles. Scale bar = 20 μm . (C) Distribution of oocytes in HES-stained sections of ovary from non-irradiated and irradiated mice (0.1 and 0.5 Gy). Primordial follicles, indicating ovarian reserve, (blue dots), show high radiosensitivity compared with growing follicles (orange dots). Scale bar = 200 μm . (D) In-toto analysis of mouse ovary at 10 dpp using 3Disco. Scale bar = 320 μm . (E) Quantification of mouse ovarian reserve and growing follicles retrieved 2 days after X- or gamma-irradiation. Only follicles containing oocytes with a visible nucleus were counted. For gamma- and X-rays, all P -values for significant differences between the irradiated groups and the sham-treated group were equal to 0.036. Bars depict mean \pm SEM. A two-tailed Mann-Whitney test was used with the threshold for statistical significance set to $P < 0.05$, to compare the irradiated groups with the sham-treated group. * $P < 0.05$. 3 Disco, 3D imaging of solvent-cleared organs; AMH, anti-Müllerian hormone; DDX4, DEAD-box helicase 4; dpp, days post-partum; HES, haematoxylin-eosin-saffron.

histone H2AX phosphorylation (Rogakou *et al.*, 1999) (FIGURE 2A, B). As expected, γ -H2AX was detected in follicular somatic cells and oocytes in irradiated ovaries. After irradiation, the numbers of DSB in primordial follicles ($P < 0.0001$) and growing follicles ($P < 0.0001$) oocytes were both significantly increased compared with controls (FIGURE 2C). The number of γ -H2AX foci was similar in the primordial follicle and growing follicle oocytes of irradiated mice, with an average of 11.1 ± 0.5 and 11.5 ± 0.6 foci, respectively. Consequently, the difference in radiosensitivity observed between primordial and growing follicles is not due

to the formation of a different amount of DNA damage, at least regarding the formation of DSB. Forty-eight hours after radiation exposure, the number of γ -H2AX foci drastically decreased in growing follicle oocytes, revealing their ability to repair DNA damage (Supplemental Figure S4).

Chk2 plays a critical role in response to DNA damage, being then phosphorylated and activated. It has been shown in previous studies to be involved in radiation-induced oocyte death (Bolcun-Filas *et al.*, 2014; Tuppi *et al.*, 2018). Thus, phospho-Chk2 labelling

was investigated 4 h after exposure to 2 Gy radiation at 8 dpp (FIGURE 2D, E). The mean intensity of phospho-Chk2 staining was clearly increased in both primordial follicle and growing follicle oocytes after radiation exposure (2340.7 ± 59.5 and 2023.9 ± 62.2 arbitrary units, respectively) compared with controls (1694.3 ± 64.7 and 1542.2 ± 71.1 arbitrary units, respectively; $P < 0.0001$). Of note, phospho-Chk2 was slightly more increased in primordial follicle oocytes compared with growing oocytes ($P = 0.0005$). However, this is unlikely to explain by itself the large difference in radiosensitivity.

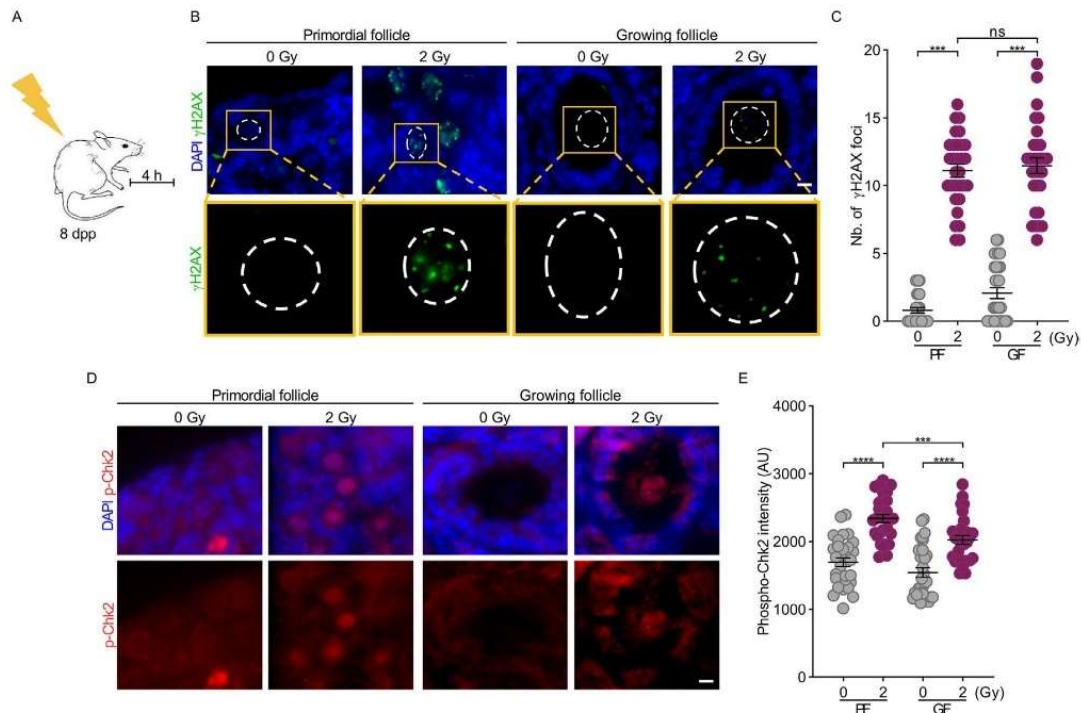


FIGURE 2 Oocyte nuclear DNA damage is similar according to the follicle stage after radiation exposure. (A) Prepubertal female mice at 8 dpp ($n = 5$) were analysed 4 h after being irradiated at 2 Gy (1.03 Gy/min of gamma-rays) and compared with controls ($n = 5$). (B) Representative sections of ovaries immunostained for γ -H2AX (green) 4 h after being irradiated (2 Gy) or not irradiated (0 Gy). DNA is stained with DAPI (blue). Dotted white circles mark the nuclei. Yellow boxes show an enlarged view of the nuclei immunostained for γ -H2AX. Scale bar = 5 μ m. (C) Quantification of γ -H2AX foci in control (grey dots) and irradiated (purple dots) mice. Each point represents the number of γ -H2AX foci counted in the nucleus of one oocyte, and 30 oocytes were analysed for each group. No difference was found between primordial follicles and growing follicles 4 h after exposure to 2 Gy irradiation ($P = 0.90$). (D) Representative sections of ovaries immunostained for phospho-Chk2 (red) 4 h after being irradiated (2 Gy) or not irradiated (0 Gy). DNA is stained with DAPI (blue). Scale bar = 5 μ m. (E) Quantification of phospho-Chk2 intensity in control (grey dots) and irradiated (purple dots) mice. Each point represents the mean intensity per pixel of phospho-Chk2 in the nucleus of one oocyte, and 30 oocytes were analysed for each group. Bars depict mean \pm SEM. A two-tailed Mann-Whitney test was used with the threshold for statistical significance set at $P < 0.05$. *** $P < 0.0001$, **** $P < 0.00001$. AU, arbitrary units; Chk2, checkpoint kinase; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; dpp, days post-partum; GF, growing follicles; γ -H2AX, H2A.X variant protein; ns, not significant; PF, primordial follicles.

Irradiation does not impede the dynamics of growing follicle development

Although growing follicles survived for 48 h post-irradiation, they suffered DNA damage that could alter their growing ability. It was therefore investigated whether radiation changed the proliferation of somatic follicular cells that are essential to follicular development. Ovary sections were immunostained for Ki67 48 h after 2 Gy of gamma-radiation (FIGURE 3A) to assess the cell proliferation rate (Miller *et al.*, 2018). No Ki67 was found in follicular cells in primordial follicles, confirming the quiescent state of these cells (Supplemental Figure S5). The percentage of Ki67-positive follicular cells decreased in irradiated growing follicles ($44.9 \pm 1.7\%$, $n = 3$) compared with non-irradiated ones ($56.5 \pm 1.9\%$, $n = 3$). Thus cell cycle progression was mildly

affected by radiation exposure, with a persistence of follicular cell proliferation.

Because the development of the oocytes is tightly linked to follicular cells, it was next investigated whether follicular growth was impaired after irradiation. Mice at 8 dpp were irradiated with 2 Gy, and the number of ovarian follicles was scored as a function of their developmental stages at 10, 22, and 36 dpp (FIGURE 3B-D). At 10 dpp, the growing follicle population in irradiated ($n = 3$) and control ($n = 3$) mice was mainly constituted by primary and secondary follicles, in accordance with prepubertal stage. At the juvenile stage (22 dpp), both groups ($n = 3$ in each group) displayed similar numbers of follicles at the antral stage. Thus, primary follicles from prepubertal ovaries developed into early antral/antral stage follicles in both groups over the same period of

12 days. At the pubertal stage (36 dpp), nearly all the growing follicles formed corpora lutea in irradiated mice ($n = 3$), to levels similar to those observed in controls ($n = 3$). However, because of total depletion of the primordial follicle pool, irradiated mice had a premature ovarian failure profile as early as 36 dpp with an absence of primary, secondary and antral follicles. These results indicate that 2 Gy radiation exposure during the prepubertal period did not affect the long-term dynamics of growing follicle development up to ovulation.

Irradiation of growing follicle does not affect fertilization but leads to a higher abortion rate

As growing follicles survived up to ovulation in irradiated mice, the remaining fertility was studied after 2 Gy radiation exposure. Because ovarian failure occurs too early in 8

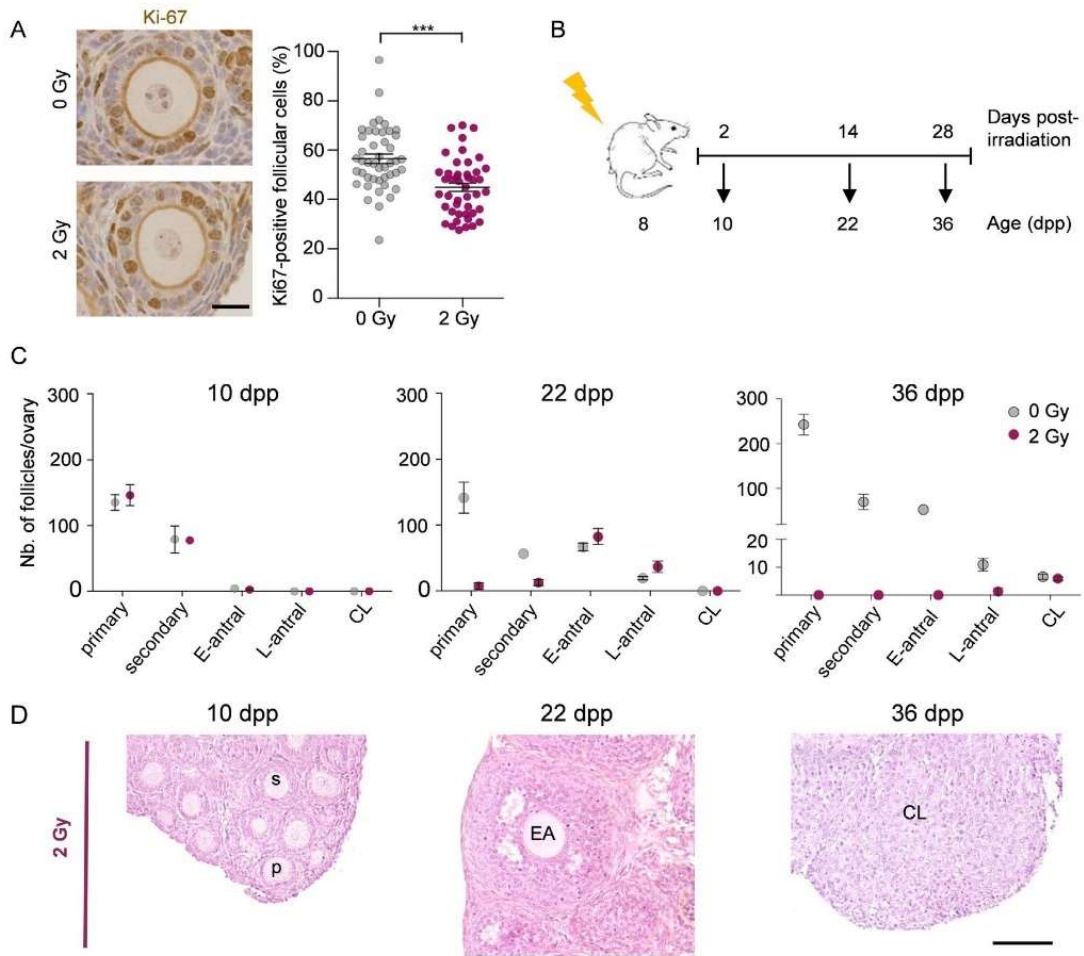


FIGURE 3 Time-course analysis of the growing follicle population in control and irradiated ovaries during the prepubertal (10 days), pubertal (22 days) and young adult (36 days) periods. (A) Ki67 staining showed a slight decrease in the number of Ki67-positive follicular cells 48 h after radiation exposure at 8 dpp (2 Gy, 1.03 Gy/min of gamma-rays). Each point represents the percentage of Ki67-positive follicular cells in one growing follicle ($n = 3$ mice per group). Scale bar = 100 μ m. Bars depict mean \pm SEM. *** $P < 0.001$. (B) Irradiated mice received a single dose of 2 Gy (1.03 Gy/min of gamma-rays) at 8 dpp. The ovaries of control (grey dots) or irradiated (purple dots) mice were removed at 10 dpp ($n = 6$), 22 dpp ($n = 6$) or 36 dpp ($n = 6$). (C) Quantification of ovarian follicles according to their developmental stage (primary, secondary, early antral, late antral, corpora lutea). Bars depict mean \pm SEM. (D) Representative ovarian sections at 10, 22 and 36 dpp, stained with haematoxylin–eosin–safranin. Scale bar = 200 μ m. CL, corpora luteum; dpp, days post-partum; EA, E-antral, early antral; L-antral, late antral; p, primary follicle; s, secondary follicle.

dpp irradiated mice, it was decided to irradiate adult mice to perform mating trials. C57BL/6 mice were chosen considering future investigations as this is the most commonly used strain for generating transgenic lines. An evaluation was made of the fertility of 3-month-old female mice irradiated 10 days before mating with non-irradiated males (FIGURE 4A). This timepoint was selected to focus on fertility derived from growing oocytes that survived exposure to 2 Gy radiation while primordial follicles were eradicated at this dose. At this stage, it was checked that the uterine horns harboured no macroscopic or microscopic defects, and staining for endomucin, an endothelial

marker, revealed proper vascularization (Supplemental Figure S6). All irradiated females were plugged within 8 days after mating, with an average time of 2.5 ± 0.5 days. Non-irradiated females were plugged with an average time 4.6 ± 1.1 days ($P = 0.09$). This was in agreement with earlier delivery in the group of irradiated mothers (FIGURE 4B) and indicates that radiation exposure did not lengthen the time to conception. After the first mating, all non-irradiated ($n = 19$) and irradiated ($n = 33$) females had a litter. Thus, radiation exposure of growing follicle oocytes did not prevent their fertilization. As expected, no more pups were obtained from further mating, probably due to depletion of the ovarian

reserve (FIGURE 1). No difference was found concerning the sex ratio, with 51% females in the irradiated group ($n = 108$) compared with 44% in the control group ($n = 93$).

The mean number of pups per first litter was diminished in irradiated female mice compared with controls, with 5.1 ± 0.4 (ranging from 2 to 8; $P = 0.01$) and 7.2 ± 0.8 (ranging from 4 to 9) pups, respectively. It was therefore investigated whether this change was due to early miscarriage induced by irradiation. Irradiated ($n = 12$) and non-irradiated ($n = 12$) female mice were mated with non-irradiated male mice, and the uterine horns were examined to

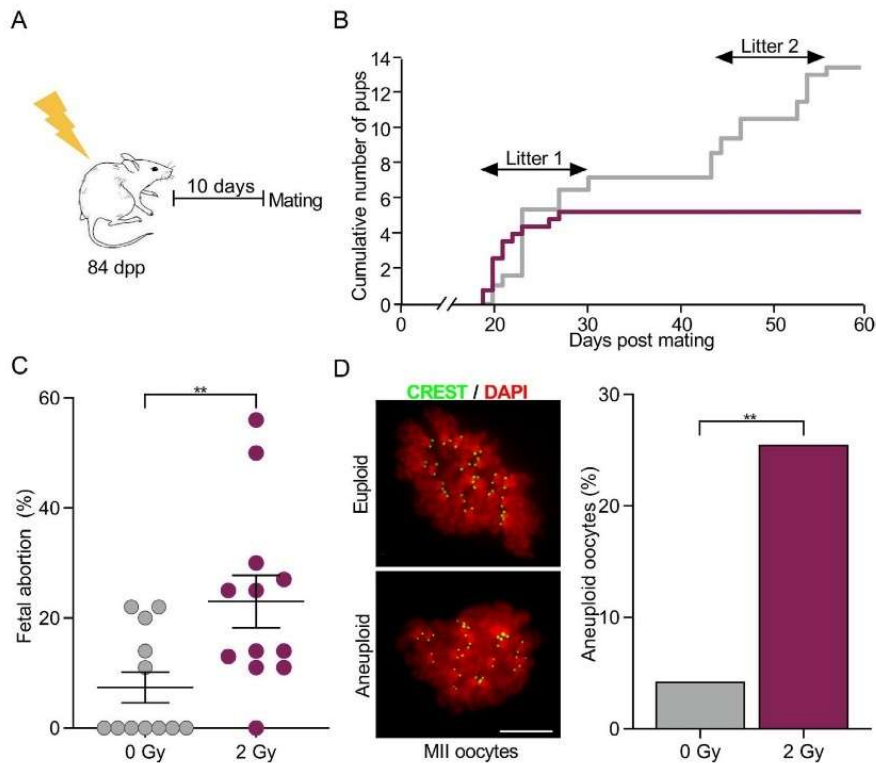


FIGURE 4 Female fertility is impaired after a single dose of gamma-irradiation (2 Gy) compared with controls. (A) C57BL/6J female mice were irradiated ($n = 21$) or not irradiated ($n = 7$) at 84 dpp and continuously mated with non-irradiated males from 94 dpp onwards. (B) Cumulative number of pups per mouse in irradiated (purple line) and control (grey line) mice obtained within 55 days of initiating mating. (C) Abortion rates in female mice irradiated at 84 dpp (2 Gy, $n = 12$, 98 fetuses analysed) compared with non-irradiated mice (control, $n = 12$, 104 fetuses analysed). Female mice were mated with non-irradiated males. Pregnant females were killed at 13.5 days post-conception to score healthy fetuses and fetal abortions. The rate of early fetal abortion was significantly higher in irradiated mothers compared with controls ($P = 0.0096$). $**P < 0.01$. (D) Aneuploidy rate in MII oocytes from irradiated female adult mice (2 Gy, $n = 10$, 51 oocytes) compared with controls ($n = 10$, 47 oocytes). Ploidy was determined using DAPI and anti-centromere CREST foci as markers. The aneuploidy rate was higher in irradiated MII oocytes compared with non-irradiated ones ($P = 0.0035$). Scale bar = 10 μm . $**P < 0.001$. CREST, calcium-responsive transactivator; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; dpp, days post-partum; MII, metaphase II.

quantify healthy and resorbed fetuses at 13.5 dpc (FIGURE 4C). The total number of fetuses was similar in both groups with 98 and 104 fetuses in irradiated and sham treated mothers, respectively. The rate of early fetal abortion at 13.5 dpc was significantly higher in irradiated mothers (23%, $P = 0.0096$) compared with controls (7%), demonstrating that irradiation induced some alteration of early fetal development.

The next question was whether this fetal abortion increase was linked to fetal aneuploidy, which is the most important cause of early miscarriage (Rai and Regan, 2006) (FIGURE 4D). MII oocytes spreads were obtained from mice 10 days after exposure to 2 Gy radiation ($n = 10$, 51 oocytes) and compared with those of controls ($n = 10$, 47 oocytes). The aneuploidy rate was higher in irradiated MII oocytes (25.5%,

$P = 0.0035$) compared with non-irradiated ones (4.3%). Nullisomy was found in 92.3% of aneuploid oocytes in the irradiated group. These results show changes in the quality of oocytes after radiation exposure, at least regarding ploidy, providing a likely explanation for embryonic loss.

DISCUSSION

Oocyte radiosensitivity is still poorly understood despite its major importance for the fertility of women exposed to medical radiation (Edelmann *et al.*, 2014). Here, a striking contrast was demonstrated between the radiosensitivity of growing follicle and primordial follicle oocytes in mice, considering that they are arrested at the same meiotic stage. The survival of primordial follicle oocytes is affected by low doses, whereas that of growing

follicle oocytes is hardly affected even by high doses. Surviving oocytes developed up to ovulation and were fertilizable, although aneuploidy and embryonic loss indicate that some were unable to sustain embryonic development. Thus, it was shown that both oocyte quantity and quality are compromised after radiation exposure.

Primordial follicle radiosensitivity was compared after gamma- and X-ray exposure, and LD_{50} was calculated as 47 mGy and 38 mGy, respectively, indicating that oocytes respond similarly to both types of rays. These values are lower than those previously reported in adult mice (150 mGy; Baker, 1971) and immature mice (100 mGy; Oakberg, 1962). This massive primordial follicle loss occurred in both prepubertal and adult mice, and in both inbred (C57BL/6) and outbred (NMRI) strains, suggesting that age or

strain only marginally affects primordial follicle oocyte radio-induced death. Complete eradication of primordial follicles was also confirmed through a mating trial as female mice became sterile less than 5 weeks after being irradiated. This radio-induced ovarian failure points to the loss of primordial follicle oocytes as the key factor in the observed decrease in fertility after radiation exposure.

This study shows that small resting oocytes are sensitive to radiation doses at least 80-fold lower than those affecting growing oocytes (0.1 versus 8 Gy). This is in perfect agreement with the recent report from Stringer and colleagues demonstrating primordial follicle loss at 0.1 Gy and survival of growing follicles at 7 Gy (Stringer *et al.*, 2020). This switch from radiosensitive to radioresistant oocytes is not due to radiation inducing fewer DNA DSB in growing follicles oocytes, or to an absence of DNA damage response mediated by Chk2. Thus, either growing follicle oocytes can better repair radio-induced lesions or they are less prone to die after such insults. P63, a protein considered to be the guardian of the oocyte genome, has been shown to be a major actor involved in the death of primordial follicle oocytes after a genotoxic stress (Bolcun-Filas *et al.*, 2014; Kerr *et al.*, 2012; Livera *et al.*, 2008; Stringer *et al.*, 2020; Suh *et al.*, 2006). In line with the results of Suh and collaborators P63 was detected here in both primordial follicle and growing follicle oocytes from the primary to pre-antral stage (FIGURE 1B). Therefore, this suggests that P63 is not solely responsible for the difference in sensitivity that was observed. DNA repair machinery in post-natal oocytes has only recently been investigated, but the differences that could occur between resting and growing oocytes warrant further studies (Stringer *et al.*, 2020; Winship *et al.*, 2018).

Oocyte radiosensitivity has been reported to vary among mammalian species. In humans, the effects of radiation exposure on female fertility are also reported to be age dependent, with the estimated sterilizing dose decreasing with age (Wallace *et al.*, 2005). The radiosensitivity of the primordial follicles has frequently been re-evaluated in humans, and recent results suggest that the LD₅₀ of primordial follicles would be <2 Gy (Wallace *et al.*, 2003), instead

of 4–18 Gy (Bianchi M, 1983; Wallace *et al.*, 1989). Nonetheless, primordial follicles are believed to be less sensitive to radiation exposure in humans than mice (Baker, 1971). This may explain the absence of an age effect in the current mouse model as ovarian reserve was fully eradicated at the 2 Gy dose whatever the age of the mouse.

Although oocyte radiosensitivity may vary according to species, some features are commonly shared. First, the non-renewable nature of the oocyte pool makes it vulnerable to external agents such as radiation that shorten the fertility lifespan. Second, the persistence of surviving oocytes questions the safety of the remaining fertility. In the mouse model described here, the generation of a first litter after a single 2 Gy exposure showed the capacity for surviving oocytes to ovulate, resume meiosis and give rise to offspring. However, the number of pups at birth was decreased. In-utero analysis showed unchanged ovulation but a higher abortion rate in irradiated mothers. These results suggest changes in either the endometrium and/or oocyte quality. In humans, prepubertal exposure to radiation is associated with an increased rate of uterine dysfunction (Bath *et al.*, 2002; Critchley and Wallace, 2005; Signorello *et al.*, 2010). However, the radiation dose used in the current study was below the reported threshold dose for uterine dysfunction (4 Gy) and no major uterine dysfunction was observed in 2 Gy-irradiated mice (Supplemental Figure S6). Mouse embryo transfer experiments also showed that irradiation of the uterus has no significant impact on embryo survival when a 3.6 Gy dose is used (West *et al.*, 1985). Taken together, these findings indicate that the embryonic loss observed in the current study is unlikely to be due to radio-induced uterine alteration, and thus that the quality of the surviving oocyte is likely to be compromised.

DNA analysis performed on the progeny of irradiated female rodents has revealed relatively few mutations (Asakawa *et al.*, 2014; Satoh *et al.*, 2020). Recent whole-genome sequencing from mature oocytes irradiated at 4 Gy found 4.7 insertions/deletions and 3.1 multisite mutations with less than 5% of these events occurring in coding sequences (Satoh *et al.*, 2020). Although that these studies were performed in embryos that survived, such a low level of mutations is

unlikely to cause the massive embryonic loss observed in the current study. More studies are required to address the genetic integrity of embryos that died during development. The higher aneuploidy rate in MII oocytes that was observed here indicates that radiation exposure impaired chromosomal segregation. Fertilization of these defective oocytes likely results in monosomic zygotes, which have been proven to be a major cause of early miscarriage (Rai and Regan, 2006). Of interest, similar rates of aneuploid oocytes and embryonic loss were observed in the current study. Further explorations are needed to understand how irradiation alters the genome of surviving female gametes.

Female cancer survivors are advised to conceive naturally as a first-line approach, even though fertility preservation is systematically proposed and, if accepted, performed before exposure to gonadotoxic treatments. Hence, naturally conceived pregnancies have been described after radiation exposure (Adriaens *et al.*, 2009; Winship *et al.*, 2018). The current study reports an increase in both oocyte aneuploidy and fetal abortions in mice. Whether such a risk exists in humans too is unknown as aneuploid oocytes and early pregnancy losses may have go unnoticed. Considering the emotional distress associated with pregnancy loss and the lack of data concerning the risk of transmission of genomic damage to the progeny, the right decision, as a precautionary measure, could be to use the vitrified gametes/embryos first.

In conclusion, this study reports quantitative and qualitative changes in the fertility of female irradiated mice that call for a reassessment of the guidelines on the use of cryopreserved gametes. Future work should investigate DNA repair mechanisms and radio-induced ploidy defects in human oocytes to provide information on the genome integrity of female germline in cancer survivors.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are greatly indebted to Yoann Ristic for X-ray irradiation, and thank A. Gouret and A. Leliard for their skilful secretarial assistance. This work was made possible through the

support of EDF (Electricité de France) and the radiobiology segment of CEA (Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives). G.L. was supported by the Institut Universitaire de France.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.rbmo.2021.06.027.

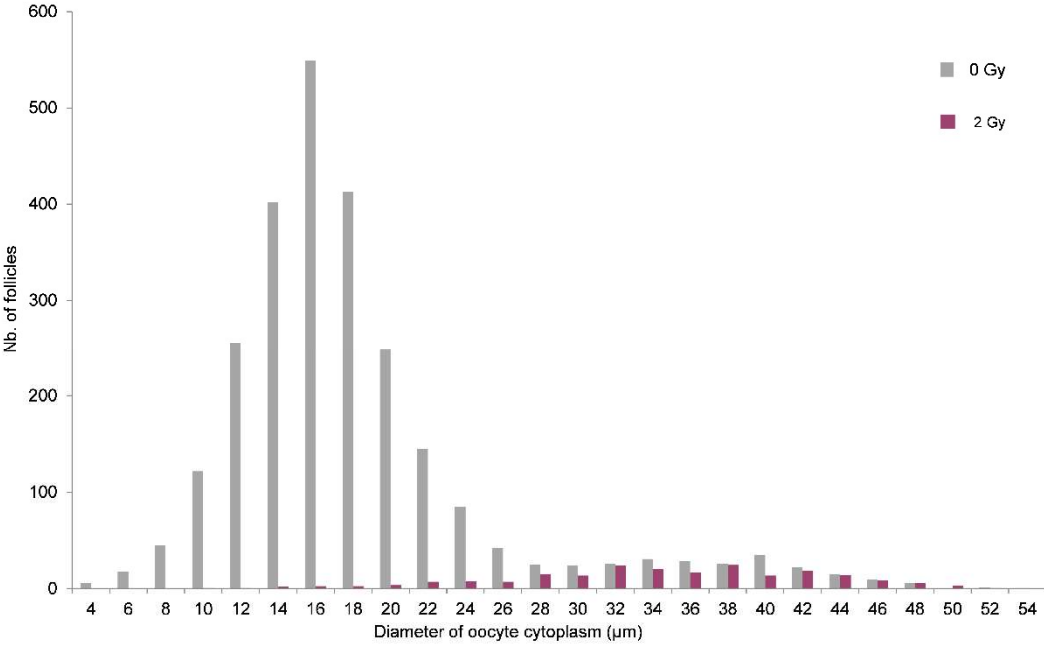
REFERENCES

- Abercrombie, M. **Estimation of nuclear population from microtome sections.** *Anat. Rec.* 1946; 94: 239–247. doi:10.1002/ar.1090940210
- Adriaens, I., Smits, J., Jacquet, P. **The current knowledge on radiosensitivity of ovarian follicle development stages.** *Human Reproduction Update* 2009; 15: 359–377. doi:10.1093/humupd/dmn063
- Angenard, G., Muczynski, V., Coffigny, H., Pairault, C., Duquenne, C., Frydman, R., Habert, R., Rouiller-Fabre, V., Livera, G. **Cadmium Increases Human Fetal Germ Cell Apoptosis.** *Environmental Health Perspectives* 2010; 118: 331–337. doi:10.1289/ehp.0900975
- Asakawa, J., Kamiguchi, Y., Kamiya, K., Nakamura, N. **Mutagenic Effects of Ionizing Radiation on Immature Rat Oocytes.** *rare* 2014; 182: 430–434. doi:10.1667/RR13776.1
- Baker, T.G. **Comparative aspects of the effects of radiation during oogenesis.** *Mutat. Res.* 1971; 11: 9–22. doi:10.1016/0027-5107(71)90028-5
- Bath, L.E., Wallace, W.H.B., Critchley, H.O.D. **Late effects of the treatment of childhood cancer on the female reproductive system and the potential for fertility preservation.** *BJOG* 2002; 109: 107–114. doi:10.1111/j.1471-0528.2002.t011-01007.x
- Belle, M., Godefroy, D., Couly, G., Malone, S.A., Collier, F., Giacobini, P., Chédotal, A. **Tridimensional Visualization and Analysis of Early Human Development.** *Cell* 2017; 169: 161–173. doi:10.1016/j.cell.2017.03.008
- Benova, D.K., Bařraková, A.K., Vŭglenov, A.K., Kusheva, R.P., Rupova, I.M. [Assessment of the genetic risk of radiation by irradiation data from laboratory mammals]. *Genetika* 1985; 21: 574–581
- Bianchi, M 1983 **Cytotoxic Insult to Tissue Effects on Cell Lineages, part 2: the ovary.** Churchill-Livingstone Edinburgh
- Bolcun-Filas, E., Rinaldi, V.D., White, M.E., Schimenti, J.C. **Reversal of female infertility by Chk2 ablation reveals the oocyte DNA damage checkpoint pathway.** *Science* 2014; 343: 533–536. doi:10.1126/science.1247671
- Critchley, H.O.D., Wallace, W.H.B. **Impact of cancer treatment on uterine function.** *J. Natl. Cancer Inst. Monographs* 2005; 64–68. doi:10.1093/jncimonographs/lgi022
- Edelmann, M.N., Krull, K.R., Liu, W., Glass, J.O., Ji, Q., Ogg, R.J., Sabin, N.D., Srivastava, D.K., Robison, L.L., Hudson, M.M., Reddick, W.E. **Diffusion tensor imaging and neurocognition in survivors of childhood acute lymphoblastic leukaemia.** *Brain* 2014; 137: 2973–2983. doi:10.1093/brain/awu230
- Gott, K.M., Potter, C.A., Doyle-Eisele, M., Lin, Y., Wilder, J., Scott, B.R. **A Comparison of Cs-137 γ Rays and 320-kV X-Rays in a Mouse Bone Marrow Transplantation Model.** *Dose Response* 2020; 181559325820916572. doi:10.1177/1559325820916572
- Gougeon, A. **Human ovarian follicular development: from activation of resting follicles to preovulatory maturation.** *Ann. Endocrinol. (Paris)* 2010; 71: 132–143. doi:10.1016/j.ando.2010.02.021
- Hoage, T.R., Cameron, I.L. **Folliculogenesis in the ovary of the mature mouse: A radioautographic study.** *Anat. Rec.* 1976; 184: 699–709. doi:10.1002/ar.1091840409
- IRSN, InVS, n.d. **Doses délivrées aux patients en scanographie et en radiologie conventionnelle.** 2020
- Kalaparakal, J.A., Peterson, S., Peabody, E.M., Thomas, P.R.M., Green, D.M., D'Angio, G.J., Breslow, N.E. **Pregnancy outcomes after abdominal irradiation that included or excluded the pelvis in childhood Wilms tumor survivors: a report from the National Wilms Tumor Study.** *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 2004; 58: 1364–1368. doi:10.1016/j.ijrobp.2003.08.031
- Kerr, J.B., Hutt, K.J., Michalak, E.M., Cook, M., Vandenberg, C.J., Liew, S.H., Bouillet, P., Mills, A., Scott, C.L., Findlay, J.K., Strasser, A. **DNA Damage-Induced Primordial Follicle Oocyte Apoptosis and Loss of Fertility Require Tap63-Mediated Induction of Puma and Noxa.** *Molecular Cell* 2012; 48: 343–352. doi:10.1016/j.molcel.2012.08.017
- Kim, S.-Y., Kim, S.K., Lee, J.R., Woodruff, T.K. **Toward precision medicine for preserving fertility in cancer patients: existing and emerging fertility preservation options for women.** *J. Gynecol. Oncol.* 2016; 27: e22. doi:10.3802/jgo.2016.27.e22
- Kimler, B.F., Briley, S.M., Johnson, B.W., Armstrong, A.G., Jasti, S., Duncan, F.E. **Radiation-induced ovarian follicle loss occurs without overt stromal changes.** *Reproduction* 2018; 155: 553–562. doi:10.1530/REP-18-0089
- Lee, C.J., Park, H.H., Do, B.R., Yoon, Y., Kim, J.K. **Natural and radiation-induced degeneration of primordial and primary follicles in mouse ovary.** *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 59: 109–117. doi:10.1016/s0378-4320(00)00072-5
- Livera, G., Petre-Lazar, B., Guerin, M.-J., Trautmann, E., Coffigny, H., Habert, R. **p63 null mutation protects mouse oocytes from radio-induced apoptosis.** *Reproduction* 2008; 135: 3–12. doi:10.1530/REP-07-0054
- Miller, I., Min, M., Yang, C., Tian, C., Gookin, S., Carter, D., Spencer, S.L. **Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence.** *Cell Reports* 2018; 24: 1105–1112. doi:10.1016/j.celrep.2018.06.110
- Monniaux, D., Clément, F., Dalbiès-Tran, R., Estienne, A., Fabre, S., Mansanet, C., Monget, P. **The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link?** *Biol. Reprod.* 2014; 90: 85. doi:10.1095/biolreprod.113.117077
- Oakberg, E.F. **Gamma-ray sensitivity of oocytes of immature mice.** *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1962; 109: 763–767. doi:10.3181/00379727-109-27330
- Pesty, A., Doussau, M., Lahaye, J.-B., Lefèvre, B. **Whole-body or isolated ovary (60)Co irradiation: effects on in vivo and in vitro folliculogenesis and oocyte maturation.** *Reprod. Toxicol.* 2010; 29: 93–98. doi:10.1016/j.reprotox.2009.10.007
- Probit Analysis.** *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1971; 60: 1432. doi:10.1002/jps.2600600940
- Rai, R., Regan, L. **Recurrent miscarriage.** *The Lancet* 2006; 368: 601–611. doi:10.1016/S0140-6736(06)69204-0
- Reichert, W., Hansmann, I., Röhrborn, G. **Chromosome anomalies in mouse oocytes after irradiation.** *Hum. Genet.* 1975; 28: 25–38. doi:10.1007/BF00272479
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., Bonner, W.M. **Megabase chromatin domains involved in**

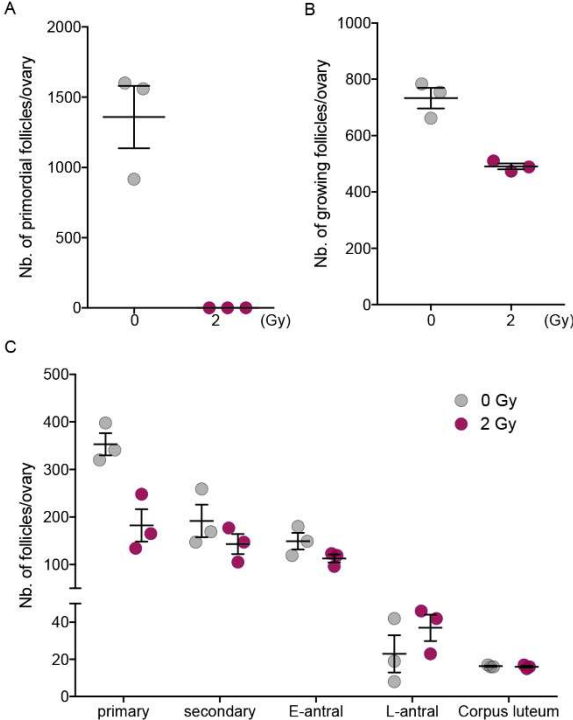
- DNA double-strand breaks in vivo.** *J. Cell Biol.* 1999; 146: 905–916. doi:10.1083/jcb.146.5.905
- Satoh, Y., Asakawa, J., Nishimura, M., Kuo, T., Shinkai, N., Cullings, H.M., Minakuchi, Y., Sese, J., Toyoda, A., Shimada, Y., Nakamura, N., Uchimura, A. **Characteristics of induced mutations in offspring derived from irradiated mouse spermatogonia and mature oocytes.** *Scientific Reports* 2020; 10: 1–13. doi:10.1038/s41598-019-56881-2
- Sauvat, F., Binart, N., Poirot, C., Sarnacki, S. **Preserving fertility in prepubertal children.** *Horm. Res.* 2009; 71: 82–86. doi:10.1159/000178045
- Scott, B.R., Gott, K.M., Potter, C.A., Wilder, J. **A comparison of in vivo Cellular Responses to CS-137 Gamma Rays and 320-KV X Rays. Dose-Response 11.** *dose-response* 2013; 1. doi:10.2203/dose-response.12-050.Scott
- Selby, P.B., Lee, S.S., Kelley, E.M., Bangham, J.W., Raymer, G.D., Hunsicker, P.R. **Specific-locus experiments show that female mice exposed near the time of birth to low-LET ionizing radiation exhibit both a low mutational response and a dose-rate effect.** *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1991; 249: 351–367. doi:10.1016/0027-5107(91)90010-L
- Signorello, L.B., Mulvihill, J.J., Green, D.M., Munro, H.M., Stovall, M., Weathers, R.E., Mertens, A.C., Whitton, J.A., Robison, L.L., Boice, J.D. **Stillbirth and neonatal death in relation to radiation exposure before conception: a retrospective cohort study.** *Lancet* 2010; 376: 624–630. doi:10.1016/S0140-6736(10)60752-0
- Stringer, J.M., Winship, A., Zerafa, N., Wakefield, M., Hutt, K. **Oocytes can efficiently repair DNA double-strand breaks to restore genetic integrity and protect offspring health.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2020; 117: 11513–11522. doi:10.1073/pnas.2001124117
- Suh, E.-K., Yang, A., Kettenbach, A., Bamberger, C., Michaelis, A.H., Zhu, Z., Elvin, J.A., Bronson, R.T., Crum, C.P., McKeon, F. **p63 protects the female germ line during meiotic arrest.** *Nature* 2006; 444: 624–628. doi:10.1038/nature05337
- The ESHRE Guideline Group on Female Fertility Preservation. Anderson, R.A., Amant, F., Braat, D., D'Angelo, A., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Demeestere, I., Dwek, S., Frith, L., Lambertini, M., Maslin, C., Moura-Ramos, M., Nogueira, D., Rodriguez-Wallberg, K., Vermeulen, N. **ESHRE guideline: female fertility preservation†.** *Human Reproduction Open* 2020; 2020. doi:10.1093/hropen/hoaa052
- Tuppi, M., Kehloesser, S., Coutandin, D.W., Rossi, V., Luh, L.M., Strubel, A., Hötte, K., Hoffmeister, M., Schäfer, B., De Oliveira, T., Greten, F., Stelzer, E.H.K., Knapp, S., De Felici, M., Behrends, C., Klinger, F.G., Dötsch, V. **Oocyte DNA damage quality control requires consecutive interplay of CHK2 and CK1 to activate p63.** *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2018; 25: 261–269. doi:10.1038/s41594-018-0035-7
- Underbrink, A.G., Kellerer, A.M., Mills, R.E., Sparrow, A.H. **Comparison of X-ray and gamma-ray dose-response curves for pink somatic mutations in *Tradescantia* clone 02.** *Radiat. Environ. Biophys.* 1976; 13: 295–303. doi:10.1007/BF01331174
- Wallace, W.H., Shalet, S.M., Hendry, J.H., Morris-Jones, P.H., Gattamaneni, H.R. **Ovarian failure following abdominal irradiation in childhood: the radiosensitivity of the human oocyte.** *Br. J. Radiol.* 1989; 62: 995–998. doi:10.1259/0007-1285-62-743-995
- Wallace, W.H.B., Thomson, A.B., Kelsey, T.W. **The radiosensitivity of the human oocyte.** *Human Reproduction* 2003; 18: 117–121. doi:10.1093/humrep/deg016
- Wallace, W.H.B., Thomson, A.B., Saran, F., Kelsey, T.W. **Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries.** *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 2005; 62: 738–744. doi:10.1016/j.ijrobp.2004.11.038
- West, J., Kirk, K., Goyder, Y., Lyon, M. **Discrimination between the effects of X-ray irradiation of the mouse oocyte and uterus on the induction of dominant lethals and congenital anomalies. Embryo-transfer experiments.** *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1985; 149: 221–230. doi:10.1016/0027-5107(85)90028-4
- Winship, A.L., Stringer, J.M., Liew, S.H., Hutt, K.J. **The importance of DNA repair for maintaining oocyte quality in response to anti-cancer treatments, environmental toxins and maternal ageing.** *Human Reproduction Update* 2018; 24: 119–134. doi:10.1093/humupd/dmy002
- Winther, J.F., Boice, J.D., Svendsen, A.L., Frederiksen, K., Stovall, M., Olsen, J.H. **Spontaneous Abortion in a Danish Population-Based Cohort of Childhood Cancer Survivors.** *JCO* 2008; 26: 4340–4346. doi:10.1200/JCO.2007.15.2884
- Wittenborn, T.R., Fahlgvist Hagert, C., Ferapontov, A., Fonager, S., Jensen, L., Winther, G., Degn, S.E. **Comparison of gamma and x-ray irradiation for myeloablation and establishment of normal and autoimmune syngeneic bone marrow chimeras.** *PLoS One* 2021; 16:e0247501. doi:10.1371/journal.pone.0247501

Received 13 November 2020; received in revised form 28 May 2021; accepted 28 June 2021.

Supplemental Figure S1: Oocytes volumes using in toto analysis of mouse ovary on day 10 post-partum.

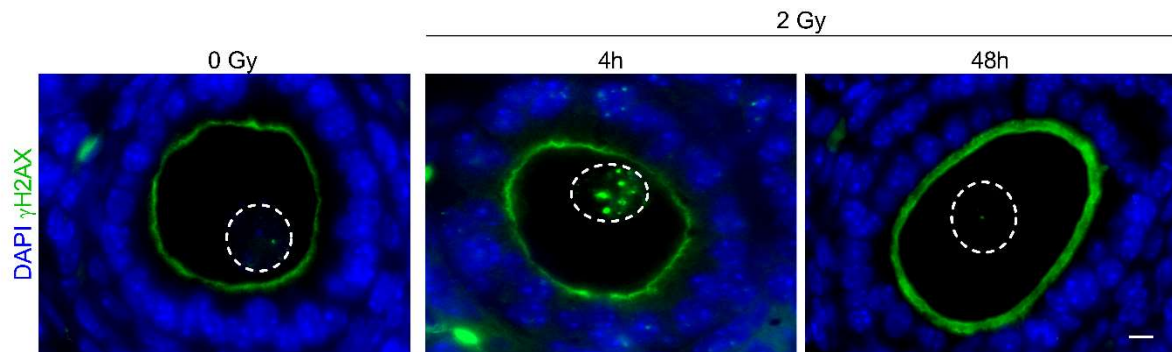


Supplemental Figure S2: Radiosensitivity of oocytes in adult mice. Twelve weeks NMRI female mice were whole body exposed to gamma radiation with 2Gy. Ovaries were harvested 48 hours after radiation exposure and histological analysis was performed to quantify ovarian follicles in both irradiated (purple dot) and sham (grey dot) treated mice (A: primordial follicles; B, C: growing follicles with detailed follicular stages). E-antral: early antral; L-antral: late antral

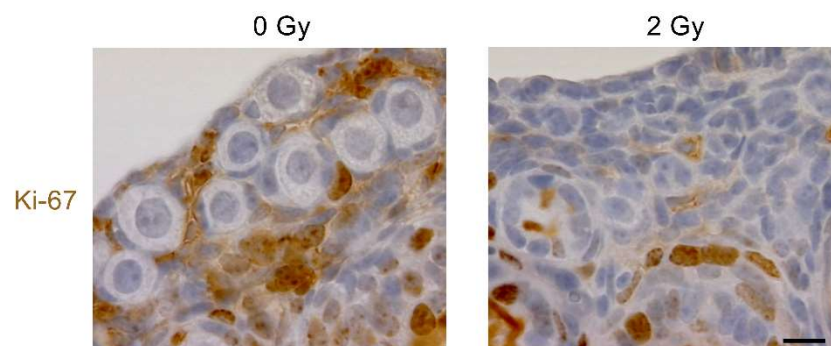


Supplemental Figure S3: Nuclear DNA damage are repaired in surviving growing oocytes after radiation exposure to 2 Gy.

8 dpp pre-pubertal female mice were analysed 4 and 48 hours after being irradiated with 2 Gy (1.03 Gy/min of γ -rays) and compared to controls (n=5 each). DNA nuclear damage was evaluated with 10 sections of ovaries immunostained for γ -H2AX per animal. Results were consistent across all the GF observed (n=40 per group) and representative images are provided. Scale bar is 5 μ m.



Supplemental Figure S4: As expected, Ki67 staining was absent in resting follicles 48 hours after radiation exposure to 2 Gy (gamma rays) in 10 dpp NMRI mice. Scale bar is 10 μ m.



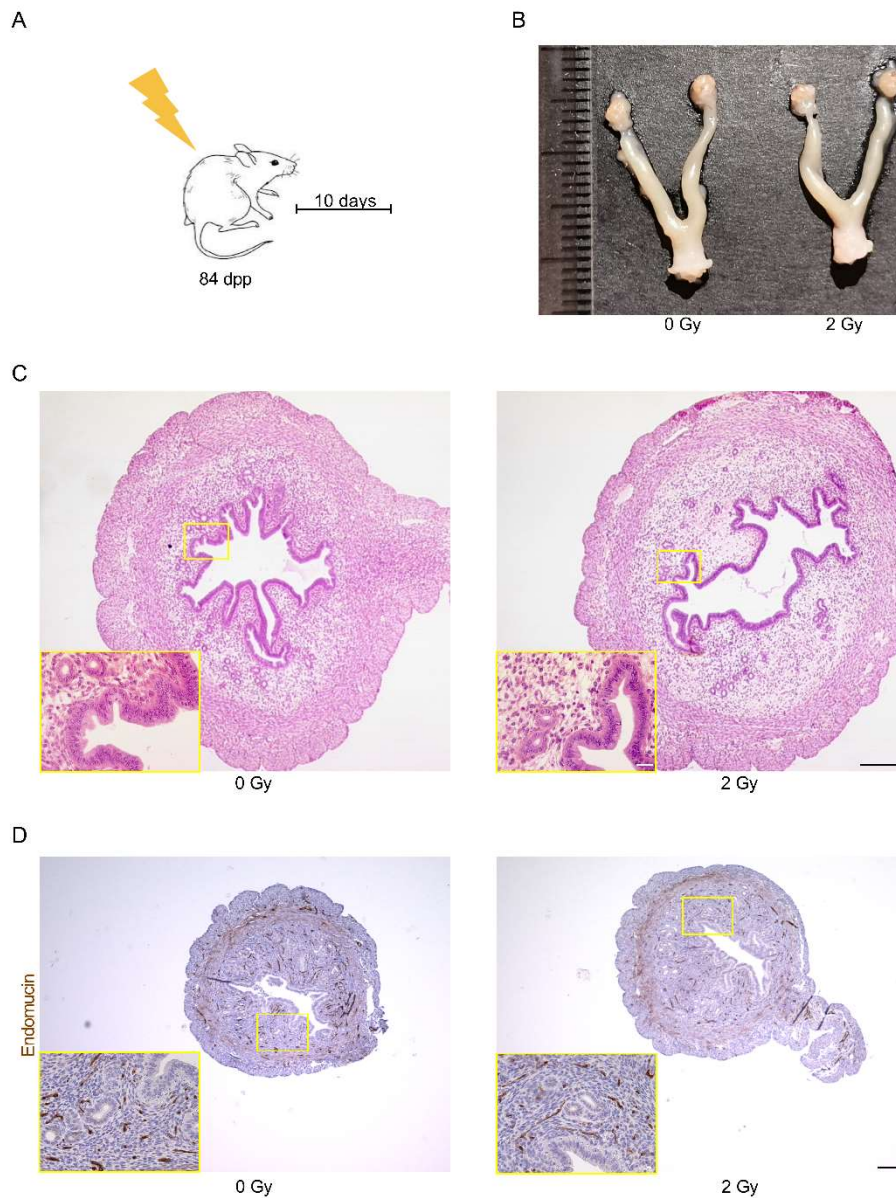
Supplemental Figure S5: Mouse uteri analysis after radiation exposure to 2 Gy.

(A) Uteri were harvested 10 days after radiation exposure to 2Gy in C57BL/6 adult mice (n=6) and compared to control (n=6).

(B) Macroscopic aspect of uteri were similar between irradiated and non-irradiated mice.

(C) Five μm sections taken every ten sections were stained with hematoxylin-eosin-safran and used for microscopic analysis. Yellow boxes show enlarged view of endometrial epithelium and underlying chorion. Black and white scale bars are 200 μm and 20 μm respectively.

(D) Endomucin staining of uteri showed similar vascularization in both irradiated and non-irradiated mice. Yellow boxes show enlarged view of vascularization in chorion. Black and white scale bars are 200 μm and 20 μm respectively.



Partie 2

Étude de la prise en charge des cassures double-brin de l'ADN dans l'ovocyte post-natal mammalien

Chez la Souris, nous avons vu dans l'étude précédente que les ovocytes entrés en croissance étaient bien plus radiorésistants que ceux de la réserve ovarienne. Chez l'Homme, on pense que les ovocytes de la réserve sont moins radiosensibles que chez la Souris bien qu'aucune étude expérimentale n'ait confirmé ce point avant nos travaux. En particulier, plusieurs études ont rapporté des conceptions naturelles après un antécédent d'irradiation de plusieurs grays (Polishuk et Schreiber 1956; Gans, Bahary, et Levie 1963; Wallace et al. 2005; Adriaens, Smitz, et Jacquet 2009). Cette radiosensibilité plus faible n'est à ce jour pas expliquée. Elle pourrait notamment être liée à un seuil plus élevé pour l'activation de l'apoptose et/ou à l'utilisation de voies de réparation de l'ADN différentes.

La capacité de certains ovocytes à survivre à une exposition aux RI soulève des questions quant à la transmission possible d'effets mutagènes à la descendance (Adriaens, Smitz, et Jacquet 2009; Satoh et al. 2020). Ce risque héréditaire dépend de la fidélité du processus de réparation des CDBs. De manière surprenante, celle-ci n'avait jamais été étudiée dans des ovocytes radiorésistants avant l'initiation de notre travail. Une surreprésentation des gènes impliqués dans la réponse aux dommages de l'ADN et la réparation de l'ADN a été signalée tout au long du développement de l'ovocyte (Pan et al. 2005; Hamatani et al. 2008). Au cours du développement fœtal, les CDBs méiotiques induites par SPO11-TOPVIB-like sont réparées par RH méiotique en utilisant le chromosome homologue comme matrice. Après la naissance, ce processus de réparation programmée des CDBs est terminé et les ovocytes présentent des chiasmata qui sont des liens physiques entre les chromosomes homologues nécessaires à une ségrégation chromosomique équilibrée. Dans l'ovaire post-natal, une seule étude a rapporté la capacité des ovocytes des FP très radiosensibles à supporter une RH efficace après irradiation dans un modèle murin déficient pour l'apoptose (Stringer et al. 2020). Cependant, l'implication d'autres voies de réparation de l'ADN, comme la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ), n'a jamais été caractérisée dans la lignée germinale femelle, bien que son activation puisse présenter un risque d'instabilité génomique.

Dans cette étude, nous avons étudié les voies de réparation de l'ADN dans l'ovocyte post-natal chez la Souris puis chez l'Homme grâce à un système original de culture organotypique de fragments ovariens donnés à la Recherche. Je présente ici une ébauche de manuscrit car des expérimentations sont encore en cours pour ce travail.

MESSAGES CLÉS :

Le choix de la voie de réparation des CDBs de l'ADN dans les ovocytes est une question importante pour les femmes ayant un antécédent d'exposition ovarienne aux RI et qui souhaitent concevoir naturellement. Nous montrons ici un passage de la RH au NHEJ dans l'ovocyte au cours de la folliculogénèse chez la Souris. Nous démontrons également que la survie des ovocytes en croissance après irradiation dépend de l'activation du c-NHEJ en utilisant un nouveau modèle d'inactivation conditionnelle de *Xlf* dans les ovocytes murins. Chez l'Homme, nous avons évalué expérimentalement la radiosensibilité de la réserve ovarienne et confirmé sa plus grande radiorésistance par rapport à celle de la Souris. Nos résultats suggèrent que cette radiosensibilité plus faible de l'ovocyte humain pourrait, comme dans les ovocytes en croissance de la Souris, être corrélée à une diminution de la résection lors de la prise en charge des CDBs. Ces résultats questionnent donc l'intégrité génomique de la lignée germinale femelle humaine après irradiation.

The switch from homologous recombination to non homologous end joining repair pathway in the mammalian female germline

Vincent Puy^{1,2}, Sébastien Messiaen², Vilma Barroca³, Marie-Justine Guerquin², Véronique Ménard⁴, Caroline Devanand³, Nelly Frydman^{1,2}, Emmanuelle Martini^{2*} and Gabriel Livera^{2*}

¹*University hospital Antoine-Béclère- AP-HP, Reproductive Biology Unit, Clamart- F-92140, France*

²*Laboratoire de Développement des Gonades, UMRE008 Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, Université de Paris, Université Paris-Saclay, CEA/DRF/IBFJ/iRCM, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France*

³*CEA-Universities Paris Diderot and Paris Saclay, Animal experimentation platform-UMR Genetic stability- Stem cells & Radiation- INSERM U1274, Fontenay aux Roses- F-92265, France*

⁴*CEA Irradiation platform-UMRE008 Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, Université de Paris, Université Paris-Saclay, U1274 Inserm, CEA/DRF/IBFJ/iRCM/GIR, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France*

*Both authors contributed equally to the work

Keywords: DNA repair, fertility, hereditary risk, genomic integrity, NHEJ, oocytes

Introduction:

Defining the hereditary risk in women after cancer treatment is a major health issue that has yet received little attention. Indeed, natural conception in cancer survivors can occur and no specific follow up is advised. This may appear surprising as our knowledge regarding DNA repair mechanisms in oocytes surviving to radiation exposure (RE) is nearly inexistent. Oocyte development in females begins *in utero*, when primordial germ cells enter and complete early stages of meiosis, including meiotic recombination, before arresting in a stage called dictyate at the end of prophase I. The oocytes then undergo folliculogenesis, they become surrounded by flattened granulosa cells to form primordial follicles (PF) in a quiescent state. Mammalian female ovaries house a finite number of immature oocytes after birth that defines fertility lifespan (Findlay et al. 2015; Porras-Gómez et Moreno-Mendoza 2017). This ovarian reserve gradually decreases with aging through follicular atresia and the progression in folliculogenesis (Gougeon 2010; Danielle Monniaux et al. 2014). Growing follicles (GF) result from the activation of some PF and associate the mitotic development of follicular cells with oocyte growth.

Genomic integrity of oocytes is essential to maintain both fertility lifespan and genome stability. RE is well known to trigger DNA damage with deleterious consequences when improperly managed or repaired. Exogenous DNA double-strand breaks (DSBs) are considered the most toxic form of DNA damage. In somatic cells, although unrepaired DSBs can cause cell death, improperly repaired DSBs challenge genome stability and can lead to cancer development (Scully et al. 2019). In female germline, unrepaired DSBs can lead to apoptotic elimination of damaged prophase-arrested oocytes to safeguard the oocytes from genetic defects. Indeed, exposure to exogenous reprotoxic events such as radiation can trigger oocyte death that may lead to premature ovarian failure (POF) or to complete sterility (Wallace et al. 2005; Adriaens, Smitz, et Jacquet 2009; Clark et al. 2020).

In mouse, PF oocytes undergo apoptosis when exposed to ionizing radiation through the activation of P63 and P53 (Suh et al. 2006; G. Livera et al. 2008; Bolcun-Filas et al. 2014). These oocytes are far more radiosensitive to RE than somatic cells. On the other hand GF oocytes are much more radioresistant (Guigon et al. 2003; Adriaens, Smitz, et Jacquet 2009; Puy et al. 2021). In human PF oocytes are believed to survive to high doses of radiation when compared to mouse PF oocytes and several studies reported natural conception in women after RE to several grays (Polishuk et Schreiber 1956; Gans, Bahary, et Levie 1963; Wallace et al. 2005; Adriaens, Smitz, et Jacquet 2009). Whether this lower radiosensitivity is because prophase-arrested oocytes have higher threshold for the activation of apoptosis and/or use different DNA repair pathways remains unknown.

Bypassing exposure to reprotoxic agents for some cryopreserved oocytes/embryos, fertility preservation (FP) is recommended to improve conception success in female cancer survivors (Garcia-Velasco et al. 2013; Mayeur et al. 2021; Marklund et al. 2021). However, the capacity for some oocytes to survive to RE raises questions towards the possible transmission of mutagenic effects to the progeny (Adriaens, Smitz, et Jacquet 2009; Satoh et al. 2020). This hereditary risk is depending on the fidelity of the DSBs repair process. Thus, the fidelity as well as the capacity of DSB repair in oocytes needs to be understood. Surprisingly, the latter is currently poorly described in post-natal oocytes. Radioinduced DSBs are detected by MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) which activates PI3K family member ATM that activates CHK2 and orchestrates the recruitment of repair factors at the DSB site. An overrepresentation of genes involved in DNA damage response (DDR) and DNA repair was reported throughout oocyte development (Pan et al. 2005; Hamatani et al. 2008). During fetal development, the SPO11/TOPOVIBL-induced DSBs are repaired by meiotic homologous recombination (HR) using homologous chromosome as a template. After birth this programmed DSB repair process is ended and oocytes harbor chiasmata which are physical links between homologous chromosomes required for balanced chromosomal segregation. In the post-natal ovary, only one study has reported the capacity for very radiosensitive PF oocytes to support efficient HR after RE in mouse apoptosis deficient *P63* *-/-* model (Stringer et al. 2020). However, the involvement of other DNA repair pathways, including the error-prone non homologous end joining (NHEJ) has never been exhaustively characterized in female germline yet albeit its activation could be at risk of genomic instability.

In this study, we aimed to determine whether radioresistant prophase-arrested oocytes are capable of DSB repair and to provide insight into the role that DNA repair plays in determining the number and quality of oocytes available to support female reproduction in mouse and human.

Materials and methods

Animals and irradiation

All mice were housed individually under a controlled photoperiod. Experiments were performed in compliance with European legislation and with the Ethics Committee of the French Ministry of Agriculture (Agreement D9203202; reference 2020012414542835 [APAFIS#23783], approved 27 January 2020).

Ten days post-partum (dpp) female NMRI mice (n=16) were used to assess the kinetic of DNA damage signaling and DNA damage repair. Ten dpp C57BL/6N wild type (n=13) and *Xlf* deficient (n=16) mice genotyped as previously described (Vera et al. 2013) and gently provided by J.P. De Villartay were used to assess mouse growing oocytes survival. For this purpose, we also analysed female *Vasacre+Xlf^{fl/fl}* mice (n=13).

Patients

Three patients gave informed consent to use their ovarian tissue cryopreservation for research purposes. Patient 1 (P1), patient 2 (P2), and patient 3 (P3) underwent FP before reprotoxic treatment for non-hodgkin lymphoma, breast cancer and borderline ovarian tumor at 36, 27.6 and 26.1 years old respectively. Antral follicle count (AFC) before FP were P1: 15, P2: 6 and P3: 5 and antimullerian hormone was only determined for P3 and equal to 3.7 ng/mL.

Irradiation

Irradiations were performed with a GSR D1 irradiator from GSM Company. It is a self-shielded irradiator with four sources of ¹³⁷Césium with a total activity around 180.28 TBq in March 2014 and which emits gamma ray (662 KeV). Sample were irradiated at one single dose: 2 Gy with an output of 1.03 Gy/min take the radioactive decrease into account.

For *in vivo* experiment, mice were in specific box during the irradiation. Prior to irradiate, dosimetry was performed with this box. A cylindrical ionizing chamber 31010 by PTW was used as the recommendation of the TG-61 American Association of Physicists in Medicine (AAPM). This ionizing chamber has a cavity of 0.125 cm³ calibrated in ¹³⁷ Cesium dose water with the PTB reference facility number 1904443.

For *in vitro analysis*, samples were irradiated in T25 and in 12-well boxes. Prior to irradiate, dosimetry was performed. A cylindrical ionizing chamber 31010 by PTW was used as the recommendation of the TG-61 AAPM. This ionizing chamber has a cavity of 0.125 cm³ calibrated in ¹³⁷ Cesium air kerma free in air with the PTB reference facility number 1904442.

Tissue processing and quantitative assessment of oocytes

Ovarian tissue was assessed as previously described (Puy et al. 2021). Briefly, ovaries were collected for mice or thawed for human and fixed in Bouin's fixative or 4% paraformaldehyde for 24 h, dehydrated in alcohol, paraffin embedded and then cut into 5 μm sections and stained with haematoxylin–eosin–safron (HES). Ovarian follicles were counted every 10 sections using the oocyte nucleus as a marker. The follicles were classified according to the shape and number of layers of somatic cells surrounding the oocyte: primordial follicles with flattened cells, and growing follicles (primary with one layer of cuboidal cells, secondary with two layers of cells, and antral with an antrum). The Abercrombie formula was used to correct any double-counting resulting from the appearance of a single cell in two successive sections (Abercrombie 1946; Angenard et al. 2010).

Human ovarian tissue preparation and organotypic culture

Strip of thawed ovarian fragments were washed in decreasing solutions of DMSO 1.5 M (5 min), 1 M (5 min), 0.5 M (10 min), and 0.05 M sucrose in Leibovitz L-15 medium supplemented with 10% decomplexed patient serum. Each strip was then rinsed and transferred to the research department in medium containing 20% serum only (Roux et al. 2010). These strips were cut in thin pieces inferior to 0.5 cm^2 to be cultured in 30 μL inverted drop of 37°C media containing DMEM/F12 (Thermofisher scientific, 21041025, France), 10% fetal calf serum and 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin deposited on the lid of twelve-well boxes. The latter were filled with PBS and placed in an atmosphere of 5% $\text{CO}_2/95\%$ air at 37 °C. Media was changed daily and immediately after irradiation to limit cell starvation and ionization of water respectively. The time spent outside the incubator was reduced as much as possible and applied in the same proportion for irradiated and non-irradiated boxes.

Tissue immunostaining

To assess radio-induced DNA damage immunostaining was performed on ovary sections. Fixed ovarian sections were incubated in blocking buffer (0.2% bovine serum albumin [BSA], 0.2% cold water fish gelatin, 0.05% Tween 20 in PBS 1X) for 1 h and overnight with mouse monoclonal primary anti- γ -H2AX (H2A.X variant histone; 1:500; Sigma-Aldrich Chimie, France) or mouse monoclonal primary anti-RAD51 (1:200; Bio-technie Brand, France) or rabbit monoclonal primary anti-53BP1 (1:200; Cell Signaling Technology, Ozyme, France) diluted in blocking buffer at room temperature. After washing in PBS–Tween 20, slides were incubated for 1 h at 37°C with a donkey anti-mouse or a donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody (1:500; Fisher Scientific SAS, France) diluted in blocking buffer. The dilution of secondary antibodies was determined to produce the lowest unspecific staining (i.e.

producing no staining in the absence of the primary antibody). Three washing steps using 0.05% Tween 20 in PBS 1X were performed at room temperature (5 min each). DNA was stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1/10,000 in PBS; Eurobio Ingen, France) for 10 min at room temperature. Slides were mounted with ProLong Gold (Fisher Scientific SAS), imaged on a laser-scanning confocal microscope (confocal spinning disk, W1) and analysed with ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Statistical analysis

Data collected were analysed using GraphPad Prism software (version 6.0; GraphPad Software, USA) and were expressed as mean \pm SEM. For small samples, non parametric Mann–Whitney or Kruskal-Wallis tests were performed to compare unpaired values as appropriate. The threshold for statistical significance was set to $P < 0.05$.

Results

DSB repair is delayed but effective in radioresistant oocytes

We used γ H2AX labelling to assess the kinetic of DSBs repair in 8 dpp NMRI mouse ovaries after RE to 2 Gy (Figure 1A, 1B). Both somatic cells and oocytes nuclei displayed rapid significant increase of γ H2AX foci 30 minutes after RE (Figure 1C). Somatic follicular cells had a significant increase of DSBs signalling with 8.8 ± 0.4 γ H2AX foci 30 minutes after RE compared to 0.4 ± 0.1 γ H2AX foci in unirradiated ovaries ($p < 0.001$). This increase was significantly higher in oocytes with 16.7 ± 0.5 and 2.1 ± 0.2 γ H2AX foci in irradiated and unirradiated ovaries respectively ($p < 0.0001$). We found no difference in the initial increase of γ H2AX level in oocytes according to the follicle stage with 16.5 ± 0.4 and 17 ± 0.6 γ H2AX foci in PF and GF respectively.

As expected in somatic cells, the majority of γ H2AX foci rapidly disappeared in follicular cells with 2.0 ± 0.2 foci γ H2AX at 8 hours and less than 1 γ H2AX foci persisting 24 hours after RE. On the contrary, the kinetic of DSB repair was markedly slower in oocytes. No decrease in the number of γ H2AX foci was observed 8 hours after RE. Of note, numerous PF oocytes nuclei were fully labelled by γ H2AX (likely apoptotic cells) and we could only decipher foci on 30% of these oocytes. From 24 hours after RE onwards, we confirmed that all PF oocytes were eliminated (Hanoux). In growing oocytes, the number of γ H2AX was reduced by half within 24 hours and returned to control levels (non irradiated) 48 hours after RE.

Thus, the kinetic of DSBs repair is delayed and slower in growing oocytes compared to follicular somatic cells.

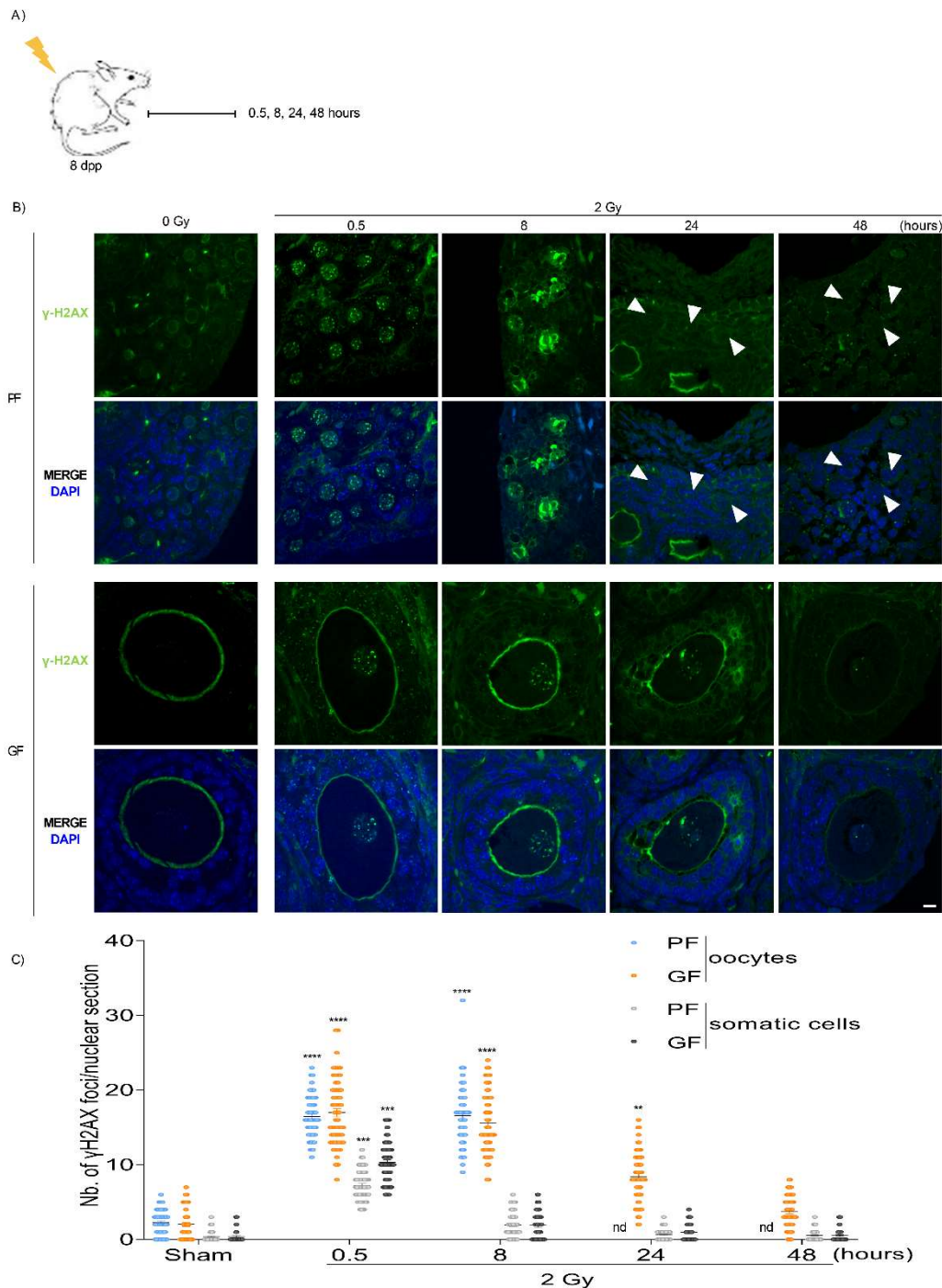


Figure 1: Kinetics of DNA damage signalling in mouse ovaries after radiation exposure.

A) Eight jpp NMRI mouse ovary sections were labelled with γ H2AX at different timepoints (0.5, 8, 24, 48 hours) after radiation exposure to c and compared to non-irradiated ovaries.

B) Representative sections of ovaries immunostained for γ H2AX (green) at different timepoints after being irradiated (2 Gy) or not (0 Gy). DNA is stained with DAPI (blue). White arrows show indicate empty PF (ie oocyte free). Scale bar is 5 μ m.

C) Timecourse of γ H2AX labelling in the larger nuclear section of follicular cells from PF (n=8, blue dot) and GF (n=8, orange dot) in non irradiated (0 Gy) and (2 Gy) irradiated mice. Each point represents the number of γ H2AX foci counted in the nucleus of one cell and 60 follicular cells were analyzed for each group. ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$

dpp: days post-partum; GF: growing follicle; Gy: Gray; nd: not determined; PF: primordial follicles

HR is not favored in radioresistant mouse oocytes

Homologous recombination has been reported to be the major DSB repair pathway in resting oocytes (Stringer et al. 2020). High radioresistance of growing oocytes could be due to a different management of DSB repair. To test this hypothesis, we first labelled RAD51 to specifically assess the kinetic of HR in mouse ovary sections after RE to 2Gy (Figure 2A, 2B). At 30 minutes after RE, very few RAD51 foci were observed in somatic cells (0.3 ± 0.3 vs 0.03 ± 0.03 in controls) whereas they were easily evidenced in oocytes (7.0 ± 0.5 vs 0.5 ± 0.2 in controls). All RAD51 foci colocalized with γ H2AX. At the same timepoint after RE, the number of RAD51 foci was lower in growing oocytes compared to PF oocytes with 4.4 ± 0.5 and 9.7 ± 0.5 RAD51 foci respectively ($p < 0.0001$). Among γ H2AX nuclear foci, 73.6% and 40.9% were RAD51 free in GF and PF oocytes respectively ($p < 0.001$). From 8 hours onwards, we observed a decrease in RAD51 labelling in surviving cells similar to γ H2AX kinetic. Of note, PF oocytes that had distinguishable γ H2AX foci had decreased RAD51 foci number 8 hours after radiation exposure supporting the idea of a progression through HR.

53BP1 is recruited to the DSB lesion in both radioresistant oocytes and somatic cells

RAD51 loading during HR occurs secondarily to extended resection of DNA on each side of DSB. End resection is initiated by the 3'-5' exonucleasic activity of MRE11 from MRN complex and facilitated by CtBP-interacting protein (CtIP) (Yu et Chen 2004; Yun et Hiom 2009). A more extensive end resection is subsequently carried out by DNA replication ATP-dependent helicase-like homolog (DNA2) and Exonuclease 1 (EXO1) that generates longer single-stranded DNA stretches (Gravel et al. 2008; Nimonkar et al. 2011). This extensive end resection is favored by the recruitment of BRCA1. 53BP1 is known to prevent DNA end extensive resection by its antagonist activity on BRCA1 and more directly through the 53BP1-RIF1-shieldin complex (Setiaputra et Durocher 2019). To analyse the choice towards resection in DSB repair of growing radioresistant oocytes we labelled irradiated and non irradiated mouse ovary sections with 53BP1 and γ H2AX at different timepoints after RE (0.5, 8, 24, 48 hours) (Figure 2C, 2D). At 30 minutes after RE, the number of 53BP1 nuclear foci was very significantly increased in both somatic cells (5.8 ± 0.7 , $p < 0.001$) and GF oocytes (11.8 ± 0.7 , $p < 0.0001$) compared to unirradiated ovaries. Among γ H2AX nuclear foci, 32.6% were 53BP1 free in GF oocytes. All 53BP1 foci colocalized with nuclear γ H2AX labelling. Importantly, no 53BP1 foci was observed in PF oocytes shortly after RE. Thus, there is a switch from HR to non resective management of DSBs according to oocyte activation. From 8 hours onwards, we observed a decrease in 53BP1 labelling in surviving cells similarly to γ H2AX kinetic. At 8 hours after RE, the number of 53BP1 nuclear foci (1.5 ± 0.3 , $p < 0.001$) was significantly decreased compared to 30 minutes timepoint in GF oocytes (Figure 2D). No increase of RAD51 foci in GF oocytes at this time point.

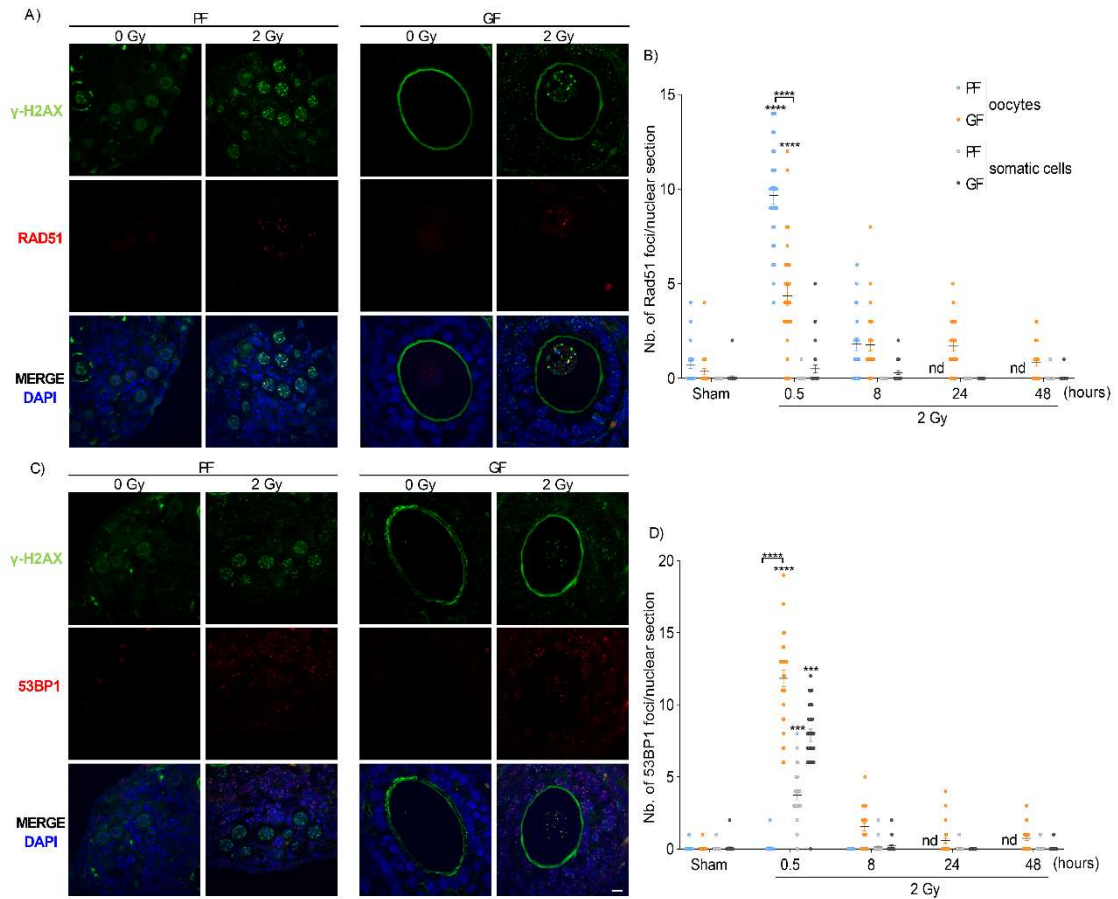


Figure 2: Kinetics of double-strand DNA break repair in ovarian follicles after radiation exposure

Using the same protocol as Figure 1, we labelled RAD51 homologous recombination specific factor and 53BP1 which prevents DNA ends from resection to analyze DSB repair. Scale bar for representative sections is 5 μ m.

A) Representative sections of ovaries immunostained for γ -H2AX (green), RAD51 (red) 30 minutes after being irradiated (2 Gy) or not (0 Gy). DNA is stained with DAPI (blue).

B) Quantification of RAD51 foci in the larger nuclear section of follicular cells and oocytes from PF (gray dot and blue dot respectively) and GF (black dot and orange dot respectively) in non-irradiated (0 Gy) and irradiated (2 Gy) mice. Each point represents the number of RAD51 foci counted in the nucleus of one cell and 30 cells were analyzed for each group. **** $p \leq 0.0001$

C) Representative sections of ovaries immunostained for γ -H2AX (green), 53BP1 (red) 30 minutes after being irradiated (2 Gy) or not (0 Gy). DNA is stained with DAPI (blue).

D) Quantification of RAD51 foci in the larger nuclear section of follicular cells and oocytes from PF (gray dot and blue dot respectively) and GF (black dot and orange dot respectively) in non-irradiated (0 Gy) and irradiated (2 Gy) mice. Each point represents the number of RAD51 foci counted in the nucleus of one cell and 30 cells were analyzed for each group. *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$

Functional canonical NHEJ is implied in GF oocyte survival to RE

As 53BP1 is known to direct DSB repair toward NHEJ we hypothesized that this pathway was active in GF oocytes. To answer this question, we irradiated mice invalidated for *Xlf* which is specific to c-NHEJ (Figure 3A). Two days after RE to 2 Gy, we observed a significant decrease in the number of GF oocytes in *Xlf*^{-/-} mice (103 ± 7 , n=10, in irradiated vs 271 ± 15 , n=6, in non-irradiated ovaries, $p < 0.01$) contrary to wild type mice (244 ± 15 in irradiated, n=6, vs 203 ± 11 , n=7, in non-irradiated ovaries) (Figure 3B). Thus, canonical NHEJ is required for GF survival to RE. As invalidation of *Xlf* occurred in both somatic and germ cells, this result does not prove that this pathway was specifically used by the oocyte inside the ovarian follicle. We therefore investigated conditional mutant mice for *Xlf* using *Vasa-cre* which is specifically expressed in oocytes (Figure 3C). In this Cre-lox model, we also retrieved a significant elimination of GF oocyte 48 hours after RE to 2 Gy indicating that c-NHEJ is active in growing oocytes and necessary for its survival after RE. We therefore demonstrated that oocyte growth acts as a switch from HR to c-NHEJ which triggers a somatic like response to radioinduced DSB.

Human PF oocytes radiosensitivity is lower than in mouse

Post-natal human ovarian reserve was reported to be less radiosensitive than in mouse but this has not been experimentally demonstrated yet (Wallace et al. 2005; Adriaens, Smits, et Jacquet 2009). Thawed ovarian research fragments of three patients were cultured *in vitro* for two days and most of ovarian follicles survived to this protocol despite heterogeneity between fragments and inter-individual variations related to their fertility status before FP. Two days after thawing, ovarian fragments were irradiated *in vitro* with 2 Gy (Figure 4A). Several PF oocytes survived 48 hours after this RE demonstrating the higher radioresistance of human PF compared to mouse ones (Figure 4B).

We next assumed that this difference of radiosensitivity may be related to less resective management of radioinduced DSB such as in mouse growing oocyte. We analysed sections of cultured human ovaries 30 minutes after RE (Figure 5A). We used γ H2AX labelling to assess DSB signalling and found a significant increase (n=1) compared to non irradiated fragments (Figure 5B, 5C). To analyze early management of radioinduced DSB, we next compared the commitment to DNA resection using RAD51 and 53BP1 as previously performed in mouse (Figure 5B). Surprisingly we found no RAD51 foci in all PF oocytes analyzed (n= 30 PF oocytes, P1) (Figure 5D). All oocytes had some 53BP1 that colocalized with γ H2AX (n= 30 PF oocytes) (Figure 5E). These results provide evidences for the possibility of post-natal human oocytes to direct DSB management toward non resective repair pathways.

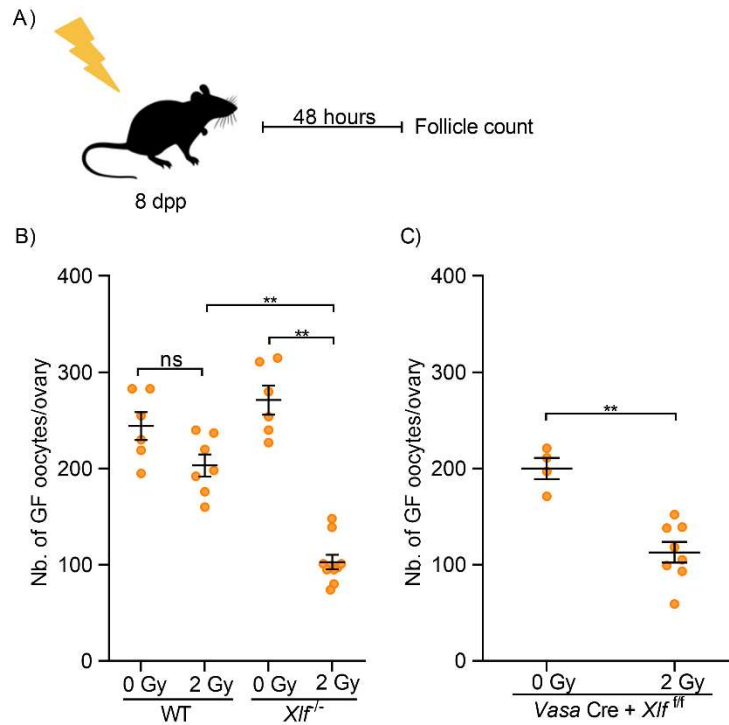


Figure 3: Ovarian follicle survival after radiation exposure partly depends on canonical NHEJ repair pathway.

A) C57BL/6N mouse ovaries were harvested 48 hours after radiation exposure to 2 Gy to quantify the number of growing oocytes and compared to non-irradiated ovaries. Countings were performed every ten ovary sections stained with hematoxylin-eosin-saffron for each mouse.

B) Quantification of growing oocytes in non-irradiated (0Gy) and irradiated (2Gy) ovaries from wild type (n=6 and n=7 respectively) and *Xlf*^{-/-} (n=6 and n=10 respectively) mice. Each point represents the number of growing oocytes corresponding to one mouse ovary. For each group, we analysed at least six mice. ** $p \leq 0.01$

C) Quantification of growing oocytes in non-irradiated (0Gy, n=5) and irradiated (2Gy, n=8) ovaries from *Vasa-Cre Xlf*^{fl/fl} mice. Each point represents the number of growing oocytes corresponding to one mouse ovary. For each group, we analysed at least five mice. ** $p \leq 0.01$

dpp: days post-partum; Gy: Gray; ns: non significant; PF: primordial follicles

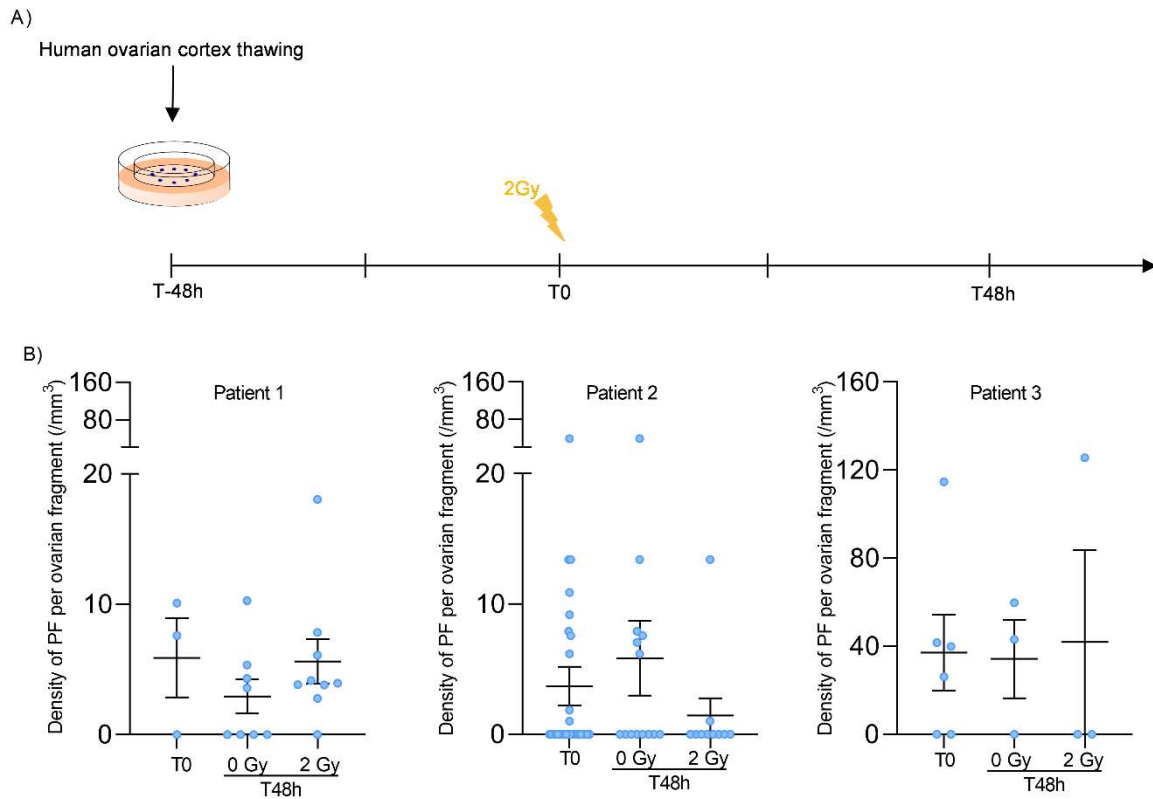


Figure 4: Human ovarian reserve radiosensitivity in organotypic culture

A) Frozen human ovarian fragments were thawed and cut in short pieces inferior to 0.5 cm². They were then cultured in reverse drops for 2 days before being irradiated (2Gy) or not (0Gy). Quantification of the ovarian reserve was performed before (T0) and 2 days after radiation exposure (T48h 0Gy; T48h 0Gy).

B) Quantification of PF in ovarian tissue for each patient. Each point represents the density of PF per mm³ of ovarian tissue.

h: hours; Gy: Gray; PF: primordial follicle

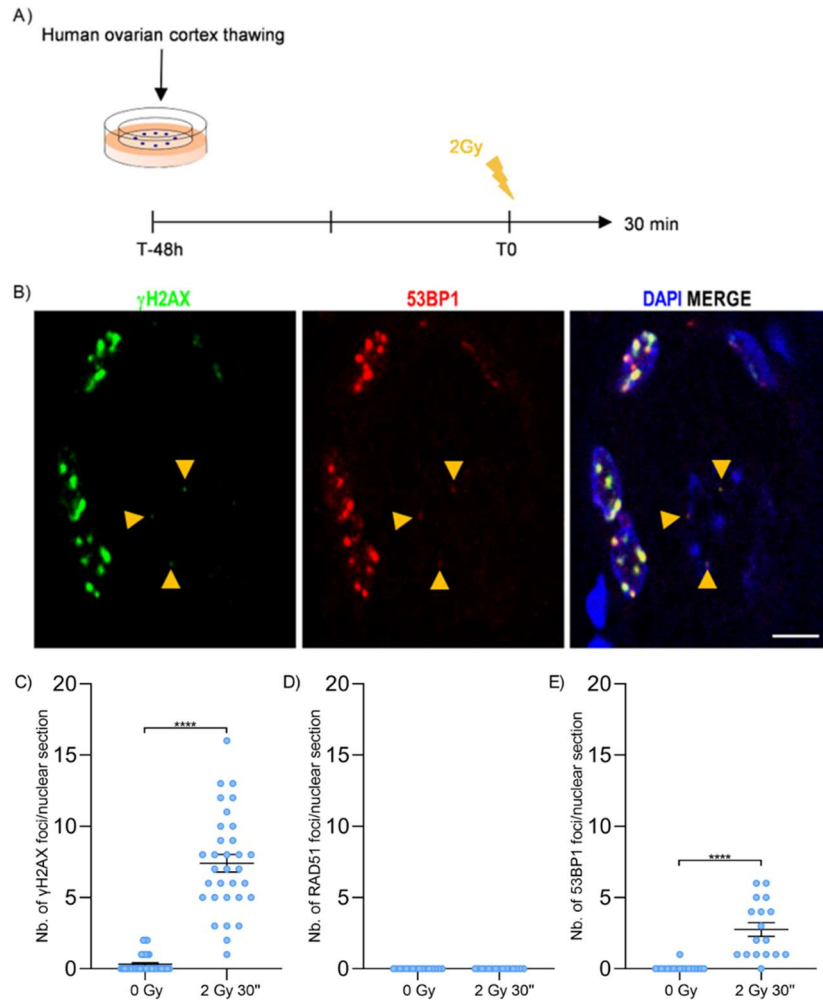


Figure 5: Oocytes nuclear DNA damage and double strand break DNA repair analysis in human (n=1). Scale bar for representative sections is 5 μ m.

A) Frozen human ovarian fragments were thawed and cut in short pieces inferior to 0.5 cm². They were then cultured in reverse drops for 2 days before being irradiated (2Gy) or not (0Gy). Analysis was performed 30 minutes after radiation exposure for patient 1 only.

B) Representative sections of ovaries immunostained for γ -H2AX (green), RAD51 (red) 30 minutes after being irradiated (2 Gy) or not (0 Gy). Yellow arrow heads show γ -H2AX foci. DNA is stained with DAPI (blue).

C) Quantification of γ -H2AX foci in nuclear section of PF oocyte in control and irradiated human ovarian tissue. Each point represents the number of γ -H2AX foci counted in the nucleus of one oocyte and 34 oocytes were analyzed for each group. **** $p \leq 0.0001$

D) Quantification of RAD51 foci in nuclear section of PF oocyte in control and irradiated human ovarian tissue. Each point represents the number of RAD51 foci counted in the nucleus of one oocyte and 16 oocytes were analyzed for each group.

E) Quantification of 53BP1 foci in nuclear section of PF oocyte in control and irradiated human ovarian tissue. Each point represents the number of 53BP1 foci counted in the nucleus of one oocyte and 18 oocytes were analyzed for each group. **** $p \leq 0.0001$

Discussion

The quality of surviving oocytes is an important issue for women that undergo RE and wish to conceive naturally. We show here that the DNA repair pathway use by the oocytes after RE switches from HR to NHEJ according to the follicular stage in mice. We also demonstrate that growing mouse oocyte survival after RE was dependent on the activation of c-NHEJ using oocyte conditional *Xlf* invalidation. Finally, we experimentally assessed ovarian reserve radiosensitivity in Human and confirmed its higher radioresistance compared to mouse. We also provide evidence that this human oocyte lower radiosensitivity is correlated to non-resective DSB repair pathway choice questioning genomic integrity of the female germline after RE.

The number of γ H2AX foci was higher in oocytes compared to somatic follicular cells in both non-irradiated and irradiated ovaries. One reason for the higher number of γ H2AX foci in oocyte nucleus could be its large size making it easier to identify separate foci albeit underestimation of γ H2AX foci in somatic cells could not solely explain the difference we found shortly after RE. Post-natal oocytes may be more prone to radioinduced DSB as they are arrested at the end of prophase I with twice as much genetic material compared to somatic cells that are mostly in G0/G1 phase. Thus, high DNA damage induction/signaling could be a specific feature of germ cells independently of the meiotic or mitotic process to ensure the activation of DNA repair mechanisms and potentially protect from hereditary risk.

The decrease of DNA damage signaling was delayed in post-natal oocytes compared to follicular somatic cells. Somatic cells are known to preferentially direct DSB towards NHEJ even in the G2 phase of the cell cycle when a sister chromatid is available (Her et Bunting 2018; Zhao et al. 2020). DSB Repair by NHEJ is a fast process, which can be completed within approximately 30 min, while HR is much slower and takes 7h or longer to complete (Mao et al. 2008). The fact that in all oocytes HR play a more important role in the repair of the DSBs could explain such a delay.

The difference of radiosensitivity observed between somatic cells and oocytes was primarily related to P63 expression that triggers apoptosis in PF oocytes (Suh et al. 2006; Livera et al. 2008; Bolcun-Filas et al. 2014). However GF oocytes also express this apoptotic mediator (Suh et al. 2006; Puy et al. 2021) and are much more radioresistant than PF oocytes suggesting that P63 expression cannot solely explain the strong difference of radio-sensitivity observed between PF and GF oocytes (Guigon et al. 2003; Adriaens, Smits, et Jacquet 2009; Puy et al. 2021). Upstream regulators of apoptosis have also been investigated in oocytes. DSB formation induces the activation of ATM by the MRN complex and subsequently the phosphorylation of Ckh2. Although lower levels of phospho-ATM (Stringer et al. 2020) and

phospho-Chk2 (Puy et al. 2021) were observed in GF oocytes compared to PF oocytes shortly after RE the differences were too small to explain the difference of radiosensitivity.

Because DSBs of PF are primarily targeted to HR, a large amount of resected end is formed rapidly after RE. This amount of ssDNA could massively trigger ATR, the ssDNA sensitive PI3 Kinase, phosphorylate Chk1 and stimulate apoptosis and explain the difference of sensitivity between PF and GF. Such hypothesis should be verified.

Stringer et al. previously used apoptotic deficient mice to show that PF oocytes were capable to complete repair of radioinduced DSBs through efficient HR. Our observation of numerous RAD51 foci and no 53BP1 foci in irradiated PF oocytes is well in frame with this report. On the other hand, we newly show that radioresistant GF oocytes engaged NHEJ to repair radio-induced DSBs. The complete absence of 53BP1 at the DSB site in small PF oocytes contrasted with its high recruitment in larger GF oocyte as well as in somatic follicular cells illustrating the use of different DSB repair pathways in PF and GF. Indeed, 53BP1 prevents DSB DNA ends from resection and directs their repair towards End Joining pathway. Using *Xlf* deficient mice, we demonstrate that c-NHEJ is active in GF oocytes and necessary to survive to a single 2 Gy RE. To the best of our knowledge, our work is the first to provide a clear demonstration of functional NHEJ in mammalian oocyte. Large oocytes in prepubertal mouse ovaries had therefore somatic-like response to DSB albeit HR was still present. The reason for oocyte to switch from HR to NHEJ remains unknown but may be related to oocyte growth and somatic environment change that occurs with PF activation.

The hereditary risk in the female germline has been poorly assessed yet. Stringer et al. found no increase in the mutation rate of the progeny from irradiated PF oocytes in apoptosis deficient mice, which is consistent with the use of HR, a more conservative pathway (Suh et al. 2006; Bolcun-Filas et al. 2014; Stringer et al. 2020). However, the initiation of NHEJ in GF questions the genomic integrity of oocytes after RE. c-NHEJ is an error prone repair pathway that could led to increase mutation rate in radioresistant oocytes. Only one study has exhaustively sequenced the progeny produced from irradiated GF oocytes and found a modest increase of mutations with small deletions (Sato et al. 2020). However, mating were performed immediately after RE indicating that the progeny came from preovulatory oocytes that we did not study here. At the genomic level, ploidy (Puy et al. 2021) and cytogenetic (Jacquet et al. 1997) defects were reported to increase in ovulated oocytes with increased fetal abortion rate (Puy et al. 2021) of subsequent pregnancies in rodents shortly after RE. Interestingly, c-NHEJ is known to induce translocations and ploidy defects in somatic cells (Guirouilh-Barbat et al. 2004; Piganeau et al. 2013). Such chromosomal rearrangements were also evidenced in tumors and referred as chromothripsis (Holland et Cleveland 2012; Jones et

Jallepalli 2012). We thus speculate that radio-induced chromosomal abnormalities could be related to c-NHEJ activation in radio-resistant mouse oocytes. Further studies are required to investigate the involvement of NHEJ in genomic instability in radio-resistant oocytes.

Our study supports the idea that GF mouse oocyte is a better model than PF oocytes to assess DNA repair and genetic instability as only radio-resistant oocytes are responsible for natural pregnancies after RE. In Human, natural conception was frequently reported at distance of RE to high doses which implies that PF human oocyte are less radiosensitive than mouse ones (Richards et al. 1990; Leung et al. 1991; Wallace et al. 2005) Previous retrospective clinical data estimated that their LD₅₀ could be inferior to 2Gy though inter-individual variation may occur and that this value corresponds to patients who underwent both chemotherapy and radiotherapy regimens (W. Hamish B. Wallace et al. 2005). Here we extend this data by demonstrating experimentally that human PF oocytes are poorly radiosensitive when compared to murine oocytes. Interestingly the fact that 53BP1 foci but no RAD51 foci are detected at DSB sites 30 minutes after RE to 2 Gy indicated that human PF oocyte did not engage yet HR as observed in mouse GF oocytes. Thus, NHEJ is likely to occur in human PF oocytes and this would be in line with their radiosensitivity being similar to GF mouse oocytes. Assuming that NHEJ is indeed the error prone pathway triggering aneuploidy and embryonic loss in mouse GF oocytes, this would imply a long-term risk for oocyte quality for women that had undergone radiotherapy with an increased risk of miscarriage. Up to now epidemiological studies have revealed no or minor change in the rate of miscarriage following radiotherapy protocols. However, it should be noted that early miscarriages such as these induced by most aneuploidies are under the radar of these studies.

The differences between DNA repair pathways activated after RE in mouse and human PF oocytes is intriguing. One may consider that these cells differ mostly by their age (ie decades in women, usually less than a year in mouse). How this species or age difference may change DNA repair mechanism is an open question.

Altogether our data provide new exciting insights in the initiation of NHEJ in the germline. Fine follow up of natural pregnancies after RE is warranted to state on the hereditary risk in the human female germline.

References

- Abercrombie, M. (1946) 'Estimation of nuclear population from microtome sections', *The Anatomical Record*, 94(2), pp. 239–247. doi:10.1002/ar.1090940210.
- Adriaens, I., Smitz, J. and Jacquet, P. (2009) 'The current knowledge on radiosensitivity of ovarian follicle development stages', *Human Reproduction Update*, 15(3), pp. 359–377. doi:10.1093/humupd/dmn063.
- Adriaens, I., Smitz, J. and Jacquet, P. (2009) 'The current knowledge on radiosensitivity of ovarian follicle development stages', *Human Reproduction Update*, 15(3), pp. 359–377. doi:10.1093/humupd/dmn063.
- Angenard, G. et al. (2010) 'Cadmium Increases Human Fetal Germ Cell Apoptosis', *Environmental Health Perspectives*, 118(3), pp. 331–337. doi:10.1289/ehp.0900975.
- Bolcun-Filas, E. et al. (2014) 'Reversal of female infertility by Chk2 ablation reveals the oocyte DNA damage checkpoint pathway', *Science (New York, N.Y.)*, 343(6170), pp. 533–536. doi:10.1126/science.1247671.
- Clark, R.A. et al. (2020) 'Predicting acute ovarian failure in female survivors of childhood cancer: a cohort study in the Childhood Cancer Survivor Study (CCSS) and the St Jude Lifetime Cohort (SJLIFE)', *The Lancet. Oncology*, 21(3), pp. 436–445. doi:10.1016/S1470-2045(19)30818-6.
- Findlay, J.K. et al. (2015) 'How Is the Number of Primordial Follicles in the Ovarian Reserve Established?', *Biology of Reproduction*, 93(5), p. 111. doi:10.1095/biolreprod.115.133652.
- Forand, A. et al. (2009) 'Similarities and Differences in the *In Vivo* Response of Mouse Neonatal Gonocytes and Spermatogonia to Genotoxic Stress¹', *Biology of Reproduction*, 80(5), pp. 860–873. doi:10.1095/biolreprod.108.072884.
- Gans, B., Bahary, C. and Levie, B. (1963) 'OVARIAN REGENERATION AND PREGNANCY FOLLOWING MASSIVE RADIOTHERAPY FOR DYSGERMINOMA. REPORT OF A CASE', *Obstetrics and Gynecology*, 22, pp. 596–600.
- Garcia-Velasco, J.A. et al. (2013) 'Five years' experience using oocyte vitrification to preserve fertility for medical and nonmedical indications', *Fertility and Sterility*, 99(7), pp. 1994–1999. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.02.004.
- Gougeon, A. (2010) 'Human ovarian follicular development: from activation of resting follicles to preovulatory maturation', *Annales D'endocrinologie*, 71(3), pp. 132–143. doi:10.1016/j.ando.2010.02.021.

Gravel, S. et al. (2008) 'DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection', *Genes & Development*, 22(20), pp. 2767–2772. doi:10.1101/gad.503108.

Guigon, C.J. et al. (2003) 'Unaltered Development of the Initial Follicular Waves and Normal Pubertal Onset in Female Rats after Neonatal Deletion of the Follicular Reserve', *Endocrinology*, 144(8), pp. 3651–3662. doi:10.1210/en.2003-0072.

Guirouilh-Barbat, J. et al. (2004) 'Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells', *Molecular Cell*, 14(5), pp. 611–623. doi:10.1016/j.molcel.2004.05.008.

Hamatani, T. et al. (2008) 'What can we learn from gene expression profiling of mouse oocytes?', *Reproduction (Cambridge, England)*, 135(5), pp. 581–592. doi:10.1530/REP-07-0430.

Her, J. and Bunting, S.F. (2018) 'How cells ensure correct repair of DNA double-strand breaks', *The Journal of Biological Chemistry*, 293(27), pp. 10502–10511. doi:10.1074/jbc.TM118.000371.

Holland, A.J. and Cleveland, D.W. (2012) 'Chromoanagenesis and cancer: mechanisms and consequences of localized, complex chromosomal rearrangements', *Nature Medicine*, 18(11), pp. 1630–1638. doi:10.1038/nm.2988.

Jacquet, P. et al. (1997) 'Cytogenetic effects of X-rays in the guinea pig female germ cells. I. The immature oocyte', *Mutation Research*, 391(3), pp. 189–192. doi:10.1016/s1383-5718(97)00071-5.

Jones, M.J.K. and Jallepalli, P.V. (2012) 'Chromothripsis: chromosomes in crisis', *Developmental Cell*, 23(5), pp. 908–917. doi:10.1016/j.devcel.2012.10.010.

Leung, S.F. et al. (1991) 'Ovarian ablation failures by radiation: a comparison of two dose schedules', *The British Journal of Radiology*, 64(762), pp. 537–538. doi:10.1259/0007-1285-64-762-537.

Livera, G. et al. (2008) 'p63 null mutation protects mouse oocytes from radio-induced apoptosis', *Reproduction*, 135(1), pp. 3–12. doi:10.1530/REP-07-0054.

Mao, Z. et al. (2008) 'Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells', *DNA Repair*, 7(10), pp. 1765–1771. doi:10.1016/j.dnarep.2008.06.018.

Marklund, A. et al. (2021) 'Reproductive Outcomes After Breast Cancer in Women With vs Without Fertility Preservation', *JAMA Oncology*, 7(1), p. 86. doi:10.1001/jamaoncol.2020.5957.

Mayeur, A. et al. (2021) 'Live birth rate after use of cryopreserved oocytes or embryos at the time of cancer diagnosis in female survivors: a retrospective study of ten years of experience', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* [Preprint]. doi:10.1007/s10815-021-02168-3.

Monniaux, D. et al. (2014) 'The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link?', *Biology of Reproduction*, 90(4), p. 85. doi:10.1095/biolreprod.113.117077.

Nimonkar, A.V. et al. (2011) 'BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair', *Genes & Development*, 25(4), pp. 350–362. doi:10.1101/gad.2003811.

Pan, H. et al. (2005) 'Transcript profiling during mouse oocyte development and the effect of gonadotropin priming and development *in vitro*', *Developmental Biology*, 286(2), pp. 493–506. doi:10.1016/j.ydbio.2005.08.023.

Piganeau, M. et al. (2013) 'Cancer translocations in human cells induced by zinc finger and TALE nucleases', *Genome Research*, 23(7), pp. 1182–1193. doi:10.1101/gr.147314.112.

Polishuk, Z. and Schreiber, H. (1956) 'The effect of x-rays on the ovaries in childhood and adolescence', *The British Journal of Radiology*, 29(348), p. 687. doi:10.1259/0007-1285-29-348-687.

Porras-Gómez, T.J. and Moreno-Mendoza, N. (2017) 'Neo-oogenesis in mammals', *Zygote*, 25(4), pp. 404–422. doi:10.1017/S0967199417000363.

Puy, V. et al. (2021) 'Mouse model of radiation-induced premature ovarian insufficiency reveals compromised oocyte quality: implications for fertility preservation', *Reproductive BioMedicine Online*, p. S1472648321003114. doi:10.1016/j.rbmo.2021.06.027.

Richards, M.A. et al. (1990) 'Adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in patients with axillary node-positive breast cancer: an update of the Guy's/Manchester trial', *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 8(12), pp. 2032–2039. doi:10.1200/JCO.1990.8.12.2032.

Roux, C. et al. (2010) 'Live birth after ovarian tissue autograft in a patient with sickle cell disease treated by allogeneic bone marrow transplantation', *Fertility and Sterility*, 93(7), p. 2413.e15-2413.e19. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.12.022.

Satoh, Y. et al. (2020) 'Characteristics of induced mutations in offspring derived from irradiated mouse spermatogonia and mature oocytes', *Scientific Reports*, 10(1), p. 37. doi:10.1038/s41598-019-56881-2.

Scully, R. et al. (2019) 'DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(11), pp. 698–714. doi:10.1038/s41580-019-0152-0.

Setiaputra, D. and Durocher, D. (2019) 'Shieldin – the protector of DNA ends', *EMBO reports*, 20(5). doi:10.15252/embr.201847560.

Stringer, J.M. et al. (2020) 'Oocytes can efficiently repair DNA double-strand breaks to restore genetic integrity and protect offspring health', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(21), pp. 11513–11522. doi:10.1073/pnas.2001124117.

Suh, E.-K. et al. (2006) 'p63 protects the female germ line during meiotic arrest', *Nature*, 444(7119), pp. 624–628. doi:10.1038/nature05337.

Vera, G. et al. (2013) 'Cernunnos deficiency reduces thymocyte life span and alters the T cell repertoire in mice and humans', *Molecular and Cellular Biology*, 33(4), pp. 701–711. doi:10.1128/MCB.01057-12.

Wallace, W.H.B. et al. (2005) 'Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries', *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, 62(3), pp. 738–744. doi:10.1016/j.ijrobp.2004.11.038.

Yu, X. and Chen, J. (2004) 'DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains', *Molecular and Cellular Biology*, 24(21), pp. 9478–9486. doi:10.1128/MCB.24.21.9478-9486.2004.

Yun, M.H. and Hiom, K. (2009) 'CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle', *Nature*, 459(7245), pp. 460–463. doi:10.1038/nature07955.

Zhao, B. et al. (2020) 'The molecular basis and disease relevance of non-homologous DNA end joining', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(12), pp. 765–781. doi:10.1038/s41580-020-00297-8.

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES :

Afin de s'assurer du fonctionnement de notre anticorps RAD51 dans l'ovocyte humain, j'ai pu travailler sur des ovaires de fœtus humains donnés à la Recherche grâce à une collaboration de longue date entre le Laboratoire de Développement des Gonades (LDG) et le planning familial de l'hôpital Antoine-Béclère (Autorisation Agence de Biomédecine, n° PFS 12-002). La xénogreffe d'ovaire fœtal humain avait été mise en place précédemment dans le LDG et m'a permis d'analyser la réponse à des CDBs radio-induites dans l'ovocyte avant le stade de fin de prophase I. Ainsi, nous avons utilisé la recombinaison homologue méiotique comme contrôle positif pour notre immunomarquage de RAD51. Certaines CGs présentaient bien un marquage RAD51 qui co-localisait avec γ H2AX trente minutes après irradiation à la dose de 2 Gy. Leur noyau est de taille plus grande que les cellules somatiques et elles ne sont pas entourées de cellules de la granulosa comme pour les FP. Néanmoins, nous n'avons pas encore pu caractériser s'il s'agissait bien de CGs par un marquage VASA. Après cette confirmation, un co-marquage P63 permettra de confirmer qu'il ne s'agit pas d'ovocyte au stade diplotène de prophase I.

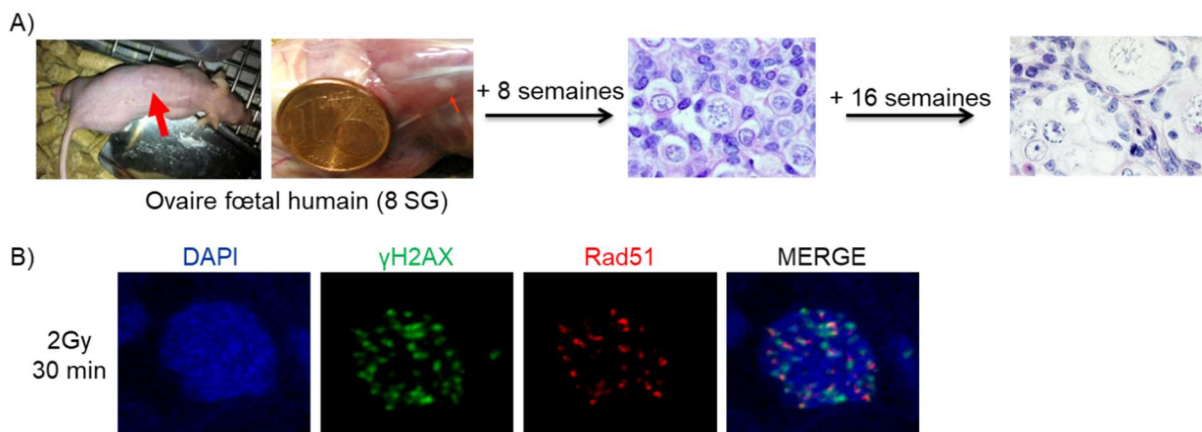


Figure complémentaire 1. Mise en évidence après irradiation de foci RAD51 dans des cellules ovariennes humaines xénogreffées chez la Souris.

A) Le modèle de la xénogreffe murine d'ovaire fœtal humain est pratiqué fréquemment par l'équipe du LDG (Poulain et al. 2014). Après recueil et détermination de l'âge gestationnel, les ovaires sont découpés en petits fragments puis greffés dans le muscle dorsal de souris nude anesthésiées, de part et d'autre de la colonne vertébrale. A un âge égal à 30 SG, les souris ont été irradiées *in toto* à la dose de 2 Gy puis sacrifiées trente minutes après. Les ovaires ont été ensuite fixés dans du formaldéhyde 4% et inclus. Ici, illustration à âge équivalent à 16 et 24 semaines de grossesses avec une fixation en Bouin afin de mieux identifier les CGs méiotique (d'après Poulain et al. 2014).

B) Immunomarquage γ H2AX-RAD51-DAPI de fragments ovariens humains xénogreffés, trente minutes après irradiation à la dose unique de 2 Gy.

DISCUSSION COMPLÉMENTAIRE

Au cours de ce travail, j'ai été confronté à plusieurs difficultés liées à mes modèles d'étude.

La première a été la mise au point de méthode pour faire fonctionner des anticorps qui n'avaient jamais été testés sur coupe de tissu ovarien. Malgré plusieurs tentatives d'optimisation (type de déparaffinage, choix du tampon de démasquage, optimisation des dilutions d'anticorps et des conditions d'incubation), la grande majorité n'était pas adaptée à un marquage sur coupes d'ovaire en formol. Pourtant, de nombreux acteurs du 'DNA repair' seraient importants à caractériser. Par exemple RPA, marqueur d'ADNsb, serait très utile pour analyser si une résection a eu lieu au niveau des foci γ H2AX qui ne colocalisent ni avec 53BP1 ni avec RAD51 trente minutes après irradiation dans le tissu humain. L'isolement des FP à partir des fragments ovariens pourrait être réalisé mais elle serait fastidieuse au vu du peu d'ovocytes présents. De plus, elle nécessiterait une mise en culture avec un inhibiteur de l'activation des FP (comme l'AMH) et changerait l'environnement direct du FP pouvant biaiser les résultats. Nous pourrions également évaluer notre matériel à un temps plus long (1-2h) après irradiation pour voir si RAD51 est chargé plus tardivement dans l'ovocyte humain irradié. Le marquage de BRCA1 et de DNA-PKCs chez la Souris fonctionne mais la quantification des foci est délicate et reste à faire. Elle devra être testée sur les ovocytes humains.

Lors de notre invalidation conditionnelle de *Xif* en utilisant VASA, nous avons eu des difficultés à obtenir des animaux *VasaCre+ Xif^{ff}* en nombre suffisant, ce d'autant que la pandémie a stoppé les mises en accouplement (et les expérimentations en général) pendant de nombreux mois. Ainsi certains lots d'animaux contrôles correspondant au fond génétique mixte utilisé sont toujours en cours de génération.

L'irradiation des fragments ovariens humains de recherche a également nécessité d'importantes mises au point. La plus grande difficulté a été le nombre limité voir l'absence d'ovocyte dans les fragments ovariens de recherche, notamment pour les patients 2 et 3 dont le bilan de fertilité échographique réalisé avant congélation était peu satisfaisant ($CFA \leq 5$). Au lieu de réaliser d'emblée les immunofluorescences pour lesquelles nous retrouvions trop peu d'ovocytes, nous avons donc d'abord identifié les coupes comprenant un noyau ovocytaire grâce à une coloration Hématoxyline-Eosine réalisée sur coupe formol toutes les 10 coupes.

Initialement, nous avons irradié les fragments ovariens humains seulement dans l'heure après décongélation (Figure complémentaire 2, protocole 1). Peu de marquage γ H2AX était présent dans les fragments non irradiés. À 30 minutes après irradiation 2 Gy, le signal γ H2AX était augmenté mais ne permettait pas une distinction suffisamment nette des foci pour une

quantification dans les noyaux ovocytaires. De plus, ce protocole n'était pas adapté pour évaluer la survie ovocytaire puisque la décongélation pouvait biaiser la survie ovocytaire après irradiation. En effet, la mort ovocytaire intervient entre 9 et 12h après un stress exogène cytotoxique (Hanoux et al. 2007). Nous avons donc décidé dans un deuxième protocole de cultiver les fragments ovariens 48 heures avant irradiation pour n'étudier que les ovocytes ayant résisté au cycle de congélation/décongélation (Figure complémentaire 2, protocole 2). Ce dernier ne semblait pas affecter de manière significative la survie ovocytaire. Puis chez le patient 1, nous n'avons pas constaté de baisse significative du nombre d'ovocytes entre le jour de la décongélation et celui de l'irradiation (groupe non irradié). Par contre la culture semble avoir un impact au bout de 4 jours puisque le nombre d'ovocytes retrouvés était significativement abaissé. Il faudra confirmer ce résultat chez d'autres patients et proposer une optimisation des milieux de culture pour les prochaines expérimentations suivant ce modèle de culture organotypique.

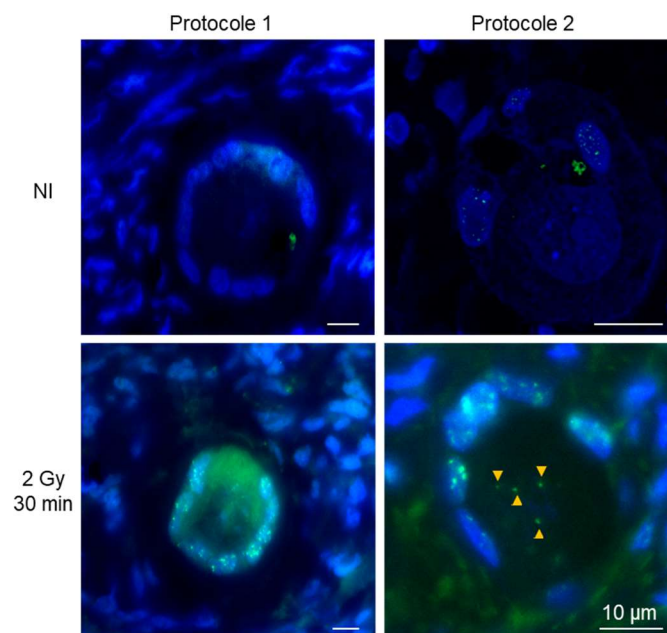


Figure complémentaire 2. Mise au point de méthode de l'immunomarquage (γ H2AX et DAPI) sur des fragments ovariens humains de recherche décongelés.

Dans le protocole 1, la fixation en formol a été réalisée dans l'heure suivant la décongélation. Dans le protocole 2, la fixation en formol a été réalisée après 48 heures de culture organotypique avec identification de foci γ H2AX individualisés après irradiation à la dose de 2Gy (flèches jaunes).

Avant de pouvoir soumettre cette étude, nous devons préalablement :

i) compléter l'étude du modèle d'invalidation conditionnelle de *Xlf^{fl/fl}* car il manque l'étude d'un groupe contrôle des souris *VasaCre+ Xlf^{fl/fl}*. Les souris *VasaCre* sont issues d'un fond mixte NMRI tandis que les souris *Xlf^{fl/fl}* sont des C57BL6N. Il nous faudra donc au minimum étudier le nombre d'ovocytes en croissance dans les ovaires de souris irradiées ou non, issues d'un croisement entre *VasaCre+* et C57BL6N.

ii) confirmer chez la Souris les résultats de radiosensibilité ovocytaire et de réparation de l'ADN obtenus *in vivo* dans le même système de culture organotypique que pour les prélèvements humains. J'ai réalisé cette expérimentation sur une dizaine de souris et les ovaires seront prochainement analysés. Il s'agit d'un contrôle indispensable pour lequel nous n'avons néanmoins pas réalisé de cycle de congélation/décongélation des ovaires car aucune étude n'a rapporté d'impact de ce dernier sur la survie ovocytaire murine.

iii) analyser 53BP1 et RAD51 chez au moins une autre patiente pour confirmer les résultats obtenus chez le patient 1.

Enfin, nous souhaiterions iv) pouvoir étudier le lien entre d'éventuelles anomalies chromosomiques et le NHEJ dans des fœtus de souris issus de mères irradiées avec mise en accouplement 10 jours après irradiation. En effet, le NHEJ peut stimuler des translocations et des aneuploïdies dans les cellules somatiques. Or, notre première étude a montré que dans l'ovocyte mature nous avons une augmentation du taux d'aneuploïdie. Une collaboration avec le LRP (Laboratoire de Radiopathologie, François Boussin et Christine Granotier Beckers) nous permettra d'analyser les anomalies cytogénétiques dans des fœtus irradiés à un terme antérieur à celui de l'obtention des fausses-couches (13,5 jpc). La mise au point de méthode a d'ores et déjà commencé et des métaphases sont interprétables à 8,5 jpc. Une analyse par caryotype et FISH nous permettra de caractériser les aberrations cytogénétiques dans les fœtus avortons et dans ceux viables. Enfin, nous répéterons cette analyse dans des fœtus issus de mère *Xlf -/-* irradiées afin de voir si le nombre d'anomalies diminue ce qui établirait pour la première fois un lien entre c-NHEJ et remaniement chromosomique transmissible dans la lignée germinale femelle. Une telle approche nous permettra de statuer sur le risque héréditaire du NHEJ au niveau génomique.

Partie 3

Étude de la fertilité femelle chez la Souris après exposition répétée à de faibles doses d'irradiation

Le parcours de soins des patientes en oncologie peut nécessiter la réalisation répétée d'examens d'imagerie et notamment de scanners. Il s'agit d'abord d'imageries à visée diagnostique puis, en cas de recours à la radiothérapie, de scanners à visée pré-thérapeutique. Un scanner dosimétrique permet de définir le champ d'irradiation et de limiter le dépôt d'énergie au niveau de l'organe cible. Enfin, avant chaque séance de radiothérapie, un scanner de positionnement (imageur portal) permet de s'assurer que l'irradiation thérapeutique est correctement délivrée. Cette exposition à de faibles doses, de l'ordre de quelques dizaines de milligrays, se fait sur une période de plusieurs semaines à raison de cinq jours par semaine. Elle peut concerner des cancers pour lesquels une PF féminine n'a pas été jugée nécessaire car le protocole thérapeutique en lui-même n'est pas gonadotoxique. Nous avons donc souhaité étudier pour la première fois l'impact d'irradiations à faibles doses répétées sur l'ovaire.

Les effets biologiques après des irradiations à faible dose ($<0,1\text{Gy}$) répétées ont très peu été étudiés. Elles ont un impact durable sur les cellules hématologiques mais uniquement dans un contexte inflammatoire (Rodrigues-Moreira et al. 2017). Aucune étude n'a montré d'effet sur la lignée germinale femelle avant ce travail.

Grâce à une collaboration au sein l'Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire (IRCM), j'ai pu participer au volet radiobiologie de l'étude Exposition Liée aux ImagerieS en rAdiothérapie (ELISA) qui s'intéresse aux impacts des faibles doses répétées sur les cellules souches hématopoïétiques chez la souris. J'ai ainsi pu étudier à la fois la radiosensibilité des ovocytes et la fertilité murine femelle dans le cadre de faibles doses d'irradiation répétées. Je présente ici les résultats préliminaires de ces travaux.

MESSAGES CLÉS :

Nous démontrons pour la première fois que l'exposition répétée à de faibles doses de RI a un impact majeur sur la fertilité femelle chez la Souris. De plus, de manière intéressante, la greffe de moelle osseuse (MO) ou l'injection de Granulocyte-Colony-Stimulating Factor (G-CSF) améliore la fertilité des souris irradiées de manière très significative.

Matériel et méthodes

Animaux et protocoles expérimentaux

Il s'agissait de souris C57BL/6J adultes (8 semaines) non-irradiées ou irradiées. Le protocole d'irradiations à faible dose répétées correspondait aux imageries embarquées de positionnement dans le cadre d'un traitement de cancer abdominopelvien (Figure 1). Un micro-irradiateur SARPP (rayons X) de basse énergie (140kV) a délivré 20 mGy cinq jours par semaine pendant cinq semaines consécutives pour une dose cumulée de 0,5 Gy.

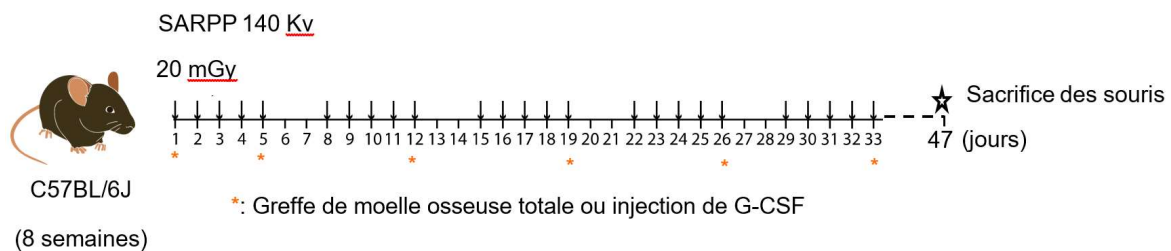


Figure 1 : Protocole d'irradiation

Une étude de la radiosensibilité ovocytaire a été menée 2 semaines après la dernière irradiation par analyse histologique (Figure 1). Puis, suivant le même protocole, une évaluation de la fertilité des souris a été réalisée par mise en accouplement un mois après la dernière irradiation (Figure 2).

Ces protocoles concernaient des souris irradiées (n= 9), des souris irradiées avec 6 greffes de moelle osseuse (n=7), des souris irradiées avec 6 injections de facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF, n=6), et des souris contrôles non irradiées (n=5).

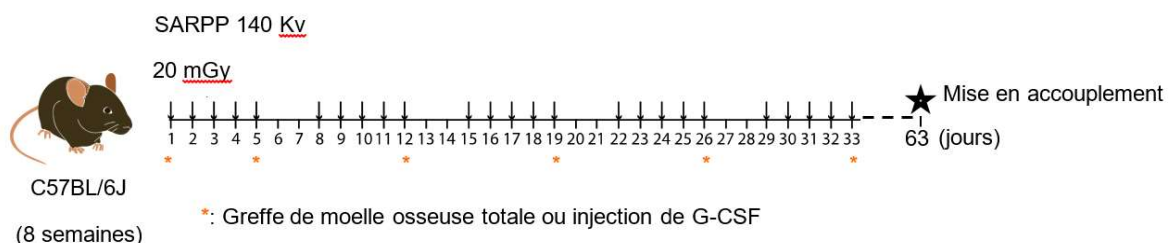


Figure 2 : Schéma expérimental pour l'étude de la fertilité des souris

Traitement des tissus et évaluation quantitative des follicules ovariens

Les ovaires ont été collectés, fixés dans du Bouin pendant 24 heures, déshydratés dans de l'alcool, inclus en paraffine, puis coupés en sections de 5 µm et colorés avec de l'hématoxyline-éosine-safran (HES). Les follicules ovariens ont été comptés toutes les dix sections en utilisant le noyau de l'ovocyte comme marqueur. Le stade de développement folliculaire a été déterminé comme décrit précédemment (G. Livera et al. 2008). Les follicules ont été classés en fonction de la forme et du nombre de couches de cellules somatiques entourant l'ovocyte : FP avec des cellules aplaties et follicules croissants (primaire avec une couche de cellules cuboïdales, secondaire avec deux couches de cellules, antral avec antrum). La formule d'Abercrombie a été utilisée pour corriger tout double comptage résultant de l'apparition d'une seule cellule dans deux sections successives (Abercrombie, 1946; Angenard et al., 2010).

Extraction et greffe de moelle osseuse totale

En condition d'aseptie stricte, 10 millions de cellules de MO ont été greffées par souris à chacune des 6 greffes.

Injection de G-CSF

A chacune des injections, 2,5 µg était injecté avant et après irradiation. Au total, 12 injections de G-CSF ont été réalisées par souris.

Résultats préliminaires

Étude de la radiosensibilité ovocytaire

Les irradiations répétées à faible dose éliminaient environ 90% de la réserve ovarienne (Figure 3) avec une diminution moindre mais significative des ovocytes en croissance. La greffe de MO améliorait significativement la survie des ovocytes de la réserve après irradiation ($p < 0.001$). Le G-CSF n'avait pas modifié le nombre d'ovocytes après irradiation.

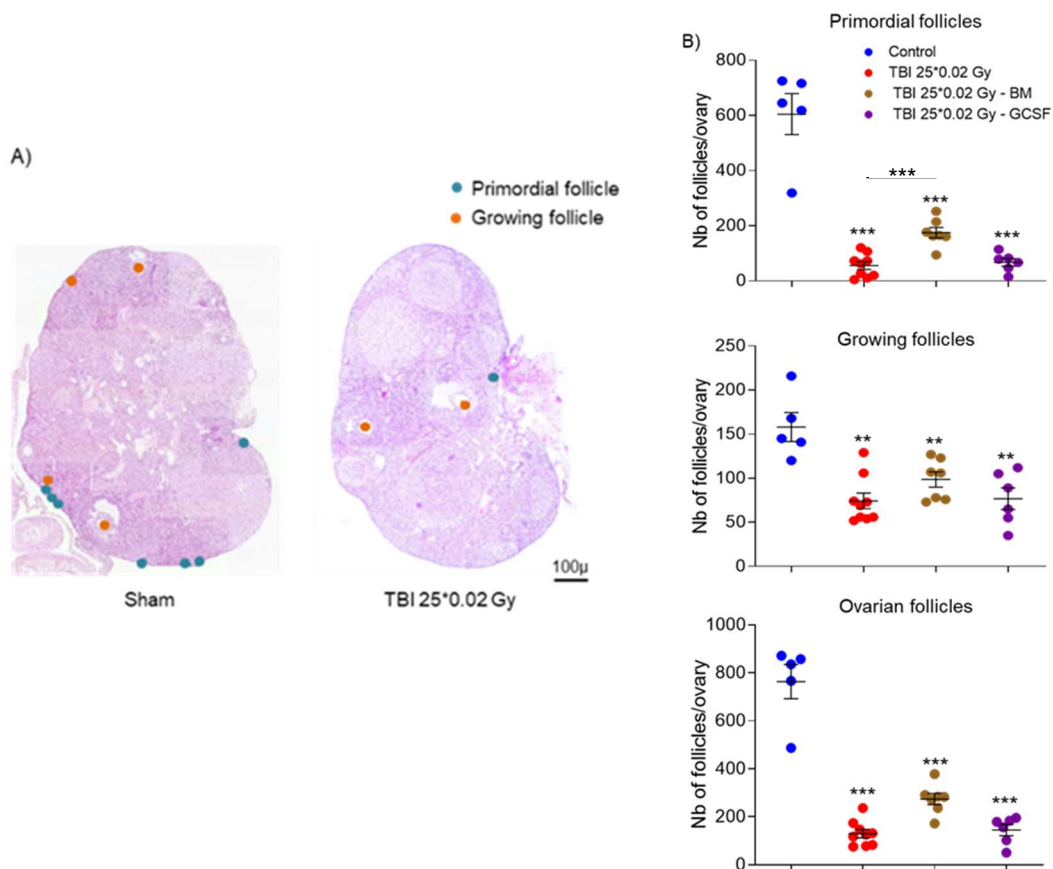


Figure 3: Effects of repeated low dose irradiations on oocyte survival.

A) Distribution of oocytes in HES stained sections of ovary from non-irradiated and irradiated mice (25*0.02 Gy). Primordial follicles, indicating ovarian reserve, (blue dot) shows higher radiosensitivity compared to growing oocytes (orange dot). Scale bar is 100 μm.

B) Quantification of mouse ovarian reserve and growing follicles one month after last radiation exposure. Only follicles containing oocytes with visible nucleus were counted. Lines depict mean value ± SEM. Two-tailed Mann-Whitney test was used with the threshold for statistical significance set to $p < 0.05$, to compare the irradiated groups with the sham treated group.

** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Etude de la fertilité

La fertilité des souris irradiées était drastiquement diminuée comparé aux souris femelles contrôles. Au-delà de 3 mois après la mise en accouplement, les souris irradiées étaient presque toutes stériles. Au contraire, les souris contrôles étaient fertiles jusqu'à 6 mois après la mise en accouplement (soit à un âge d'environ 10 mois). La greffe de MO ou l'injection de G-CSF permettait une augmentation de la fertilité des souris irradiées.

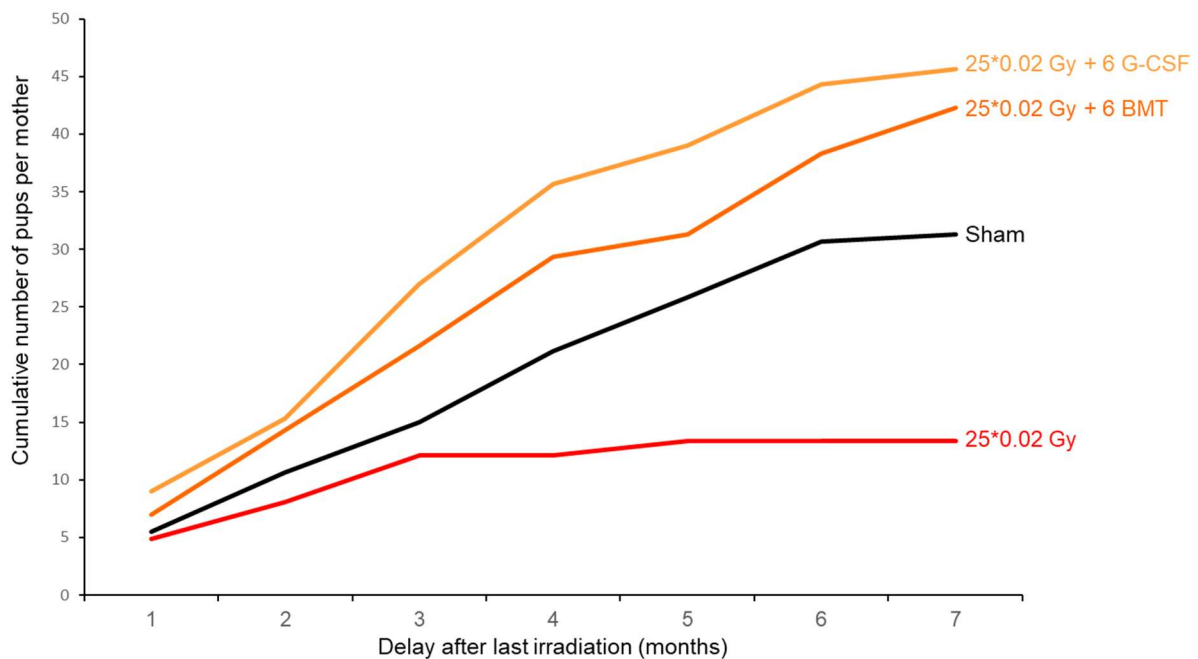


Figure 4: Female fertility assessment

Female mice (n=6 in each group) were mated with non-irradiated male one month after last radiation exposure.

Conclusions

- 1) Une exposition répétée à de très faibles doses peut drastiquement altérer la réserve ovarienne chez la Souris. Dans cette étude, il n'est absolument pas évident que des dommages à l'ADN puissent être mis en cause compte tenu des très faibles doses utilisées. L'identification des mécanismes impliqués et l'évaluation du risque pour les ovocytes humains devront être explorés.
- 2) L'effet des traitements, greffe de MO ou injection de G-CSF, est inattendu. Ces traitements ayant initialement été réalisés dans le but de pallier la fonction hématopoïétique qui a finalement été peu impactée par ce protocole d'irradiation. Dans le cas du G-CSF, il est très difficile de comprendre aujourd'hui comment la fertilité peut être restaurée alors que la réserve ovarienne a été très fortement entamée. Cette donnée indique donc que la réserve n'est qu'un des éléments concourant à la fertilité et qu'il est possible d'agir sur d'autres leviers.

Ces données étant préliminaires, nous avons fait le choix de ne pas les discuter plus avant.

Perspectives

Des approches préliminaires de comptage manuel et de quantification par transparisation ne montrent pas aujourd'hui d'amélioration de la survie des FP après injection de G-CSF deux semaines après irradiation. Les mécanismes impliqués sont donc probablement différents de la greffe de MO. Des analyses en cours ne semblent pas montrer de différence en termes de nombre de FP dans chacun des groupes irradiés à 4 mois et à 7 mois après irradiation. Un changement de rendement de la folliculogenèse à partir des ovocytes résiduels pourrait expliquer une telle amélioration de la fertilité après injection de G-CSF ou greffe de MO. L'analyse de souris non irradiées avec greffe de MO et de souris non irradiées avec injection de G-CSF est en cours pour évaluer si cet effet est indépendant de l'irradiation. L'effet du G-CSF, une molécule utilisable en clinique, est ici particulièrement attrayant et les mécanismes sous-jacents doivent être éclaircis pour considérer une éventuelle application.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

L'étude des effets d'agents génotoxiques comme les RI sur l'ovaire est un domaine de recherche passionnant dont les conséquences peuvent être multiples pour l'individu exposé (fonction endocrine, capacité reproductive) mais également pour l'intégrité génomique de sa descendance. Les objectifs de mon travail de thèse étaient i) de caractériser la radiosensibilité ovocytaire au cours de la vie post-natale, ii) d'étudier la qualité des ovocytes radiorésistants et enfin iii) d'analyser les mécanismes de prise en charge des CDBs de l'ADN par l'ovocyte post-natal. Nous souhaitons ainsi préciser par une approche expérimentale i) les indications de PF avant irradiation, mais aussi ii) les conditions de recours au matériel cryoconservé. Les résultats obtenus ont donné lieu à plusieurs communications ainsi qu'à la rédaction de deux articles (Annexes).

I/ La radiosensibilité ovocytaire

La radiosensibilité des ovocytes primordiaux qui constituent la réserve ovarienne est capitale à évaluer et à quantifier puisqu'elle est à l'origine d'une diminution de la fertilité avec le risque d'IOP.

Chez la Souris, nous avons démontré de manière expérimentale une forte baisse de la fertilité liée à une élimination rapide des ovocytes de la réserve ovarienne de manière similaire pour les RI de type X et gamma. En effet, la radiosensibilité de l'ovocyte de la réserve murine était très élevée puisque la DL50 était inférieure à 50 mGy. C'est une radiosensibilité unique chez les mammifères. Si l'on considère qu'un Gy induit environ une CDB par chromosome, la mort ovocytaire est déclenchée pour moins de deux CDBs par noyau. Celle-ci pouvait même se produire après exposition à un cumul de faibles doses (25*20mGy) similaire à celle reçue lors de prises en charge en oncologie (imagerie de positionnement). Cette extrême radiosensibilité est liée à l'activation de P63, exprimée après la naissance et considérée comme le gardien du génome de l'ovocyte (Suh et al. 2006; G. Livera et al. 2008). Nous n'avons pas trouvé cette faible tolérance aux dommages radio-induits chez l'Homme. Des différences dans l'ovogenèse peuvent expliquer les radiosensibilités différentes entre primates et Souris. La souris femelle est une espèce pluri-ovulante et a un cycle reproductif très court (19-21 jours) ce qui en fait l'un des mammifères femelles les plus prolifiques. Ces cycles reproductifs itératifs pourraient être plus à risque de transmettre une mutation à la descendance. Aussi, cela pourrait expliquer que la tolérance au risque héréditaire soit moindre dans cette espèce avec un seuil particulièrement abaissé pour l'apoptose radio-induite. Une autre explication est que les FP humains ont une durée de vie beaucoup plus longue ce qui a pu modifier leur capacité à résister à des stress exogènes. En effet, la folliculogenèse diffère entre les deux espèces notamment en période foetale avec une mise en place beaucoup plus précoce des FP et de la croissance folliculaire chez l'Homme. De plus, la durée de quiescence du FP chez l'Homme

peut être beaucoup plus longue (des dizaines d'années) que chez la Souris (quelques mois). Il serait intéressant d'étudier la radiosensibilité ovocytaire dans notre modèle de xénogreffe d'ovaires fœtaux pour conclure sur la possibilité d'un effet âge vis-à-vis de la radiosensibilité du FP humain. En effet dans ce modèle, il sera possible d'étudier des FP humains âgés seulement de quelques mois alors que les fragments d'ovaires adultes que nous avons utilisés avaient une moyenne d'âge de 359+/-3 mois.

Notre analyse comparative de radiosensibilité entre le modèle humain et le modèle murin montre que les FP murins ne constituent pas un modèle d'étude très adapté pour estimer le risque d'IOP chez la femme. En effet, leur extrême radiosensibilité induit une surestimation de ce risque. La plus forte radiorésistance des FP humains nécessitera toutefois que nous validions notre modèle de culture organotypique d'ovaire chez la Souris. En effet, les travaux dans le modèle murin ont été réalisés *in vivo* avec une irradiation 'corps entier' alors que les travaux sur les ovaires humains ont été réalisés à partir de fragments congelés, décongelés puis cultivés *in vitro* (et donc une irradiation de l'ovaire seul). Des données préliminaires non présentées dans ce manuscrit nous ont déjà permis d'observer une mort ovocytaire prononcée dans un modèle de culture d'ovaires murins. Ces données doivent être répliquées pour confirmer l'équivalence *in vivo/in vitro* de la radiosensibilité des ovocytes murins.

L'étude d'ovaires murins irradiés nous a par contre permis d'identifier les ovocytes en croissance comme étant un modèle d'étude pertinent de la fertilité résiduelle après exposition aux RI. En effet, dès le stade de follicule primaire, l'ovocyte devenait extrêmement radiorésistant. Cette différence de radiosensibilité avait déjà été rapportée (Baker 1971; Mazaud et al. 2002; Pesty et al. 2010) mais jamais étudiée pour des doses de plus de 6 Gy. Nous n'avons d'ailleurs pas pu quantifier la DL50 des ovocytes en croissance car elle est supérieure à 8Gy, dose à partir de laquelle la survie de la souris est mise en jeu notamment par des effets toxiques pour le système digestif murin. Ces ovocytes radiorésistants avaient une cinétique de folliculogenèse normale après exposition aux RI et pouvaient être ovulés en post-pubertaire comme précédemment rapporté chez le rat (Guigon et al. 2003). Il s'agit de la première vague de croissance folliculaire qui a des caractéristiques biochimiques particulières (production d'inhibine b, aromatasase) mais cela ne remet pas en question la différence de radiosensibilité entre le stade primordial et le stade de follicule en croissance que nous avons confirmé chez la souris femelle adulte à la dose de 2 Gy.

Ces résultats nous ont donc d'abord amené à réfléchir sur les mécanismes permettant d'expliquer comment une cellule au même stade de méiose mourrait en quiescence tandis qu'elle survivait à de fortes doses d'irradiation dès le stade de follicule primaire.

Il peut s'agir de différences d'expression de gènes régulateurs de l'apoptose. P63 est exprimé après la naissance à la fois dans les ovocytes de la réserve et dans ceux en croissance (Suh et al. 2006; G. Livera et al. 2008; Puy et al. 2021). Il pourrait exister une différence en termes d'activation de P63 qui n'a pas encore été analysée dans les ovocytes en croissance chez la Souris. En amont des gènes de la famille BH3, P53 est le principal gène suppresseur de tumeur des cellules somatiques. Il est également actif dans les ovocytes et ce pour des fortes doses d'irradiation de l'ordre de plusieurs grays (G. Livera et al. 2008; Bolcun-Filas et al. 2014). De manière intéressante, P53 est inhibé par l'activité de Murine double minute 2 (MDM2) au cours de la folliculogénèse ce qui pourrait expliquer la plus forte radiorésistance des ovocytes croissants. La surexpression de *Mdm2* entraîne l'ubiquitnylation et la dégradation par le protéasome de P53 et peut interférer avec les régulations transcriptionnelles de P53 (Marine et Lozano 2010). Or, l'interprétation de transcriptomes ovocytaires montre une augmentation significative de l'expression de *Mdm2* dans les ovocytes en croissance par rapport à ceux de la réserve ovarienne de plus de 35% (Ernst et al. 2018). L'invalidation de *Mdm2* dans les ovocytes en croissance dans un modèle murin conditionnel pour ZP3 a d'ailleurs permis de démontrer son rôle dans la régulation de la mort des ovocytes en croissance (Gabriel Livera et al. 2016). Toutefois, le rôle de *Mdm2* n'a jamais été exploré après irradiation. Il serait intéressant d'étudier des souris conditionnelles ZP3 hétérozygotes pour *Mdm2* pour voir si leurs follicules en croissance ont une radiosensibilité accrue. Ce serait une manière élégante de renforcer l'idée d'une transition de régulation de la mort ovocytaire radioinduite de P63 vers P53. Cela appuierait l'idée d'une réponse de type somatique aux RI des ovocytes après entrée en croissance.

Les facteurs régulateurs de l'apoptose en amont des gènes suppresseurs de tumeurs comme CHK2 et ATM jouent un rôle dans la mort ovocytaire radioinduite de FP mais à ce jour les différences modestes retrouvées chez la Souris ne permettent pas d'expliquer la plus forte radiorésistance des ovocytes en croissance. Dans des ovaires murins, l'invalidation de *Chk2* (Bolcun-Filas et al. 2014) ou l'inhibition de CHK2 (Coutandin et al. 2016) ont montré une survie ovocytaire de la réserve significative. Nous avons trouvé une augmentation d'intensité phospho-CHK2 dans tous les ovocytes après irradiation à 2 Gy et même si le signal était un peu moins élevé dans les ovocytes en croissance cela ne peut expliquer la différence radicale de radiosensibilité observée.

Le profil similaire de radiosensibilité des ovocytes croissants avec les cellules somatiques nous a amenés à faire l'hypothèse d'une prise en charge différentielle des cassures par différentes voies de réparation selon le stade de la folliculogénèse.

Nos résultats démontrent que la voie du NHEJ canonique participe à la survie des ovocytes radiorésistants tout comme pour les cellules somatiques.

Toutefois, l'élimination de la réserve ovarienne après irradiation n'est pas liée à un défaut de capacité de réparation puisque celle-ci est possible en inhibant l'apoptose (Stringer et al. 2020). L'ovocyte n'a tout simplement pas le temps de réparer les dommages à l'ADN et est envoyé directement à la mort. La voie du NHEJ est d'ailleurs plus rapide que la recombinaison homologue ce qui pourrait permettre une baisse des signaux pro-apoptotiques permettant la survie des ovocytes en croissance. Cependant ce n'est pas l'hypothèse la plus probable au vu de la cinétique de baisse de γ H2AX qui était lente dans tous les ovocytes comparativement à la lignée somatique.

De plus, des études transcriptomiques réalisées chez la souris ne montrent pas de différence dans l'expression des gènes liés au NHEJ entre ovocyte de la réserve et ovocyte en croissance (Ernst et al. 2018). La cause de la mort ovocytaire de la réserve est donc peut-être plutôt liée à sa forte capacité à engager la résection plutôt que dans l'incapacité à réaliser du NHEJ. En effet, RAD51 était massivement et rapidement observé comparé à une RH somatique (Badie et al. 2009). Cette plus grande activité de résection pourrait empêcher le NHEJ et constituer un signal de mort cellulaire. Nous pouvons donc poser l'hypothèse que dans ce modèle il existe une compétition entre NHEJ et RH qui soit arbitrée par la vitesse de résection au niveau des CDBs. Ainsi, il serait intéressant d'inhiber la résection dans les ovocytes de la réserve pour voir si cela autorise une activation du NHEJ et une meilleure survie à de fortes doses d'irradiation. Nous avons essayé d'utiliser PFMO1, inhibiteur de la fonction endonucléasique de MRE11 (Shibata et al. 2014), dans un système de culture organotypique d'ovaires de souris mais n'avons pas réussi à augmenter la survie des ovocytes de la réserve. Cependant, nous n'avons pas non plus réussi à vérifier l'efficacité de l'inhibiteur dans ce modèle semi-physiologique. Nous pourrions également utiliser une approche génétique avec un modèle invalidant cette étape de résection. De tels animaux seraient stériles par incapacité à réparer les CDBs méiotiques. Il faudrait donc les croiser avec des souris déficientes pour l'induction des CDBs méiotiques et permettant une survie ovocytaire comme les souris *Spo11* *-/-*. Récemment, il a été rapporté que la mutation ponctuelle RAD50E1035D pourrait empêcher la résection sans abolir totalement le NHEJ (Chansel-Da Cruz et al. 2020). L'utilisation d'un modèle murin *Rad50* *-/-* *Spo11* *-/-* est donc concevable.

D'autres facteurs intrinsèques à l'ovocyte peuvent expliquer la différence de radiosensibilité entre follicules quiescents et follicules en croissance chez la Souris. Les dommages radioinduits sont multiples et peuvent notamment entraîner une peroxydation des composants membranaires. Or, la croissance ovocytaire nécessite une production de lipides peut-être plus jeunes que ceux des ovocytes quiescents. Cela pourrait diluer l'effet de peroxydation lipidique dans les ovocytes en croissance. Les signaux pro-apoptotiques dans la réserve ovarienne pourraient être plus forts après irradiation du fait d'une taille cellulaire réduite entraînant une concentration plus importante d'espèces réactives de l'oxygène. La capacité transcriptionnelle

plus forte des ovocytes en croissance leur permettrait peut-être également de mieux faire face aux stress exogènes. Toutes ces hypothèses sont concevables mais relativement peu probables et surtout complexes à tester expérimentalement.

D'autre part, l'environnement somatique change après activation de la croissance ovocytaire. Ainsi, la mise en place de communications entre les cellules folliculaires (cellules de la granulosa) et l'ovocyte pourrait participer à diluer les signaux de mort cellulaire et à aider à une « mutualisation » des ressources pour la prise en charge des dommages radioinduits. Les ovocytes matures au stade de rupture de la vésicule germinale (GVBD) qui n'ont plus d'activité transcriptionnelle et ont perdu leur jonctions gaps suite au pic de LH ont d'ailleurs une radiosensibilité augmentée (Adriaens, Smitz, et Jacquet 2009). Cette hypothèse d'un effet de l'environnement sur la radiosensibilité germinale est attrayante et fait écho à d'autres travaux en cours au sein de l'équipe (lignée germinale mâle). Il faut cependant noter que des ovocytes isolés à 1 jpp conservent tous une forte radiosensibilité (Hanoux et al. 2007). Une irradiation d'ovocytes isolés à 8 jpp (stade présentant un nombre non négligeable d'ovocytes en croissance) permettrait de rapidement invalider ou confirmer l'hypothèse d'un effet de l'environnement somatique.

La question de la cause de la radiosensibilité différentielle des ovocytes chez la Souris demeure donc irrésolue. Cependant notre travail cherchait en premier lieu à évaluer les effets des RI sur les FP humains dont le stock définit la fertilité féminine après la naissance, contrairement aux follicules en croissance qui n'ont qu'un impact transitoire sur la fertilité. Notre approche expérimentale menée *in vitro* chez l'Homme démontre une radiorésistance des ovocytes de la réserve élevée comme pour les ovocytes en croissance murins puisqu'ils pouvaient survivre après une exposition à une forte dose d'irradiation (2 Gy). La notion d'ovocyte radiorésistant et les études rapportant des conceptions naturelles à distance de fortes doses d'irradiation chez la femme nous ont conduit à nous questionner autour du risque héréditaire après exposition de la lignée germinale femelle aux RI. Au cours de ce travail, nous avons donc cherché des modifications qualitatives transmissibles de l'ovocyte consécutives à l'exposition aux RI.

III/ Le risque héréditaire dans la lignée germinale femelle

La radiorésistance ovocytaire des ovocytes en croissance murin permet une évaluation aisée du risque héréditaire sans avoir recours à des lignées déficientes pour l'apoptose.

Des anomalies à l'échelle chromosomique

Chez la souris, nous avons montré un taux de fausses couches augmenté lors d'accouplement permettant d'évaluer la fertilité issue d'ovocytes irradiés au stade de follicule primaire chez l'adulte. Celui-ci était associé à un taux d'aneuploïdie augmenté avec notamment des monosomies. Tout comme dans les cellules somatiques, les irradiations peuvent donc engendrer des aberrations chromosomiques qui pour la majorité d'entre elles ont pour conséquence une mort fœtale *in utero*. Cela constitue une altération majeure de la fertilité naturelle de l'individu irradié.

Comment une irradiation post-méiotique peut-elle influencer la ségrégation chromosomique ?

Les aneuploidies ovocytaires peuvent dépendre de facteurs intrinsèques et extrinsèques.

Chez la femme, la première cause connue d'aneuploïdie est l'âge. En effet, la probabilité d'une grossesse trisomique chez une femme de 20 ans est de 2 %, cette probabilité passe à 35 % après trente ans (Herman et al. 2002; P. Hunt et Hassold 2010). L'âge avancé est d'ailleurs une indication de screening génétique en AMP dans de nombreux pays. En fin de prophase I, les chromosomes homologues sont alors maintenus ensemble par les CO, stabilisés aux sites d'échanges grâce aux cohésines. Il s'agirait d'une conformation stable permettant aux chromosomes de rester à ce stade jusqu'à l'ovulation qui se produit des mois plus tard chez la souris et des années plus tard chez la femme (Hartshorne et al. 2009).

Le non renouvellement des cohésines a été démontré comme mécanisme de survenue d'aneuploïdie lié à l'âge (Beverley, Snook, et Brieño-Enríquez 2021) bien que celle-ci soit probablement multifactorielle (Ma et al. 2020).

L'autre cause majeure d'aneuploïdie est la survenue de défauts au cours de la prophase I de méiose avec par exemple l'établissement d'un nombre inadapté de CO par bivalent, déséquilibrant la ségrégation chromosomique après ovulation.

Enfin, l'exposition *in utero* à des toxiques environnementaux comme le bisphénol A a été rapportée comme un facteur de risque d'aneuploïdie de manière dose dépendante (P. A. Hunt et al. 2003). En effet, ceux-ci altèreraient le déroulement du programme de la prophase méiotique.

L'aneuploïdie radio-induite peut quant à elle être générée grâce à une seule dose d'irradiation dans des proportions importantes puisque nous avons trouvé plus de 20% d'avortons par portée. A la dose de 2 Gy, il est peu probable que les dommages aient spécifiquement atteint les cohésines. Cependant, on ne peut exclure que des mécanismes de réparation de l'ADN à l'échelle du génome aient pu interférer avec le renouvellement des cohésines (par exemple réparation des bases oxydées).

Il paraît plus probable que des CDBs se soient « rejointes » créant un lien physique entre chromosomes non homologues à l'origine d'une mauvaise ségrégation. En effet, de tels chromosomes dicentriques risqueraient de créer des conflits de ségrégation. Comme nous avons retrouvé principalement des monosomies, il serait intéressant d'analyser les globules polaires pour vérifier la présence d'un nombre augmenté de chromosomes.

De futures études sont nécessaires pour mieux caractériser ces aneuploïdies et leur origine et rechercher des anomalies de structure qui pourraient être transmises à la descendance de mères irradiées. Elles nécessiteraient la réalisation de multi-FISH dans cette descendance. Cependant, la rareté des monosomies viables nécessiterait un grand nombre d'animaux à analyser avec un coût important. Nous avons initié une telle approche mais sur des foetus à un terme antérieur à celui des fausses couches. Cette approche nous permettra peut-être d'observer des monosomies non viables et nécessitera donc moins d'animaux.

Les effets mutagènes

Les effets mutagènes radio-induits sont supposés être aléatoires. Si l'on considère qu'environ une CDB survient par Gy d'irradiation, la probabilité d'engendrer une mutation dans une séquence codante de l'ovocyte est minime. De plus, une telle mutation serait très probablement hétérozygote, limitant la pénétrance clinique de mutations radio-induites à la première génération. Néanmoins à l'échelle de plusieurs générations, la reproduction de deux personnes porteuses si consanguinité (et apparentées) d'une telle mutation pourrait être révélatrice de pathologies génétiques récessives. C'est pourquoi bien qu'aucune étude ne rapporte de manière suffisamment robuste des conséquences transgénérationnelles à l'exposition aux RI, ce risque n'est pas à exclure et doit être recherché.

Nous avons choisi de traiter de l'instabilité génétique femelle de manière indirecte par l'étude des voies de réparation des CDBs à des temps courts après irradiation. En effet, le choix de la voie de réparation est crucial puisque le NHEJ est moins fidèle lorsqu'il n'est pas programmé comparativement à la voie résective de la RH.

Dans l'ovocyte, nous nous attendions à un engagement massif et exclusif dans la résection pour deux raisons :

- il est issu d'un programme méiotique où il est réparé par la RH méiotique. Il garde d'ailleurs trace de cet évènement avec la présence persistante des CO nécessaires à la bonne ségrégation chromosomique après ovulation.
- il est post-répliatif, la présence des chromatides sœurs favorisant une réparation par RH par analogie avec les cellules somatiques.

Dans les ovocytes quiescents, nous avons effectivement retrouvé un chargement précoce de RAD51 témoin d'une extension de la résection très rapide. L'absence de DMC1 confirmait qu'il s'agissait d'une recombinaison homologue non méiotique impliquant les chromatides sœurs. Cette voie de réparation est considérée comme fidèle mais nous n'avons pas pu étudier la descendance issue d'ovocytes de la réserve ovocytaire irradiée. Ce travail a été réalisé récemment par whole genome sequencing dans un modèle *P63* *-/-* qui montre un taux de mutations moins important que dans des ovocytes sauvages (Stringer et al. 2020). Ainsi, en absence d'apoptose radio-induite, la réparation par RH peut être finalisée et semble effectivement fidèle sans impact majeur sur la descendance. Une des limites à cette approche est que l'inactivation de *P63* ne permet de sauver que les ovocytes primordiaux et pour des doses d'irradiation inférieures à 0,5 Gy. Aussi, le nombre de CDBs radioinduites peut être trop faible pour pouvoir détecter un effet mutagène des irradiations. Il serait intéressant d'effectuer la même expérience à des doses plus fortes dans un modèle *Puma* *-/-* *Noxa* *-/-* qui permettrait la survie des ovocytes quiescents. Ainsi nous pourrions définitivement confirmer la stabilité génétique de la RH post-natale des ovocytes de la réserve chez la Souris.

Nous avons démontré l'implication du NHEJ canonique dans la radiorésistance des ovocytes en croissance chez la Souris. Nous supposons donc que l'instabilité génétique dans ceux-ci est plus grande comparativement aux ovocytes de la réserve ovarienne qui utilisent la voie de la RH (Stringer et al. 2020). Cependant, une étude de séquençage de tout le génome serait nécessaire pour confirmer cette hypothèse. En utilisant des souris consanguines C57BL6, nous pourrions comparer les séquences de la descendance de mères irradiées ou non et les comparer avec celles des parents (analyse en trio, papa, maman, bébé) pour la recherche de mutation *de novo*. L'interprétation des données d'un tel séquençage est difficile et coûteuse. Enfin, en dehors de l'ADN nucléaire, les mitochondries de l'ovocyte qui sont conservées après fécondation possèdent également de l'ADN dont l'intégrité pourrait également être questionnée après exposition aux RI.

III/ Les modèles d'études

La radiosensibilité des ovocytes primordiaux est capitale à évaluer et à quantifier puisqu'elle est à l'origine d'une diminution de la fertilité avec le risque d'IOP. Néanmoins il apparaît qu'au vu de leur extrême radiosensibilité, les FP de la Souris induisent une surestimation de ce risque par rapport au modèle humain et ne constituent donc pas un modèle d'étude très adapté.

Le choix du modèle murin pour l'étude de la radiobiologie de l'ovocyte post-natale.

L'ovogenèse murine diffère grandement de celle des primates et la radiosensibilité ovocytaire est différente puisqu'elle est plus forte que chez l'Homme (Adriaens, Smitz, et Jacquet 2009; Winship et al. 2018). L'étude de biopsies d'ovaires de singe aurait peut-être été un modèle plus pertinent concernant la radiosensibilité ovocytaire (Adriaens, Smitz, et Jacquet 2009). Ils ont une ovogenèse plus comparable à celle de la femme car la méiose est initiée de manière asynchrone et la folliculogénèse débute également avant la naissance. De plus, il s'agit d'espèces mono-ovulantes et dont les cycles sont plus longs que chez la Souris, permettant une meilleure comparaison en termes de dynamique de folliculogénèse. Enfin elle aurait permis l'étude d'un ovocyte ayant une durée de vie plus longue comparativement à la Souris. En effet, les ovocytes murins peuvent persister plusieurs mois dans un ovaire adulte tandis que chez les primates, leur durée de vie à l'état quiescent peut être de plusieurs dizaines d'années. Toutefois au-delà des limites éthiques à l'utilisation d'un tel modèle, il est très difficile d'étudier la radiosensibilité des ovocytes à l'échelle de l'ovaire entier chez le singe femelle ou chez la femme. Nous avons d'ailleurs eu de grandes difficultés à obtenir suffisamment d'ovocytes à analyser concernant la prise en charge des CDBs radioinduites du fait de l'hétérogénéité de leur répartition au sein d'un organe de grande taille.

C'est donc notamment pour des raisons de facilité d'accès et de précision de l'évaluation de la radiosensibilité ovocytaire que nous avons initialement choisi le modèle murin en période pré-pubertaire. De plus, le modèle murin permet une maîtrise des fonds génétiques et des croisements plus rapides entre des lignées mutantes. Nous espérons ainsi qu'à terme le modèle murin nous facilitera l'étude des mécanismes de réparation de l'ADN et la mise en place d'approches de séquençage.

Les dérivés de cellules souches pour l'étude de la lignée germinale femelle

Pour effectuer une véritable approche quantitative de la radiosensibilité ovocytaire dans la lignée germinale femelle humaine, il faudra probablement attendre des avancées significatives dans l'utilisation des cellules souches. La genèse de CGPs *in vitro* par la différenciation d'ES ou d'IPS permettent d'obtenir une descendance chez la souris (Hayashi et Saitou 2013). Récemment, chez l'Homme, des ovogonies ont pu être obtenues *in vitro* à partir d'IPS (K. Sasaki et al. 2015; Yamashiro et al. 2018) mais il reste encore de nombreuses étapes avant de pouvoir travailler sur des ovocytes ayant atteint le stade diplotène de méiose et initié une folliculogenèse (Hong et al. 2021). Un tel modèle pourrait offrir 'une source' *in vitro* d'ovocytes humains pour la recherche, des cellules potentiellement porteuses de mutations (patientes) ou manipulables génétiquement (édition du génome). Évidemment, au-delà du challenge technique, l'utilisation d'une telle ressource pour faire progresser la connaissance autour des cellules permettant la perpétuation de notre propre espèce se doit d'être solidement encadrée.

IV/ Perspectives

De nouveaux outils de recherche

Ce projet a été initié après mon arrivée dans le Laboratoire et a permis de développer de nouvelles techniques comme la transposition ovarienne ou la culture organotypique en goutte inversée de fragments ovariens humains de Recherche. Cette dernière nous a permis pour la première fois une approche expérimentale de radiobiologie sur des ovocytes humains et pourra être utilisée à d'autres fins comme l'étude de reprotoxiques en toxicologie ou le développement de substances fertoprotectrices.

D'un point de vue fondamental

L'étude du follicule ovarien constitue un modèle particulièrement intéressant puisqu'il permet de comparer les cellules somatiques folliculaires aux ovocytes à la fois dans des conditions de quiescence (follicule primordial) et lors d'activité métabolique intense (croissance folliculaire). Nos travaux posent de multiples questions dans le domaine de la radiobiologie de l'ovocyte. En voici trois pour lesquelles nous avons prévu des expérimentations :

Quelle est la cause du 'switch' entre RH et NHEJ dans l'ovocyte ?

L'absence complète de 53BP1 au site de CDB dans les petits ovocytes de la réserve ovarienne contrastait avec son recrutement élevé dans les ovocytes GF plus grands ainsi que dans les cellules folliculaires somatiques. Nous n'avons pas trouvé de différence dans le recrutement de BRCA1 dans les deux types d'ovocytes malgré les difficultés à évaluer cette protéine surtout *in vivo* par des approches d'immunomarquage (données non montrées). Les modifications post-traductionnelles des histones telles que l'ubiquitination de la lysine 15 de H2A (H2A15ub) et la méthylation de la lysine 20 de H4 (H4K20me) sont connues pour favoriser le recrutement de 53BP1 au niveau de la CDB (Becker et al. 2021) et pourraient constituer une perspective intéressante pour explorer plus avant le choix de la voie de réparation des CDBs de l'ADN dans l'ovocyte. Actuellement, il n'est pas connu si ces modifications épigénétiques sont associées à la croissance folliculaire et ce point méritera d'être éclairci afin de statuer sur une éventuelle régulation épigénétique du contrôle du mode de réparation des CDBs ovocytaires.

Des modifications post-traductionnelles de 53BP1 pourraient également entraîner une perte de fonction de ce dernier dans les ovocytes de la réserve. Il a par exemple été démontré que la phosphorylation de sa partie C-terminale par la Polo-like kinase 1 (PLK1) empêche le recrutement de 53BP1 au site de cassure pour des cellules somatiques en phase mitotique

(Benada et al. 2015). Or l'expression de l'ARNm de *Plk1* est nettement plus élevée (plus de 30 fois) dans les ovocytes de la réserve par rapport à ceux en croissance (Ernst et al. 2018). Il s'agit donc d'une piste intéressante pour expliquer le non recrutement de 53BP1 et l'engagement dans la résection. Il serait intéressant d'exposer des ovaires murins au volasertib, un inhibiteur de PLK1 (Van den Bossche et al. 2019) ou d'utiliser un modèle murin KO conditionnel pour *Plk1* (Little et Jordan 2020), pour voir si l'on permet un recrutement de 53BP1 dans l'ovocyte primordial, trente minutes après irradiation.

Existe-t-il un lien entre NHEJ et anomalies chromosomiques radio-induites dans l'ovocyte ?

Nous devons dans un premier temps caractériser les aberrations chromosomiques radio-induites dans l'ovocyte post-natal. Une mise au point de méthode a été initiée dans ce sens pour étudier par caryotype et FISH des fœtus issus de mères irradiées grâce à une collaboration avec une équipe voisine (le Laboratoire de RadioPathologie (LRP) : Christine Granotier Beckers, François Boussin). Cette approche devrait permettre de préciser les remaniements chromosomiques présents dans les fœtus issus des ovocytes irradiés ; les fœtus étant analysés avant que la mort embryonnaire ne survienne. De telles anomalies pourraient être en lien avec le NHEJ canonique comme c'est le cas dans des lignées cellulaires somatiques. Pour valider cette hypothèse, nous pourrions effectuer une analyse par FISH sur des fœtus issus de mères irradiées invalidées pour *Xlf*. Ceci pourrait démontrer formellement que le NHEJ est la cause d'anomalies chromosomiques héréditaire ou permettre d'exclure cette hypothèse.

Quel(s) est (sont) les mécanismes d'action du G-CSF et de la greffe de moelle osseuse impliqués dans l'amélioration de la fertilité de souris irradiées à un cumul de faible dose ?

Des approches préliminaires de comptage manuel et de quantification par transparisation ne montrent pas aujourd'hui d'amélioration de la survie des FP à 2 semaines, 4 mois et 7 mois après irradiation (25*20 mGy). Un changement de rendement de la folliculogenèse à partir des ovocytes résiduels pourrait expliquer une l'amélioration de la fertilité que nous avons observés après irradiation en cas d'utilisation de l'injection du G-CSF ou de la greffe de MO. L'effet du G-CSF, une molécule utilisable en clinique, est ici particulièrement attrayant et les mécanismes sous-jacents doivent être éclairci pour considérer une éventuelle application. L'utilisation de souris invalidées pour le récepteur du G-CSF, colony-stimulating factor 3 receptor (*Csf3r*) serait une approche intéressante pour étudier son impact sur la dynamique de la folliculogenèse et l'atrésie. En effet en irradiant des souris *Csf3r* *-/-* à la dose de 2 Gy, nous pourrions suivre avec précision si le nombre de follicules en croissance voir de corps

jaunes est augmenté ou pas par rapport à des souris sauvages. Notons cependant que ce travail est actuellement très préliminaire, notamment du fait de la lourdeur et complexité du modèle *in vivo*, et qu'une limite majeure demeure l'absence de démonstration d'un effet strictement au niveau de l'ovaire.

D'un point de vue clinique

Les données de la littérature actuelle concernant le risque héréditaire de la lignée germinale femelle sont très peu nombreuses. La plupart sont rassurantes ne retrouvant pas de sur-risque mutagène ou bien à des taux nettement inférieurs que dans la lignée mâle. Toutefois, il s'agit quasiment toujours d'approches non exhaustives et aucune donnée robuste n'est rapportée chez la femme (cf. introduction).

Les grossesses naturelles de patientes ayant été exposées à des traitements gonadotoxiques n'ont étonnamment aucun suivi médical particulier à ce jour. Chez la Souris, nous avons montré que des ovocytes radiorésistants (en croissance) survivaient à l'irradiation grâce au NHEJ et avait un taux d'aneuploïdie augmenté après ovulation. Ce dernier est probablement la cause de la forte létalité embryonnaire observée après fécondation. Chez la femme nous avons montré que les FP humains sont radiorésistants et que l'ovocyte primordial recrute un acteur pro-NHEJ (53BP1) après irradiation. Par analogie avec la Souris, l'exposition des ovaires humains à des RI pourrait donc augmenter le risque de fausses couches. Ce risque a fait l'objet d'études après irradiation chez la femme mais aucun surrisque n'a été clairement démontré (Auvinen et al. 2001). Cependant, les monosomies entraînent des fausses couches très précoces et la femme ne sait souvent même pas qu'elle est enceinte. Il serait intéressant de suivre les grossesses naturelles de patientes ayant été exposées à des substances génotoxiques notamment par un bilan hormonal comprenant l'HCG pour détecter des fausses couches précoces.

Au-delà du risque d'arrêt précoce de grossesse et de ces conséquences psychologiques, arriver à concevoir après exposition à des RI pourrait être à risque de transmission de mutations.

Une approche intéressante chez la femme serait de questionner les personnes porteuses de monosomie ou de translocations quant à l'exposition éventuelle de leur mère à des traitements génotoxiques sources de CDBs de l'ADN. Cette étude nous permettrait de manière rétrospective d'évaluer le risque héréditaire à l'échelle chromosomique. La seule monosomie complète viable chez l'Homme est le syndrome de Turner (45, X0) et nous avons prévu de réaliser une enquête afin de déterminer si une corrélation existe entre la survenue de ce syndrome et un antécédent d'expositions à des génotoxiques chez la mère de la femme atteinte. Pour les translocations, un questionnaire semblable chez des patients pris en charge

pour diagnostic pré-implantatoire cytogénétique pourrait également être une approche intéressante.

Le recueil prospectif de matériel génétique à but de recherche (cheveu, salive) avant PF permettrait une étude comparative des séquences d'ADN avec la descendance dans le cadre soit d'une conception naturelle soit d'une utilisation du matériel cryoconservé. Certaines patientes ont d'ailleurs obtenu des enfants des deux manières ce qui permettrait une détection plus aisée d'éventuels effets mutagènes.

Enfin, il faudra développer le recrutement de matériel humain de Recherche. Le don à la recherche de fœtus féminins issus d'IVG/IMG est particulièrement intéressant car les ovaires recueillis présentent une grande densité d'ovocytes. De plus avec notre modèle de xénogreffe, ils permettent une étude des ovogonies, des FP et d'ovocytes entrés en croissance basale. Il sera donc important de développer des liens avec des plannings familiaux et des centres d'AMP pour accéder à des ovocytes pour fin de recherche et ainsi approfondir les connaissances de la radiobiologie ovocytaire.

V/ Implications pour la pratique médicale

Notre travail souligne l'importance de la PF dans le parcours de soins des patientes en amont de tout traitement génotoxique pouvant exposer les ovaires.

Il met en avant la notion de qualité ovocytaire et pose la question du risque héréditaire dans la lignée germinale femelle. La démonstration d'un lien entre NHEJ et anomalie chromosomique transmissible nous permettrait de confirmer définitivement ce risque. Il s'agit donc d'une priorité. Cela aurait pour conséquence de revoir les pratiques actuelles en préservation de la fertilité et notamment i) de limiter les cycles de PF féminine après traitement génotoxique et ii) de privilégier l'utilisation des gamètes cryoconservés avant traitement plutôt qu'une conception naturelle. Il propose une réflexion sur la notion d'altération de la qualité du gamète indépendamment de la fertilité résiduelle.

Pourquoi privilégier une conception à partir du matériel de PF plutôt qu'une conception naturelle à distance de traitements génotoxiques ?

Les arguments en faveur d'un tel choix sont multiples :

- les patientes ont subi une intervention chirurgicale lourde pour préserver des ovocytes avant traitement qu'il serait dommage de ne pas utiliser, ce d'autant qu'ils ne pourront pas faire l'objet d'un don à un autre couple en cas de non

utilisation. En effet, en France, dans le cadre de pathologies oncologiques, les ovocytes non utilisés peuvent être soit détruits soit donnés à la Recherche.

- un cycle de réchauffement ovocytaire pour mise en fécondation et potentiel transfert embryonnaire est une prise en charge simple et peu invasive. Elle est également rapide et ne retarde pas une conception naturelle en cas d'échec.
- les ovocytes cryoconservés sont plus jeunes et ont probablement un potentiel évolutif meilleur avec un risque moindre d'aneuploïdie et de fausses couches. Cela est particulièrement vrai pour des femmes de plus de 35 ans dont le projet parental est décalé de plusieurs années après leur rémission.
- les ovocytes cryoconservés avant traitement sont indemnes de tout effet iatrogène lié aux traitements gonadotoxiques (chimiothérapie, radiothérapie) de leur pathologie. La mise en évidence de 53BP1 trente minutes après irradiation de la réserve ovarienne humaine suggère que la voie de la RH n'est pas celle exclusivement privilégiée par l'ovocyte post-natal. Bien que des études complémentaires soient nécessaires pour démontrer l'implication du NHEJ dans l'ovocyte post natal chez l'Homme, nos résultats préliminaires questionnent l'intégrité génétique de l'ovocyte humain après irradiation.

A l'inverse diverses motivations peuvent expliquer le choix ne pas vouloir recourir en première intention aux ovocytes cryoconservés :

- le désir de ne pas avoir une conception médicalisée.
- garder des ovocytes jeunes seulement pour maximiser le succès d'un projet parental supplémentaire plus tardif.
- le manque de preuves scientifiques d'altération de l'intégrité génétique ovocytaire consécutivement à l'exposition aux traitements gonadotoxiques.
- les risques qualitatifs éventuels liés au cycle de congélation/décongélation des ovocytes bien que le recul clinique sur cette pratique soit bon.
- une vision purement quantitative de la fertilité féminine, le seul risque dont elles aient été informées étant la survenue d'une IOP.

En pratique, il est probable que les patientes prennent surtout en considération ce dernier point. Ainsi, de manière arbitraire, 18 à 24 mois après la fin de leur traitement, c'est la conception naturelle qui leur est actuellement conseillée en première intention en cas de projet parental.

Une discussion avec les équipes d'oncologie permettrait d'évoquer le risque héréditaire et la pratique du réchauffement ovocytaire pour rassurer sur la simplicité de cette prise en charge. L'information des patientes pourrait être améliorée en évoquant le risque potentiel de

modification de qualité du gamète bien que les études actuelles soient encore contradictoires. Il s'agit avant tout de personnaliser cette information selon le niveau de risque de leur traitement vis-à-vis de l'intégrité de leur lignée germinale.

BIBLIOGRAPHIE

- Abby, Emilie, Sophie Tourpin, Jonathan Ribeiro, Katrin Daniel, Sébastien Messiaen, Delphine Moison, Justine Guerquin, et al. 2016. « Implementation of Meiosis Prophase I Programme Requires a Conserved Retinoid-Independent Stabilizer of Meiotic Transcripts ». *Nature Communications* 7 (1): 10324. <https://doi.org/10.1038/ncomms10324>.
- Abel, M. H., A. N. Wootton, V. Wilkins, I. Huhtaniemi, P. G. Knight, et H. M. Charlton. 2000. « The Effect of a Null Mutation in the Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene on Mouse Reproduction ». *Endocrinology* 141 (5): 1795-1803. <https://doi.org/10.1210/endo.141.5.7456>.
- Abercrombie, M. 1946. « Estimation of Nuclear Population from Microtome Sections ». *The Anatomical Record* 94 (2): 239-47. <https://doi.org/10.1002/ar.1090940210>.
- Adams, Ian R., et Anne McLaren. 2002. « Sexually Dimorphic Development of Mouse Primordial Germ Cells: Switching from Oogenesis to Spermatogenesis ». *Development (Cambridge, England)* 129 (5): 1155-64.
- Adriaens, I., J. Smitz, et P. Jacquet. 2009. « The Current Knowledge on Radiosensitivity of Ovarian Follicle Development Stages ». *Human Reproduction Update* 15 (3): 359-77. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn063>.
- Agence de la Biomédecine. 2019. « Activité d'Assistance Médicale à la Procréation 2019 (Agence de la Biomédecine) ». P.73-87. https://rams.agence-biomedecine.fr/sites/default/files/pdf/2021-08/ABM_PEGH_AMP2019_6.pdf.
- Ahnesorg, Peter, Philippa Smith, et Stephen P. Jackson. 2006. « XLF Interacts with the XRCC4-DNA Ligase IV Complex to Promote DNA Nonhomologous End-Joining ». *Cell* 124 (2): 301-13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.031>.
- Albamonte, Mirta S., Miguel A. Willis, María I. Albamonte, Federico Jensen, María B. Espinosa, et Alfredo D. Vitullo. 2008. « The Developing Human Ovary: Immunohistochemical Analysis of Germ-Cell-Specific VASA Protein, BCL-2/BAX Expression Balance and Apoptosis ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 23 (8): 1895-1901. <https://doi.org/10.1093/humrep/den197>.

- Ali, Ambereen, Ji Zhang, Shideng Bao, Irene Liu, Diane Otterness, Nicholas M. Dean, Robert T. Abraham, et Xiao-Fan Wang. 2004. « Requirement of Protein Phosphatase 5 in DNA-Damage-Induced ATM Activation ». *Genes & Development* 18 (3): 249-54. <https://doi.org/10.1101/gad.1176004>.
- Angenard, Gaëlle, Vincent Muczynski, Hervé Coffigny, Catherine Pairault, Clotilde Duquenne, René Frydman, René Habert, Virginie Rouiller-Fabre, et Gabriel Livera. 2010. « Cadmium Increases Human Fetal Germ Cell Apoptosis ». *Environmental Health Perspectives* 118 (3): 331-37. <https://doi.org/10.1289/ehp.0900975>.
- Ara, Toshiaki, Yuri Nakamura, Takeshi Egawa, Tatsuki Sugiyama, Kuniya Abe, Tadimitsu Kishimoto, Yasuhisa Matsui, et Takashi Nagasawa. 2003. « Impaired Colonization of the Gonads by Primordial Germ Cells in Mice Lacking a Chemokine, Stromal Cell-Derived Factor-1 (SDF-1) ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (9): 5319-23. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730719100>.
- Asaithamby, Aroumougame, Naoya Uematsu, Alope Chatterjee, Michael D. Story, Sandeep Burma, et David J. Chen. 2008. « Repair of HZE-Particle-Induced DNA Double-Strand Breaks in Normal Human Fibroblasts ». *Radiation Research* 169 (4): 437-46. <https://doi.org/10.1667/RR1165.1>.
- Asakawa, Jun-ichi, Yujiroh Kamiguchi, Kenji Kamiya, et Nori Nakamura. 2014. « Mutagenic Effects of Ionizing Radiation on Immature Rat Oocytes ». *Radiation Research* 182 (4): 430-34. <https://doi.org/10.1667/RR13776.1>.
- Audebert, Marc, Bernard Salles, Michael Weinfeld, et Patrick Calsou. 2006. « Involvement of Polynucleotide Kinase in a Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1-Dependent DNA Double-Strand Breaks Rejoining Pathway ». *Journal of Molecular Biology* 356 (2): 257-65. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.028>.
- Auvinen, A., M. Vahteristo, H. Arvela, M. Suomela, T. Rahola, M. Hakama, et T. Rytömaa. 2001. « Chernobyl Fallout and Outcome of Pregnancy in Finland ». *Environmental Health Perspectives* 109 (2): 179-85. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109179>.

- Badie, Sophie, Chunyan Liao, Maria Thanasoula, Paul Barber, Mark A. Hill, et Madalena Tarsounas. 2009. « RAD51C Facilitates Checkpoint Signaling by Promoting CHK2 Phosphorylation ». *Journal of Cell Biology* 185 (4): 587-600. <https://doi.org/10.1083/jcb.200811079>.
- Baerwald, Angela R., Gregg P. Adams, et Roger A. Pierson. 2012. « Ovarian Antral Folliculogenesis during the Human Menstrual Cycle: A Review ». *Human Reproduction Update* 18 (1): 73-91. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr039>.
- Baker, T. G. 1963. « A QUANTITATIVE AND CYTOLOGICAL STUDY OF GERM CELLS IN HUMAN OVARIES ». *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 158 (octobre): 417-33. <https://doi.org/10.1098/rspb.1963.0055>.
- Baker, T. G. 1971. « Comparative Aspects of the Effects of Radiation during Oogenesis ». *Mutation Research* 11 (1): 9-22. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(71\)90028-5](https://doi.org/10.1016/0027-5107(71)90028-5).
- Ball, Heather L., Mark R. Ehrhardt, Daniel A. Mordes, Gloria G. Glick, Walter J. Chazin, et David Cortez. 2007. « Function of a Conserved Checkpoint Recruitment Domain in ATRIP Proteins ». *Molecular and Cellular Biology* 27 (9): 3367-77. <https://doi.org/10.1128/MCB.02238-06>.
- Baltus, Andrew E., Douglas B. Menke, Yueh-Chiang Hu, Mary L. Goodheart, Anne E. Carpenter, Dirk G. de Rooij, et David C. Page. 2006. « In Germ Cells of Mouse Embryonic Ovaries, the Decision to Enter Meiosis Precedes Premeiotic DNA Replication ». *Nature Genetics* 38 (12): 1430-34. <https://doi.org/10.1038/ng1919>.
- Bannister, Laura A., Laura G. Reinholdt, Robert J. Munroe, et John C. Schimenti. 2004. « Positional Cloning and Characterization of Mouse Mei8, a Disrupted Allele of the Meiotic Cohesin Rec8 ». *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 40 (3): 184-94. <https://doi.org/10.1002/gene.20085>.
- Barber, Ruth, Mark A. Plumb, Emma Boulton, Isabelle Roux, et Yuri E. Dubrova. 2002. « Elevated Mutation Rates in the Germ Line of First- and Second-Generation Offspring of Irradiated Male Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (10): 6877-82. <https://doi.org/10.1073/pnas.102015399>.

- Barchi, Marco, Ignasi Roig, Monica Di Giacomo, Dirk G. de Rooij, Scott Keeney, et Maria Jasin. 2008. « ATM Promotes the Obligate XY Crossover and Both Crossover Control and Chromosome Axis Integrity on Autosomes ». *PLoS Genetics* 4 (5): e1000076. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000076>.
- Barnes, Deborah E., Gordon Stamp, Ian Rosewell, Angela Denzel, et Tomas Lindahl. 1998. « Targeted Disruption of the Gene Encoding DNA Ligase IV Leads to Lethality in Embryonic Mice ». *Current Biology* 8 (25): 1395-98. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)00021-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)00021-9).
- Baudat, F., K. Manova, J. P. Yuen, M. Jasin, et S. Keeney. 2000. « Chromosome Synapsis Defects and Sexually Dimorphic Meiotic Progression in Mice Lacking Spo11 ». *Molecular Cell* 6 (5): 989-98. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00098-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00098-8).
- Baudat, F., et A. Nicolas. 1997. « Clustering of Meiotic Double-Strand Breaks on Yeast Chromosome III ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (10): 5213-18. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.10.5213>.
- Baudat, Frédéric, et Bernard de Massy. 2004. « SPO11 : une activité de coupure de l'ADN indispensable à la méiose ». *médecine/sciences* 20 (2): 213-18. <https://doi.org/10.1051/medsci/2004202213>.
- Baudat, Frédéric, et Bernard de Massy. 2007. « Regulating Double-Stranded DNA Break Repair towards Crossover or Non-Crossover during Mammalian Meiosis ». *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology* 15 (5): 565-77. <https://doi.org/10.1007/s10577-007-1140-3>.
- Becker, Jordan R., Gillian Clifford, Clara Bonnet, Anja Groth, Marcus D. Wilson, et J. Ross Chapman. 2021. « BARD1 Reads H2A Lysine 15 Ubiquitination to Direct Homologous Recombination ». *Nature*, juillet. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03776-w>.
- Begum, S., V. E. Papaioannou, et R. G. Gosden. 2008. « The Oocyte Population Is Not Renewed in Transplanted or Irradiated Adult Ovaries ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 23 (10): 2326-30. <https://doi.org/10.1093/humrep/den249>.

- Benada, Jan, Kamila Burdová, Tomáš Lidak, Patrick von Morgen, et Libor Macurek. 2015. « Polo-like Kinase 1 Inhibits DNA Damage Response during Mitosis ». *Cell Cycle* 14 (2): 219-31. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.977067>.
- Bennardo, Nicole, Anita Cheng, Nick Huang, et Jeremy M. Stark. 2008. « Alternative-NHEJ Is a Mechanistically Distinct Pathway of Mammalian Chromosome Break Repair ». Édité par James E. Haber. *PLoS Genetics* 4 (6): e1000110. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000110>.
- Bergerat, A., B. de Massy, D. Gadelle, P. C. Varoutas, A. Nicolas, et P. Forterre. 1997. « An Atypical Topoisomerase II from Archaea with Implications for Meiotic Recombination ». *Nature* 386 (6623): 414-17. <https://doi.org/10.1038/386414a0>.
- Bétermier, Mireille, Pascale Bertrand, et Bernard S. Lopez. 2014. « Is Non-Homologous End-Joining Really an Inherently Error-Prone Process? » Édité par Sue Jinks-Robertson. *PLoS Genetics* 10 (1): e1004086. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004086>.
- Beverley, Rachel, Meredith L. Snook, et Miguel Angel Brieño-Enríquez. 2021. « Meiotic Cohesin and Variants Associated With Human Reproductive Aging and Disease ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9: 710033. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.710033>.
- Beyreuther, Elke, Elisabeth Lessmann, Jörg Pawelke, et Stefan Pieck. 2009. « DNA Double-Strand Break Signalling: X-Ray Energy Dependence of Residual Co-Localised Foci of Gamma-H2AX and 53BP1 ». *International Journal of Radiation Biology* 85 (11): 1042-50. <https://doi.org/10.3109/09553000903232884>.
- Bézar, J., et P. Mauléon. 1984. « [Ultrastructural changes in female germ cells during the meiotic prophase in the rat: a special study of membranes after cryofracture] ». *Reproduction, Nutrition, Développement* 24 (6): 865-86.
- Bezine, Elisabeth, Julien Vignard, et Gladys Mirey. 2014. « The Cytotoxic Distending Toxin Effects on Mammalian Cells: A DNA Damage Perspective ». *Cells* 3 (2): 592-615. <https://doi.org/10.3390/cells3020592>.

- Bhargava, Ragini, David O. Onyango, et Jeremy M. Stark. 2016. « Regulation of Single-Strand Annealing and Its Role in Genome Maintenance ». *Trends in Genetics: TIG* 32 (9): 566-75. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.06.007>.
- Bharti, Dinesh, Si-Jung Jang, Sang-Yun Lee, Sung-Lim Lee, et Gyu-Jin Rho. 2020. « *In Vitro* Generation of Oocyte Like Cells and Their *In Vivo* Efficacy: How Far We Have Been Succeeded ». *Cells* 9 (3): 557. <https://doi.org/10.3390/cells9030557>.
- Bianchi, M., C.S. Potten, et J.H. Hendry. 1983. « Cytotoxic Insult to Tissue: Effects on Cell Lineages Cytotoxic insult to germinal tissue, part 2; The ovary. In Potten, C.S. and Hendry, J.H. (eds) Cytotoxic Insult to Tissue: Effects on Cell Lineages. Churchill-Livingstone, Edinburgh, UK, pp. 309±328. » Pp. 309±328.
- Biau, Julian, Emmanuel Chautard, Pierre Verrelle, et Marie Dutreix. 2019. « Altering DNA Repair to Improve Radiation Therapy: Specific and Multiple Pathway Targeting ». *Frontiers in Oncology* 9 (octobre): 1009. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01009>.
- Bishop, Douglas K. 1994. « RecA Homologs Dmc1 and Rad51 Interact to Form Multiple Nuclear Complexes Prior to Meiotic Chromosome Synapsis ». *Cell* 79 (6): 1081-92. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90038-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90038-8).
- Bohgaki, M., T. Bohgaki, S. El Ghamrasni, T. Srikumar, G. Maire, S. Panier, A. Fradet-Turcotte, et al. 2013. « RNF168 Ubiquitylates 53BP1 and Controls Its Response to DNA Double-Strand Breaks ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (52): 20982-87. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320302111>.
- Bolcun-Filas, Ewelina, Vera D. Rinaldi, Michelle E. White, et John C. Schimenti. 2014. « Reversal of Female Infertility by Chk2 Ablation Reveals the Oocyte DNA Damage Checkpoint Pathway ». *Science (New York, N.Y.)* 343 (6170): 533-36. <https://doi.org/10.1126/science.1247671>.
- Bolcun-Filas, Ewelina, et John C. Schimenti. 2012. « Genetics of Meiosis and Recombination in Mice ». *International Review of Cell and Molecular Biology* 298: 179-227. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00005-5>.

- Borgel, Julie, Sylvain Guibert, Yufeng Li, Hatsune Chiba, Dirk Schübeler, Hiroyuki Sasaki, Thierry Forné, et Michael Weber. 2010. « Targets and Dynamics of Promoter DNA Methylation during Early Mouse Development ». *Nature Genetics* 42 (12): 1093-1100. <https://doi.org/10.1038/ng.708>.
- Borum, K. 1961. « Oogenesis in the Mouse. A Study of the Meiotic Prophase ». *Experimental Cell Research* 24 (septembre): 495-507. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90449-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90449-9).
- Bourc'his, Déborah, et Charlotte Proudhon. 2008. « Sexual Dimorphism in Parental Imprint Ontogeny and Contribution to Embryonic Development ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 282 (1-2): 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.11.025>.
- Buck, Dietke, Laurent Malivert, Régina de Chasseval, Anne Barraud, Marie-Claude Fondanèche, Ozden Sanal, Alessandro Plebani, et al. 2006. « Cernunnos, a Novel Nonhomologous End-Joining Factor, Is Mutated in Human Immunodeficiency with Microcephaly ». *Cell* 124 (2): 287-99. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.030>.
- Buisson, Rémi, et Jean-Yves Masson. 2013. « Fonction des suppresseurs de tumeur PALB2 et BRCA2 dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN ». *médecine/sciences* 29 (3): 301-7. <https://doi.org/10.1051/medsci/2013293017>.
- Bullejos, Monica, et Peter Koopman. 2004. « Germ Cells Enter Meiosis in a Rostro-Caudal Wave during Development of the Mouse Ovary ». *Molecular Reproduction and Development* 68 (4): 422-28. <https://doi.org/10.1002/mrd.20105>.
- Bunting, Samuel F., Elsa Callén, Nancy Wong, Hua-Tang Chen, Federica Polato, Amanda Gunn, Anne Bothmer, et al. 2010. « 53BP1 Inhibits Homologous Recombination in Brca1-Deficient Cells by Blocking Resection of DNA Breaks ». *Cell* 141 (2): 243-54. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.012>.
- Burgoyne, Paul S., Shantha K. Mahadevaiah, et James M. A. Turner. 2009. « The Consequences of Asynapsis for Mammalian Meiosis ». *Nature Reviews. Genetics* 10 (3): 207-16. <https://doi.org/10.1038/nrg2505>.

- Cao, Liang, Eric Alani, et Nancy Kleckner. 1990. « A Pathway for Generation and Processing of Double-Strand Breaks during Meiotic Recombination in *S. Cerevisiae* ». *Cell* 61 (6): 1089-1101. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90072-M](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90072-M).
- Capel, Blanche. 2017. « Vertebrate Sex Determination: Evolutionary Plasticity of a Fundamental Switch ». *Nature Reviews. Genetics* 18 (11): 675-89. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.60>.
- Capp, Jean-Pascal, François Boudsocq, Anne-Gaelle Besnard, Bernard S. Lopez, Christophe Cazaux, Jean-Sébastien Hoffmann, et Yvan Canitrot. 2007. « Involvement of DNA Polymerase μ in the Repair of a Specific Subset of DNA Double-Strand Breaks in Mammalian Cells ». *Nucleic Acids Research* 35 (11): 3551-60. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm243>.
- Carabatsos, M. J., C. Sellitto, D. A. Goodenough, et D. F. Albertini. 2000. « Oocyte-Granulosa Cell Heterologous Gap Junctions Are Required for the Coordination of Nuclear and Cytoplasmic Meiotic Competence ». *Developmental Biology* 226 (2): 167-79. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9863>.
- Carballo, Jesús A., Anthony L. Johnson, Steven G. Sedgwick, et Rita S. Cha. 2008. « Phosphorylation of the Axial Element Protein Hop1 by Mec1/Tel1 Ensures Meiotic Interhomolog Recombination ». *Cell* 132 (5): 758-70. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.035>.
- Carpenter, A. T. 1979. « Synaptonemal Complex and Recombination Nodules in Wild-Type *Drosophila Melanogaster* Females ». *Genetics* 92 (2): 511-41.
- Castrillon, Diego H., Lili Miao, Ramya Kollipara, James W. Horner, et Ronald A. DePinho. 2003. « Suppression of Ovarian Follicle Activation in Mice by the Transcription Factor Foxo3a ». *Science (New York, N.Y.)* 301 (5630): 215-18. <https://doi.org/10.1126/science.1086336>.
- Cavallero, Sophie, Renata Neves Granito, Daniel Stockholm, Peggy Azzolin, Michèle T. Martin, et Nicolas O. Fortunel. 2020. « Exposure of Human Skin Organoids to Low Genotoxic Stress Can Promote Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Regenerating Keratinocyte Precursor Cells ». *Cells* 9 (8): E1912. <https://doi.org/10.3390/cells9081912>.

- Chambers, Setsuko K., Joseph T. Chambers, Ruben Kier, et Richard E. Peschel. 1991. « Sequelae of Lateral Ovarian Transposition in Irradiated Cervical Cancer Patients ». *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 20 (6): 1305-8. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(91\)90242-V](https://doi.org/10.1016/0360-3016(91)90242-V).
- Chang, Howard H. Y., Go Watanabe, Christina A. Gerodimos, Takashi Ochi, Tom L. Blundell, Stephen P. Jackson, et Michael R. Lieber. 2016. « Different DNA End Configurations Dictate Which NHEJ Components Are Most Important for Joining Efficiency ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (47): 24377-89. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.752329>.
- Chansel-Da Cruz, Marie, Marcel Hohl, Ilaria Ceppi, Laëtitia Kermasson, Laurence Maggiorella, Mauro Modesti, Jean-Pierre de Villartay, et al. 2020. « A Disease-Causing Single Amino Acid Deletion in the Coiled-Coil Domain of RAD50 Impairs MRE11 Complex Functions in Yeast and Humans ». *Cell Reports* 33 (13): 108559. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108559>.
- Chassot, Anne-Amandine, Morgane Le Rolle, Geneviève Jolivet, Isabelle Stevant, Jean-Marie Guignonis, Fabio Da Silva, Serge Nef, et al. 2020. « Retinoic Acid Synthesis by ALDH1A Proteins Is Dispensable for Meiosis Initiation in the Mouse Fetal Ovary ». *Science Advances* 6 (21): eaaz1261. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz1261>.
- Chen, Longchuan, Christian J. Nievera, Alan Yueh-Luen Lee, et Xiaohua Wu. 2008. « Cell Cycle-Dependent Complex Formation of BRCA1·CtIP·MRN Is Important for DNA Double-Strand Break Repair ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (12): 7713-20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710245200>.
- Chen, Yingjun, Qinghua Liu, Ruiyan Liu, Chan Yang, Xiaodong Wang, Zaohong Ran, Shanshan Zhou, Xiang Li, et Changjiu He. 2021. « A Prepubertal Mice Model to Study the Growth Pattern of Early Ovarian Follicles ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (10): 5130. <https://doi.org/10.3390/ijms22105130>.
- Chen, Yue, et Randy Y. C. Poon. 2008. « The Multiple Checkpoint Functions of CHK1 and CHK2 in Maintenance of Genome Stability ». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 13 (mai): 5016-29. <https://doi.org/10.2741/3060>.

- Choi, Youngsok, et Aleksandar Rajkovic. 2006. « Characterization of NOBOX DNA Binding Specificity and Its Regulation of Gdf9 and Pou5f1 Promoters ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (47): 35747-56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604008200>.
- Ciccia, Alberto, et Stephen J. Elledge. 2010. « The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives ». *Molecular Cell* 40 (2): 179-204. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019>.
- Claeys Bouuaert, Corentin, Sam E. Tischfield, Stephen Pu, Eleni P. Mimitou, Ernesto Arias-Palomo, James M. Berger, et Scott Keeney. 2021. « Structural and Functional Characterization of the Spo11 Core Complex ». *Nature Structural & Molecular Biology* 28 (1): 92-102. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00534-w>.
- Clark, Rebecca A., Sogol Mostoufi-Moab, Yutaka Yasui, Ngoc Khanh Vu, Charles A. Sklar, Tarek Motan, Russell J. Brooke, et al. 2020. « Predicting Acute Ovarian Failure in Female Survivors of Childhood Cancer: A Cohort Study in the Childhood Cancer Survivor Study (CCSS) and the St Jude Lifetime Cohort (SJLIFE) ». *The Lancet. Oncology* 21 (3): 436-45. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30818-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30818-6).
- Cloud, Veronica, Yuen-Ling Chan, Jennifer Grubb, Brian Budke, et Douglas K. Bishop. 2012. « Rad51 Is an Accessory Factor for Dmc1-Mediated Joint Molecule Formation during Meiosis ». *Science (New York, N.Y.)* 337 (6099): 1222-25. <https://doi.org/10.1126/science.1219379>.
- Cloutier, Jeffrey M., Shantha K. Mahadevaiah, Elias Ellnati, André Nussenzweig, Attila Tóth, et James M. A. Turner. 2015. « Histone H2AFX Links Meiotic Chromosome Asynapsis to Prophase I Oocyte Loss in Mammals ». *PLoS Genetics* 11 (10): e1005462. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005462>.
- Cobo, A, J García-Velasco, J Domingo, A Pellicer, et J Remohí. 2018. « Elective and Onco-Fertility Preservation: Factors Related to IVF Outcomes ». *Human Reproduction* 33 (12): 2222-31. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey321>.
- Cooper, Tim J., Kayleigh Wardell, Valerie Garcia, et Matthew J. Neale. 2014. « Homeostatic Regulation of Meiotic DSB Formation by ATM/ATR ». *Experimental Cell Research* 329 (1): 124-31. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.07.016>.

- Costes, S.V., I. Chiolo, J.M. Pluth, M.H. Barcellos-Hoff, et B. Jakob. 2010. « Spatiotemporal Characterization of Ionizing Radiation Induced DNA Damage Foci and Their Relation to Chromatin Organization ». *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 704 (1-3): 78-87. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.12.006>.
- Coutandin, Daniel, Christian Osterburg, Ratnesh Kumar Srivastav, Manuela Sumyk, Sebastian Kehroesser, Jakob Gebel, Marcel Tuppi, et al. 2016. « Quality Control in Oocytes by P63 Is Based on a Spring-Loaded Activation Mechanism on the Molecular and Cellular Level ». *ELife* 5 (mars): e13909. <https://doi.org/10.7554/eLife.13909>.
- Creux, Helene, Patricia Monnier, Weon-Young Son, et William Buckett. 2018. « Thirteen Years' Experience in Fertility Preservation for Cancer Patients after *in Vitro* Fertilization and *in Vitro* Maturation Treatments ». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 35 (4): 583-92. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1138-0>.
- Davis, Anthony J., Benjamin P. C. Chen, et David J. Chen. 2014. « DNA-PK: A Dynamic Enzyme in a Versatile DSB Repair Pathway ». *DNA Repair* 17 (mai): 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.02.020>.
- Debey, P., M. S. Szöllösi, D. Szöllösi, D. Vautier, A. Girusse, et D. Besombes. 1993. « Competent Mouse Oocytes Isolated from Antral Follicles Exhibit Different Chromatin Organization and Follow Different Maturation Dynamics ». *Molecular Reproduction and Development* 36 (1): 59-74. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080360110>.
- De Braekeleer, M., et T. N. Dao. 1990. « Cytogenetic Studies in Couples Experiencing Repeated Pregnancy Losses ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 5 (5): 519-28. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137135>.
- Deshpande, Rajashree A., Logan R. Myler, Michael M. Soniat, Nodar Makharashvili, Linda Lee, Susan P. Lees-Miller, Ilya J. Finkelstein, et Tanya T. Paull. 2020. « DNA-Dependent Protein Kinase Promotes DNA End Processing by MRN and CtIP ». *Science Advances* 6 (2): eaay0922. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay0922>.

- Di Giacomo, Monica, Marco Barchi, Frédéric Baudat, Winfried Edelmann, Scott Keeney, et Maria Jasin. 2005. « Distinct DNA-Damage-Dependent and -Independent Responses Drive the Loss of Oocytes in Recombination-Defective Mouse Mutants ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (3): 737-42. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406212102>.
- DiNapoli, Leo, et Blanche Capel. 2008. « SRY and the Standoff in Sex Determination ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 22 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0250>.
- Ding, Xu, Renner Xu, Juehua Yu, Tian Xu, Yuan Zhuang, et Min Han. 2007. « SUN1 Is Required for Telomere Attachment to Nuclear Envelope and Gametogenesis in Mice ». *Developmental Cell* 12 (6): 863-72. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.03.018>.
- Dissen, G. A., C. Romero, A. N. Hirshfield, et S. R. Ojeda. 2001. « Nerve Growth Factor Is Required for Early Follicular Development in the Mammalian Ovary ». *Endocrinology* 142 (5): 2078-86. <https://doi.org/10.1210/endo.142.5.8126>.
- Dolmans, Marie-Madeleine, Maria-Laura Marotta, Céline Pirard, Jacques Donnez, et Olivier Donnez. 2014. « Ovarian Tissue Cryopreservation Followed by Controlled Ovarian Stimulation and Pick-up of Mature Oocytes Does Not Impair the Number or Quality of Retrieved Oocytes ». *Journal of Ovarian Research* 7 (1): 80. <https://doi.org/10.1186/s13048-014-0080-8>.
- Donnez, Jacques, et Marie-Madeleine Dolmans. 2017. « Fertility Preservation in Women ». Édité par Edward W. Campion. *New England Journal of Medicine* 377 (17): 1657-65. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1614676>.
- Driancourt, M. A. 2001. « Regulation of Ovarian Follicular Dynamics in Farm Animals. Implications for Manipulation of Reproduction ». *Theriogenology* 55 (6): 1211-39. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00479-4](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00479-4).
- Dubrova, Y. E., A. J. Jeffreys, et A. M. Malashenko. 1993. « Mouse Minisatellite Mutations Induced by Ionizing Radiation ». *Nature Genetics* 5 (1): 92-94. <https://doi.org/10.1038/ng0993-92>.

- Dubrova, Y. E., V. N. Nesterov, N. G. Krouchinsky, V. A. Ostapenko, R. Neumann, D. L. Neil, et A. J. Jeffreys. 1996. « Human Minisatellite Mutation Rate after the Chernobyl Accident ». *Nature* 380 (6576): 683-86. <https://doi.org/10.1038/380683a0>.
- Dubrova, Y. E., M. Plumb, J. Brown, J. Fennelly, P. Bois, D. Goodhead, et A. J. Jeffreys. 1998. « Stage Specificity, Dose Response, and Doubling Dose for Mouse Minisatellite Germ-Line Mutation Induced by Acute Radiation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (11): 6251-55. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6251>.
- Dubrova, Yuri E., Gemma Grant, Anatoliy A. Chumak, Vasyl A. Stezhka, et Angela N. Karakasian. 2002. « Elevated Minisatellite Mutation Rate in the Post-Chernobyl Families from Ukraine ». *American Journal of Human Genetics* 71 (4): 801-9. <https://doi.org/10.1086/342729>.
- Dubrova, Yuri E., Mark Plumb, Bruno Gutierrez, Emma Boulton, et Alec J. Jeffreys. 2000. « Transgenerational Mutation by Radiation ». *Nature* 405 (6782): 37-37. <https://doi.org/10.1038/35011135>.
- Dupré, Aude, Louise Boyer-Chatenet, et Jean Gautier. 2006. « Two-Step Activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex ». *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (5): 451-57. <https://doi.org/10.1038/nsmb1090>.
- Durlinger, A. L., P. Kramer, B. Karels, F. H. de Jong, J. T. Uilenbroek, J. A. Grootegoed, et A. P. Themmen. 1999. « Control of Primordial Follicle Recruitment by Anti-Müllerian Hormone in the Mouse Ovary ». *Endocrinology* 140 (12): 5789-96. <https://doi.org/10.1210/endo.140.12.7204>.
- Durlinger, Alexandra L. L., Jenny A. Visser, et Axel P. N. Themmen. 2002. « Regulation of Ovarian Function: The Role of Anti-Müllerian Hormone ». *Reproduction (Cambridge, England)* 124 (5): 601-9. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1240601>.
- Durocher, D., et S. P. Jackson. 2001. « DNA-PK, ATM and ATR as Sensors of DNA Damage: Variations on a Theme? ». *Current Opinion in Cell Biology* 13 (2): 225-31. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(00\)00201-5](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(00)00201-5).

- Edelmann, Michelle N., Kevin R. Krull, Wei Liu, John O. Glass, Qing Ji, Robert J. Ogg, Noah D. Sabin, et al. 2014. « Diffusion Tensor Imaging and Neurocognition in Survivors of Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia ». *Brain: A Journal of Neurology* 137 (Pt 11): 2973-83. <https://doi.org/10.1093/brain/awu230>.
- Eggan, Kevin, Sara Jurga, Roger Gosden, Irene M. Min, et Amy J. Wagers. 2006. « Ovulated Oocytes in Adult Mice Derive from Non-Circulating Germ Cells ». *Nature* 441 (7097): 1109-14. <https://doi.org/10.1038/nature04929>.
- Enguita-Marruedo, Andrea, Marta Martín-Ruiz, Eva García, Ana Gil-Fernández, María Teresa Parra, Alberto Viera, Julio S. Rufas, et Jesús Page. 2019. « Transition from a Meiotic to a Somatic-like DNA Damage Response during the Pachytene Stage in Mouse Meiosis ». *PLoS Genetics* 15 (1): e1007439. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007439>.
- Eppig, J. J. 1991. « Intercommunication between Mammalian Oocytes and Companion Somatic Cells ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 13 (11): 569-74. <https://doi.org/10.1002/bies.950131105>.
- Eppig, J. J., M. O'Brien, et K. Wigglesworth. 1996. « Mammalian Oocyte Growth and Development *in Vitro* ». *Molecular Reproduction and Development* 44 (2): 260-73. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199606\)44:2<260::AID-MRD17>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199606)44:2<260::AID-MRD17>3.0.CO;2-6).
- Eppig, John J., Frank L. Pendola, Karen Wigglesworth, et Janice K. Pendola. 2005. « Mouse Oocytes Regulate Metabolic Cooperativity between Granulosa Cells and Oocytes: Amino Acid Transport ». *Biology of Reproduction* 73 (2): 351-57. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.041798>.
- Erickson, G. F., C. Hofeditz, M. Unger, W. R. Allen, et R. Dulbecco. 1985. « A Monoclonal Antibody to a Mammary Cell Line Recognizes Two Distinct Subtypes of Ovarian Granulosa Cells ». *Endocrinology* 117 (4): 1490-99. <https://doi.org/10.1210/endo-117-4-1490>.
- Ernst, E. H., S. Franks, K. Hardy, P. Villesen, et K. Lykke-Hartmann. 2018. « Granulosa Cells from Human Primordial and Primary Follicles Show Differential Global Gene Expression Profiles ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 33 (4): 666-79. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey011>.

- Ewen, Katherine A., et Peter Koopman. 2010. « Mouse Germ Cell Development: From Specification to Sex Determination ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 323 (1): 76-93. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.12.013>.
- « Exposition de la population française aux rayonnements ionisants : bilan 2014-2019 – IRSN ». 2021. https://www.irsn.fr/FR/Actualites_presse/Communiqués_et_dossiers_de_presse/Documents/IRSN_Rapport%20EXPOP_def.pdf.
- Faddy, M. J., R. G. Gosden, A. Gougeon, S. J. Richardson, et J. F. Nelson. 1992. « Accelerated Disappearance of Ovarian Follicles in Mid-Life: Implications for Forecasting Menopause ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 7 (10): 1342-46. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137570>.
- Falck, Jacob, Josep V. Forment, Julia Coates, Martin Mistrik, Jiri Lukas, Jiri Bartek, et Stephen P. Jackson. 2012. « CDK Targeting of NBS1 Promotes DNA-End Resection, Replication Restart and Homologous Recombination ». *EMBO Reports* 13 (6): 561-68. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.58>.
- Fan, Wei, et Xiaoming Wu. 2004. « DNA Polymerase λ Can Elongate on DNA Substrates Mimicking Non-Homologous End Joining and Interact with XRCC4–Ligase IV Complex ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323 (4): 1328-33. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.002>.
- Farini, Donatella, Gina La Sala, Marianna Tedesco, et Massimo De Felici. 2007. « Chemoattractant Action and Molecular Signaling Pathways of Kit Ligand on Mouse Primordial Germ Cells ». *Developmental Biology* 306 (2): 572-83. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.03.031>.
- Feeney, Daniel D., David H. Moore, Katherine Y. Look, Frederick B. Stehman, et Gregory P. Sutton. 1995. « The Fate of the Ovaries after Radical Hysterectomy and Ovarian Transposition ». *Gynecologic Oncology* 56 (1): 3-7. <https://doi.org/10.1006/gyno.1995.1002>.
- Findlay, John K., Karla J. Hutt, Martha Hickey, et Richard A. Anderson. 2015. « How Is the Number of Primordial Follicles in the Ovarian Reserve Established? » *Biology of Reproduction* 93 (5): 111. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.133652>.

- Forabosco, A., C. Sforza, A. De Pol, L. Vizzotto, L. Marzona, et V. F. Ferrario. 1991. « Morphometric Study of the Human Neonatal Ovary ». *The Anatomical Record* 231 (2): 201-8. <https://doi.org/10.1002/ar.1092310208>.
- Ford, Emmalee A., Emma L. Beckett, Shaun D. Roman, Eileen A. McLaughlin, et Jessie M. Sutherland. 2020. « Advances in Human Primordial Follicle Activation and Premature Ovarian Insufficiency ». *Reproduction (Cambridge, England)* 159 (1): R15-29. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0201>.
- Francavilla, S., G. Cordeschi, G. Properzi, N. Concordia, F. Cappa, et V. Pozzi. 1990. « Ultrastructure of Fetal Human Gonad before Sexual Differentiation and during Early Testicular and Ovarian Development ». *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 22 (3): 389-400.
- Frydman, Nelly, Marine Poulain, Brahim Arkoun, Clotilde Duquenne, Sophie Tourpin, Sébastien Messiaen, René Habert, Virginie Rouiller-Fabre, Alexandra Benachi, et Gabriel Livera. 2017. « Human Foetal Ovary Shares Meiotic Preventing Factors with the Developing Testis ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 32 (3): 631-42. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew343>.
- Fu, Xia-Fei, Shun-Feng Cheng, Lin-Qing Wang, Shen Yin, Massimo De Felici, et Wei Shen. 2015. « DAZ Family Proteins, Key Players for Germ Cell Development ». *International Journal of Biological Sciences* 11 (10): 1226-35. <https://doi.org/10.7150/ijbs.11536>.
- Funkuda, T. 1976. « Ultrastructure of Primordial Germ Cells in Human Embryo ». *Virchows Archiv. B, Cell Pathology* 20 (2): 85-89.
- Gans, B., C. Bahary, et B. Levie. 1963. « OVARIAN REGENERATION AND PREGNANCY FOLLOWING MASSIVE RADIOTHERAPY FOR DYSGERMINOMA. REPORT OF A CASE ». *Obstetrics and Gynecology* 22 (novembre): 596-600.
- Garcia-Velasco, Juan A., Javier Domingo, Ana Cobo, Maria Martínez, Luis Carmona, et Antonio Pellicer. 2013. « Five Years' Experience Using Oocyte Vitrification to Preserve Fertility for Medical and Nonmedical Indications ». *Fertility and Sterility* 99 (7): 1994-99. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.02.004>.

- Geber, Selmo, Rodrigo Megale, Fabiene Vale, Ana Maria Arruda Lanna, et Antônio Carlos Vieira Cabral. 2012. « Variation in Ovarian Follicle Density during Human Fetal Development ». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 29 (9): 969-72. <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9810-2>.
- Gell, D., et S. P. Jackson. 1999. « Mapping of Protein-Protein Interactions within the DNA-Dependent Protein Kinase Complex ». *Nucleic Acids Research* 27 (17): 3494-3502. <https://doi.org/10.1093/nar/27.17.3494>.
- Gellert, S. E., S. E. Pors, S. G. Kristensen, A. M. Bay-Björn, E. Ernst, et C. Yding Andersen. 2018. « Transplantation of Frozen-Thawed Ovarian Tissue: An Update on Worldwide Activity Published in Peer-Reviewed Papers and on the Danish Cohort ». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 35 (4): 561-70. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1144-2>.
- Ginsburg, M., M. H. Snow, et A. McLaren. 1990. « Primordial Germ Cells in the Mouse Embryo during Gastrulation ». *Development (Cambridge, England)* 110 (2): 521-28.
- Goodarzi, Aaron A, Jyoti C Jonnalagadda, Pauline Douglas, David Young, Ruiqiong Ye, Greg B G Moorhead, Susan P Lees-Miller, et Kum Kum Khanna. 2004. « Autophosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A ». *The EMBO Journal* 23 (22): 4451-61. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600455>.
- Goswami, Deepti, et Gerard S. Conway. 2005. « Premature Ovarian Failure ». *Human Reproduction Update* 11 (4): 391-410. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi012>.
- Gott, Katherine M., Charles A. Potter, Melanie Doyle-Eisele, Yong Lin, Julie Wilder, et Bobby R. Scott. 2020. « A Comparison of Cs-137 γ Rays and 320-KV X-Rays in a Mouse Bone Marrow Transplantation Model ». *Dose-Response: A Publication of International Hormesis Society* 18 (2): 1559325820916572. <https://doi.org/10.1177/1559325820916572>.
- Gougeon, A. 2010. « Human Ovarian Follicular Development: From Activation of Resting Follicles to Preovulatory Maturation ». *Annales D'endocrinologie* 71 (3): 132-43. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2010.02.021>.

- Gougeon, A., R. Ecochard, et J. C. Thalabard. 1994. « Age-Related Changes of the Population of Human Ovarian Follicles: Increase in the Disappearance Rate of Non-Growing and Early-Growing Follicles in Aging Women ». *Biology of Reproduction* 50 (3): 653-63. <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.3.653>.
- Gravel, Serge, J. Ross Chapman, Christine Magill, et Stephen P. Jackson. 2008. « DNA Helicases Sgs1 and BLM Promote DNA Double-Strand Break Resection ». *Genes & Development* 22 (20): 2767-72. <https://doi.org/10.1101/gad.503108>.
- Gray, Stephen, et Paula E. Cohen. 2016. « Control of Meiotic Crossovers: From Double-Strand Break Formation to Designation ». *Annual Review of Genetics* 50 (novembre): 175-210. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035111>.
- Greenbaum, Michael P., Wei Yan, Meng-Hsieh Wu, Yi-Nan Lin, Julio E. Agno, Manju Sharma, Robert E. Braun, Aleksandar Rajkovic, et Martin M. Matzuk. 2006. « TEX14 Is Essential for Intercellular Bridges and Fertility in Male Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (13): 4982-87. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505123103>.
- Greenfeld, Chuck R, Melissa E Pepling, Janice K Babus, Priscilla A Furth, et Jodi A Flaws. 2007. « BAX regulates follicular endowment in mice ». *Reproduction* 133 (5): 865-76. <https://doi.org/10.1530/REP-06-0270>.
- Grey, Corinne, Frédéric Baudat, et Bernard de Massy. 2018. « PRDM9, a Driver of the Genetic Map ». *PLoS Genetics* 14 (8): e1007479. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007479>.
- Grive, Kathryn J. 2020. « Pathways Coordinating Oocyte Attrition and Abundance during Mammalian Ovarian Reserve Establishment ». *Molecular Reproduction and Development* 87 (8): 843-56. <https://doi.org/10.1002/mrd.23401>.
- Grynberg, Michael, Marine Poulain, Sarah Sebag-Peyrelevade, Soizic le Parco, Renato Fanchin, et Nelly Frydman. 2012. « Ovarian Tissue and Follicle Transplantation as an Option for Fertility Preservation ». *Fertility and Sterility* 97 (6): 1260-68. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.04.042>.

- Guerquin, Marie-Justine, Clotilde Duquenne, Jean-Baptiste Lahaye, Sophie Tourpin, René Habert, et Gabriel Livera. 2010. « New Testicular Mechanisms Involved in the Prevention of Fetal Meiotic Initiation in Mice ». *Developmental Biology* 346 (2): 320-30. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.08.002>.
- Guigon, Céline J., Séverine Mazaud, Maguelone G. Forest, Sylvie Brailly-Tabard, Noëlline Coudouel, et Solange Magre. 2003. « Unaltered Development of the Initial Follicular Waves and Normal Pubertal Onset in Female Rats after Neonatal Deletion of the Follicular Reserve ». *Endocrinology* 144 (8): 3651-62. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0072>.
- Guirouilh-Barbat, Josée, Sylvie Huck, Pascale Bertrand, Livia Pirzio, Chantal Desmaze, Laure Sabatier, et Bernard S. Lopez. 2004. « Impact of the KU80 Pathway on NHEJ-Induced Genome Rearrangements in Mammalian Cells ». *Molecular Cell* 14 (5): 611-23. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.05.008>.
- Guirouilh-Barbat, Josée, Sarah Lambert, Pascale Bertrand, et Bernard S. Lopez. 2014. « Is Homologous Recombination Really an Error-Free Process? » *Frontiers in Genetics* 5: 175. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00175>.
- Guirouilh-Barbat, Josée, Emilie Rass, Isabelle Plo, Pascale Bertrand, et Bernard S. Lopez. 2007. « Defects in XRCC4 and KU80 Differentially Affect the Joining of Distal Nonhomologous Ends ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (52): 20902-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708541104>.
- Gump, Jacob M., et Andrew Thorburn. 2011. « Autophagy and Apoptosis: What Is the Connection? » *Trends in Cell Biology* 21 (7): 387-92. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.03.007>.
- Haber, James E. 2015. « TOPping Off Meiosis ». *Molecular Cell* 57 (4): 577-81. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.004>.
- Hamatani, Toshio, Mitsutoshi Yamada, Hidenori Akutsu, Naoaki Kuji, Yoshiyuki Mochimaru, Mitsuko Takano, Masashi Toyoda, Kenji Miyado, Akihiro Umezawa, et Yasunori Yoshimura. 2008. « What Can We Learn from Gene Expression Profiling of Mouse Oocytes? » *Reproduction (Cambridge, England)* 135 (5): 581-92. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0430>.

- Hanoux, V., C. Pairault, M. Bakalska, R. Habert, et G. Livera. 2007. « Caspase-2 Involvement during Ionizing Radiation-Induced Oocyte Death in the Mouse Ovary ». *Cell Death and Differentiation* 14 (4): 671-81. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402052>.
- Hao, Jing, Miwako Yamamoto, Timothy E. Richardson, Karen M. Chapman, Bray S. Denard, Robert E. Hammer, Guang Quan Zhao, et F. Kent Hamra. 2008. « Sohlh2 Knockout Mice Are Male-Sterile Because of Degeneration of Differentiating Type A Spermatogonia ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26 (6): 1587-97. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0502>.
- Hartshorne, G. M., S. Lyrakou, H. Hamoda, E. Oloto, et F. Ghafari. 2009. « Oogenesis and Cell Death in Human Prenatal Ovaries: What Are the Criteria for Oocyte Selection? » *Molecular Human Reproduction* 15 (12): 805-19. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap055>.
- Hayashi, Katsuhiko, et Mitinori Saitou. 2013. « Generation of Eggs from Mouse Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells ». *Nature Protocols* 8 (8): 1513-24. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.090>.
- He, Meina, Tuo Zhang, Yi Yang, et Chao Wang. 2021. « Mechanisms of Oocyte Maturation and Related Epigenetic Regulation ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (mars): 654028. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.654028>.
- Heijden, Godfried W. van der, Alwin A. H. A. Derijck, Eszter Pósfai, Maud Giele, Pawel Pelczar, Liliana Ramos, Derick G. Wansink, Johan van der Vlag, Antoine H. F. M. Peters, et Peter de Boer. 2007. « Chromosome-Wide Nucleosome Replacement and H3.3 Incorporation during Mammalian Meiotic Sex Chromosome Inactivation ». *Nature Genetics* 39 (2): 251-58. <https://doi.org/10.1038/ng1949>.
- Her, Joonyoung, et Samuel F. Bunting. 2018. « How Cells Ensure Correct Repair of DNA Double-Strand Breaks ». *The Journal of Biological Chemistry* 293 (27): 10502-11. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.000371>.

- Herman, A., E. Dreazen, A. M. Herman, C. E. M. Batukan, W. Holzgreve, et S. Tercanli. 2002. « Bedside Estimation of Down Syndrome Risk during First-Trimester Ultrasound Screening ». *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 20 (5): 468-75. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0705.2002.00835.x>.
- Hill, Peter W. S., Harry G. Leitch, Cristina E. Requena, Zhiyi Sun, Rachel Amouroux, Monica Roman-Trufero, Malgorzata Borkowska, et al. 2018. « Epigenetic Reprogramming Enables the Transition from Primordial Germ Cell to Gonocyte ». *Nature* 555 (7696): 392-96. <https://doi.org/10.1038/nature25964>.
- Hirshfield, A. N. 1991. « Development of Follicles in the Mammalian Ovary ». *International Review of Cytology* 124: 43-101. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)61524-7](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)61524-7).
- Hirshfield, A. N., et A. M. DeSanti. 1995. « Patterns of Ovarian Cell Proliferation in Rats during the Embryonic Period and the First Three Weeks Postpartum ». *Biology of Reproduction* 53 (5): 1208-21. <https://doi.org/10.1095/biolreprod53.5.1208>.
- Hoage, Terrell R., et Ivan L. Cameron. 1976. « Folliculogenesis in the Ovary of the Mature Mouse: A Radioautographic Study ». *The Anatomical Record* 184 (4): 699-709. <https://doi.org/10.1002/ar.1091840409>.
- Holland, Andrew J., et Don W. Cleveland. 2012. « Chromoanagenesis and Cancer: Mechanisms and Consequences of Localized, Complex Chromosomal Rearrangements ». *Nature Medicine* 18 (11): 1630-38. <https://doi.org/10.1038/nm.2988>.
- Holm, P. B. 1986. « Ultrastructural Analysis of Meiotic Recombination and Chiasma Formation ». *The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine* 11 (6): 415-36.
- Hong, Tae-Kyung, Jae-Hoon Song, So-Been Lee, et Jeong-Tae Do. 2021. « Germ Cell Derivation from Pluripotent Stem Cells for Understanding *In Vitro* Gametogenesis ». *Cells* 10 (8): 1889. <https://doi.org/10.3390/cells10081889>.

- Hourvitz, A., G.M. Yerushalmi, E. Maman, H. Raanani, S. Elizur, M. Brengauz, R. Orvieto, J. Dor, et D. Meiorow. 2015. « Combination of Ovarian Tissue Harvesting and Immature Oocyte Collection for Fertility Preservation Increases Preservation Yield ». *Reproductive BioMedicine Online* 31 (4): 497-505. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.06.025>.
- Huang, Rui-Xue, et Ping-Kun Zhou. 2020. « DNA Damage Response Signaling Pathways and Targets for Radiotherapy Sensitization in Cancer ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5 (1): 60. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0150-x>.
- Hunt, Patricia A., Kara E. Koehler, Martha Susiarjo, Craig A. Hodges, Arlene Ilagan, Robert C. Voigt, Sally Thomas, Brian F. Thomas, et Terry J. Hassold. 2003. « Bisphenol a Exposure Causes Meiotic Aneuploidy in the Female Mouse ». *Current Biology: CB* 13 (7): 546-53. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(03\)00189-1](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00189-1).
- Hunt, Patricia, et Terry Hassold. 2010. « Female Meiosis: Coming Unglued with Age ». *Current Biology: CB* 20 (17): R699-702. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.08.011>.
- Huober-Zeeb, Cosima, Barbara Lawrenz, Roxana M. Popovici, Thomas Strowitzki, Ariane Germeyer, Petra Stute, et Michael von Wolff. 2011. « Improving Fertility Preservation in Cancer: Ovarian Tissue Cryobanking Followed by Ovarian Stimulation Can Be Efficiently Combined ». *Fertility and Sterility* 95 (1): 342-44. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.07.1074>.
- Hustedt, Nicole, et Daniel Durocher. 2016. « The Control of DNA Repair by the Cell Cycle ». *Nature Cell Biology* 19 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1038/ncb3452>.
- Inagaki, Akiko, Ramon Roset, et John H. J. Petrini. 2016. « Functions of the MRE11 Complex in the Development and Maintenance of Oocytes ». *Chromosoma* 125 (1): 151-62. <https://doi.org/10.1007/s00412-015-0535-8>.
- Ira, Grzegorz, et James E. Haber. 2002. « Characterization of RAD51-Independent Break-Induced Replication That Acts Preferentially with Short Homologous Sequences ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (18): 6384-92. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.18.6384-6392.2002>.

- Ishiguro, Kei-Ichiro, Kumi Matsuura, Naoki Tani, Naoki Takeda, Shingo Usuki, Mariko Yamane, Michihiko Sugimoto, et al. 2020. « MEIOSIN Directs the Switch from Mitosis to Meiosis in Mammalian Germ Cells ». *Developmental Cell* 52 (4): 429-445.e10. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.01.010>.
- Jacquet, P., L. de Saint-Georges, J. Buset, S. Baatout, J. Vankerkom, et L. Baugnet-Mahieu. 1997. « Cytogenetic Effects of X-Rays in the Guinea Pig Female Germ Cells. I. The Immature Oocyte ». *Mutation Research* 391 (3): 189-92. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(97\)00071-5](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(97)00071-5).
- Jagarlamudi, Krishna, et Aleksandar Rajkovic. 2012. « Oogenesis: Transcriptional Regulators and Mouse Models ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 356 (1-2): 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.049>.
- Jager, M. de, J. van Noort, D. C. van Gent, C. Dekker, R. Kanaar, et C. Wyman. 2001. « Human Rad50/Mre11 Is a Flexible Complex That Can Tether DNA Ends ». *Molecular Cell* 8 (5): 1129-35. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00381-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00381-1).
- Jasin, M., et R. Rothstein. 2013. « Repair of Strand Breaks by Homologous Recombination ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (11): a012740-a012740. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012740>.
- Ji, Jingjuan, Yusheng Liu, Xian Hong Tong, Lihua Luo, Jinlong Ma, et Zijiang Chen. 2013. « The Optimum Number of Oocytes in IVF Treatment: An Analysis of 2455 Cycles in China ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 28 (10): 2728-34. <https://doi.org/10.1093/humrep/det303>.
- John, George B., Teresa D. Gallardo, Lane J. Shirley, et Diego H. Castrillon. 2008. « Foxo3 Is a PI3K-Dependent Molecular Switch Controlling the Initiation of Oocyte Growth ». *Developmental Biology* 321 (1): 197-204. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.06.017>.
- Johnson, Joshua, Jessamyn Bagley, Malgorzata Skaznik-Wikiel, Ho-Joon Lee, Gregor B. Adams, Yuichi Niikura, Katherine S. Tschudy, et al. 2005. « Oocyte Generation in Adult Mammalian Ovaries by Putative Germ Cells in Bone Marrow and Peripheral Blood ». *Cell* 122 (2): 303-15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.031>.

- Johnson, Joshua, Jacqueline Canning, Tomoko Kaneko, James K. Pru, et Jonathan L. Tilly. 2004. « Germline Stem Cells and Follicular Renewal in the Postnatal Mammalian Ovary ». *Nature* 428 (6979): 145-50. <https://doi.org/10.1038/nature02316>.
- Jones, Mathew J. K., et Prasad V. Jallepalli. 2012. « Chromothripsis: Chromosomes in Crisis ». *Developmental Cell* 23 (5): 908-17. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.10.010>.
- Jostes, Sina, et Hubert Schorle. 2018. « Signals and transcription factors for specification of human germ cells ». *Stem Cell Investigation* 5 (avril): 13-13. <https://doi.org/10.21037/sci.2018.04.01>.
- Kamstra, Jorke H., Selma Hurem, Leonardo Martin Martin, Leif C. Lindeman, Juliette Legler, Deborah Oughton, Brit Salbu, Dag Anders Brede, Jan Ludvig Lyche, et Peter Aleström. 2018. « Ionizing Radiation Induces Transgenerational Effects of DNA Methylation in Zebrafish ». *Scientific Reports* 8 (1): 15373. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33817-w>.
- Katsuki, Yoko, Penny A. Jeggo, Yuki Uchihara, Minoru Takata, et Atsushi Shibata. 2020. « DNA Double-Strand Break End Resection: A Critical Relay Point for Determining the Pathway of Repair and Signaling ». *Genome Instability & Disease* 1 (4): 155-71. <https://doi.org/10.1007/s42764-020-00017-8>.
- Kee, Kehkooi, Vanessa T. Angeles, Martha Flores, Ha Nam Nguyen, et Renee A. Reijo Pera. 2009. « Human DAZL, DAZ and BOULE Genes Modulate Primordial Germ-Cell and Haploid Gamete Formation ». *Nature* 462 (7270): 222-25. <https://doi.org/10.1038/nature08562>.
- Keeney, S., C. N. Giroux, et N. Kleckner. 1997. « Meiosis-Specific DNA Double-Strand Breaks Are Catalyzed by Spo11, a Member of a Widely Conserved Protein Family ». *Cell* 88 (3): 375-84. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81876-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81876-0).
- Keeney, Scott. 2001. « Mechanism and Control of Meiotic Recombination Initiation ». In *Current Topics in Developmental Biology*, 52:1-53. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(01\)52008-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(01)52008-6).

- Kerr, J. B., R. Duckett, M. Myers, K. L. Britt, T. Mladenovska, et J. K. Findlay. 2006. « Quantification of Healthy Follicles in the Neonatal and Adult Mouse Ovary: Evidence for Maintenance of Primordial Follicle Supply ». *Reproduction (Cambridge, England)* 132 (1): 95-109. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01128>.
- Kerr, Jeffrey B., Karla J. Hutt, Ewa M. Michalak, Michele Cook, Cassandra J. Vandenberg, Seng H. Liew, Philippe Bouillet, et al. 2012. « DNA Damage-Induced Primordial Follicle Oocyte Apoptosis and Loss of Fertility Require TAp63-Mediated Induction of Puma and Noxa ». *Molecular Cell* 48 (3): 343-52. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.017>.
- Kezele, Phillip, Eric E. Nilsson, et Michael K. Skinner. 2005. « Keratinocyte Growth Factor Acts as a Mesenchymal Factor That Promotes Ovarian Primordial to Primary Follicle Transition ». *Biology of Reproduction* 73 (5): 967-73. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.043117>.
- Klapholz, S., C. S. Waddell, et R. E. Esposito. 1985. « The Role of the SPO11 Gene in Meiotic Recombination in Yeast ». *Genetics* 110 (2): 187-216.
- Klinger, Francesca Gioia, et Massimo De Felici. 2002. « In Vitro Development of Growing Oocytes from Fetal Mouse Oocytes: Stage-Specific Regulation by Stem Cell Factor and Granulosa Cells ». *Developmental Biology* 244 (1): 85-95. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0592>.
- Kochan, Jakub A., Emilie C. B. Desclos, Ruben Bosch, Luna Meister, Lianne E. M. Vriend, Haico van Attikum, et Przemek M. Krawczyk. 2017. « Meta-Analysis of DNA Double-Strand Break Response Kinetics ». *Nucleic Acids Research* 45 (22): 12625-37. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1128>.
- Koopman, Peter, John Gubbay, Nigel Vivian, Peter Goodfellow, et Robin Lovell-Badge. 1991. « Male Development of Chromosomally Female Mice Transgenic for Sry ». *Nature* 351 (6322): 117-21. <https://doi.org/10.1038/351117a0>.
- Koubova, Jana, Yueh-Chiang Hu, Tanmoy Bhattacharyya, Y. Q. Shirleen Soh, Mark E. Gill, Mary L. Goodheart, Cathryn A. Hogarth, Michael D. Griswold, et David C. Page. 2014. « Retinoic Acid Activates Two Pathways Required for Meiosis in Mice ». *PLoS Genetics* 10 (8): e1004541. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004541>.

- Kouznetsova, Anna, Hong Wang, Marina Bellani, R. Daniel Camerini-Otero, Rolf Jessberger, et Christer Höög. 2009. « BRCA1-Mediated Chromatin Silencing Is Limited to Oocytes with a Small Number of Asynapsed Chromosomes ». *Journal of Cell Science* 122 (Pt 14): 2446-52. <https://doi.org/10.1242/jcs.049353>.
- Kozlov, Sergei V., Mark E. Graham, Cheng Peng, Philip Chen, Phillip J. Robinson, et Martin F. Lavin. 2006. « Involvement of Novel Autophosphorylation Sites in ATM Activation ». *The EMBO Journal* 25 (15): 3504-14. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601231>.
- Kramara, J., B. Osia, et A. Malkova. 2018. « Break-Induced Replication: The Where, The Why, and The How ». *Trends in Genetics: TIG* 34 (7): 518-31. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.04.002>.
- Krejci, Lumir, Veronika Altmannova, Mario Spirek, et Xiaolan Zhao. 2012. « Homologous Recombination and Its Regulation ». *Nucleic Acids Research* 40 (13): 5795-5818. <https://doi.org/10.1093/nar/gks270>.
- Kropáčová, Katarína, Lucia Slovinská, et Eva Misúrová. 2002. « Cytogenetic Changes in the Liver of Progeny of Irradiated Male Rats ». *Journal of Radiation Research* 43 (2): 125-33. <https://doi.org/10.1269/jrr.43.125>.
- Kumar, T. Rajendra, Yan Wang, Naifang Lu, et Martin M. Matzuk. 1997. « Follicle Stimulating Hormone Is Required for Ovarian Follicle Maturation but Not Male Fertility ». *Nature Genetics* 15 (2): 201-4. <https://doi.org/10.1038/ng0297-201>.
- Kusumoto, Rika, Lala Dawut, Caterina Marchetti, Jae Wan Lee, Alessandro Vindigni, Dale Ramsden, et Vilhelm A. Bohr. 2008. « Werner Protein Cooperates with the XRCC4-DNA Ligase IV Complex in End-Processing ». *Biochemistry* 47 (28): 7548-56. <https://doi.org/10.1021/bi702325t>.
- Lake, Cathleen M., et R. Scott Hawley. 2013. « RNF212 Marks the Spot ». *Nature Genetics* 45 (3): 228-29. <https://doi.org/10.1038/ng.2559>.
- Lam, Isabel, et Scott Keeney. 2014. « Mechanism and Regulation of Meiotic Recombination Initiation ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (1): a016634. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016634>.

- Lammers, J. H., H. H. Offenberg, M. van Aalderen, A. C. Vink, A. J. Dietrich, et C. Heyting. 1994. « The Gene Encoding a Major Component of the Lateral Elements of Synaptonemal Complexes of the Rat Is Related to X-Linked Lymphocyte-Regulated Genes ». *Molecular and Cellular Biology* 14 (2): 1137-46. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.2.1137-1146.1994>.
- Lange, Julian, Jing Pan, Francesca Cole, Michael P. Thelen, Maria Jasin, et Scott Keeney. 2011. « ATM Controls Meiotic Double-Strand-Break Formation ». *Nature* 479 (7372): 237-40. <https://doi.org/10.1038/nature10508>.
- Lao, Jessica P., Veronica Cloud, Chu-Chun Huang, Jennifer Grubb, Drew Thacker, Chih-Ying Lee, Michael E. Dresser, Neil Hunter, et Douglas K. Bishop. 2013. « Meiotic Crossover Control by Concerted Action of Rad51-Dmc1 in Homolog Template Bias and Robust Homeostatic Regulation ». *PLoS Genetics* 9 (12): e1003978. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003978>.
- Lavin, M. F. 2007. « ATM and the Mre11 Complex Combine to Recognize and Signal DNA Double-Strand Breaks ». *Oncogene* 26 (56): 7749-58. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210880>.
- Lawson, K. A., N. R. Dunn, B. A. Roelen, L. M. Zeinstra, A. M. Davis, C. V. Wright, J. P. Korving, et B. L. Hogan. 1999. « Bmp4 Is Required for the Generation of Primordial Germ Cells in the Mouse Embryo ». *Genes & Development* 13 (4): 424-36. <https://doi.org/10.1101/gad.13.4.424>.
- Le Rolle, Morgane, Filippo Massa, Pam Siggers, Laurent Turchi, Agnès Loubat, Bon-Kyoung Koo, Hans Clevers, et al. 2021. « Arrest of WNT/ β -Catenin Signaling Enables the Transition from Pluripotent to Differentiated Germ Cells in Mouse Ovaries ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118 (30): e2023376118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2023376118>.
- Lebedeva, Lyubov A., Konstantin V. Yakovlev, Eugene N. Kozlov, Paul Schedl, Girish Deshpande, et Yulii V. Shidlovskii. 2018. « Transcriptional Quiescence in Primordial Germ Cells ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 53 (6): 579-95. <https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1506733>.

- Leblond, C. P., et M. El-Alfy. 1998. « The Eleven Stages of the Cell Cycle, with Emphasis on the Changes in Chromosomes and Nucleoli during Interphase and Mitosis ». *The Anatomical Record* 252 (3): 426-43. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199811\)252:3<426::AID-AR11>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199811)252:3<426::AID-AR11>3.0.CO;2-3).
- Lee, Hye-Jeong, Ji Young Kim, Ji Eun Park, Yong-Dal Yoon, Benjamin K. Tsang, et Jong-Min Kim. 2016. « Induction of Fas-Mediated Apoptosis by Interferon- γ Is Dependent on Granulosa Cell Differentiation and Follicular Maturation in the Rat Ovary ». *Development & Reproduction* 20 (4): 315-29. <https://doi.org/10.12717/DR.2016.20.4.315>.
- Lee, Ja Yil, Tsuyoshi Terakawa, Zhi Qi, Justin B. Steinfeld, Sy Redding, YoungHo Kwon, William A. Gaines, Weixing Zhao, Patrick Sung, et Eric C. Greene. 2015. « DNA RECOMBINATION. Base Triplet Stepping by the Rad51/RecA Family of Recombinases ». *Science (New York, N.Y.)* 349 (6251): 977-81. <https://doi.org/10.1126/science.aab2666>.
- Lee, J.-H. 2005. « ATM Activation by DNA Double-Strand Breaks Through the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex ». *Science* 308 (5721): 551-54. <https://doi.org/10.1126/science.1108297>.
- Lei, L., et A. C. Spradling. 2016. « Mouse Oocytes Differentiate through Organelle Enrichment from Sister Cyst Germ Cells ». *Science* 352 (6281): 95-99. <https://doi.org/10.1126/science.aad2156>.
- Lei, Lei, et Allan C. Spradling. 2013. « Mouse Primordial Germ Cells Produce Cysts That Partially Fragment Prior to Meiosis ». *Development (Cambridge, England)* 140 (10): 2075-81. <https://doi.org/10.1242/dev.093864>.
- Leporrier, M., P. von Theobald, J. L. Roffe, et G. Muller. 1987. « A New Technique to Protect Ovarian Function before Pelvic Irradiation. Heterotopic Ovarian Autotransplantation ». *Cancer* 60 (9): 2201-4. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19871101\)60:9<2201::aid-cnrcr2820600915>3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19871101)60:9<2201::aid-cnrcr2820600915>3.0.co;2-z).
- Leung, S. F., S. Y. Tsao, P. M. Teo, P. H. Choi, et W. C. Shiu. 1991. « Ovarian Ablation Failures by Radiation: A Comparison of Two Dose Schedules ». *The British Journal of Radiology* 64 (762): 537-38. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-64-762-537>.

- Li, Gang, Frederick W. Alt, Hwei-Ling Cheng, James W. Brush, Peter H. Goff, Mike M. Murphy, Sonia Franco, Yu Zhang, et Shan Zha. 2008. « Lymphocyte-Specific Compensation for XLF/Cernunnos End-Joining Functions in V(D)J Recombination ». *Molecular Cell* 31 (5): 631-40. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.07.017>.
- Li, Qianyan, et JoAnne Engebrecht. 2021. « BRCA1 and BRCA2 Tumor Suppressor Function in Meiosis ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (avril): 668309. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.668309>.
- Lindahl, T. 1993. « Instability and Decay of the Primary Structure of DNA ». *Nature* 362 (6422): 709-15. <https://doi.org/10.1038/362709a0>.
- Liskay, R. M. 1977. « Absence of a Measurable G2 Phase in Two Chinese Hamster Cell Lines. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (4): 1622-25. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.4.1622>.
- Little, Tara M., et Philip W. Jordan. 2020. « PLK1 Is Required for Chromosome Compaction and Microtubule Organization in Mouse Oocytes ». Édité par Claire Walczak. *Molecular Biology of the Cell* 31 (12): 1206-17. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-12-0701>.
- Liu, Kai, Mingying Zheng, Rui Lu, Jiaying Du, Qi Zhao, Zugui Li, Yuwei Li, et Shiwu Zhang. 2020. « The Role of CDC25C in Cell Cycle Regulation and Clinical Cancer Therapy: A Systematic Review ». *Cancer Cell International* 20: 213. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01304-w>.
- Livera, Gabriel, Béatrice Petre-Lazar, Marie-Justine Guerquin, Emilie Trautmann, Hervé Coffigny, et René Habert. 2008. « P63 Null Mutation Protects Mouse Oocytes from Radio-Induced Apoptosis ». *Reproduction (Cambridge, England)* 135 (1): 3-12. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0054>.
- Livera, Gabriel, Rustem Uzbekov, Peggy Jarrier, Sophie Fouchécourt, Clotilde Duquenne, Anne-Simone Parent, Jean-Christophe Marine, et Philippe Monget. 2016. « Loss of Oocytes Due to Conditional Ablation of *Murine Double Minute 2 (Mdm2)* Gene Is P53-Dependent and Results in Female Sterility ». *FEBS Letters* 590 (16): 2566-74. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12275>.

- Lord, Christopher J., et Alan Ashworth. 2012. « The DNA Damage Response and Cancer Therapy ». *Nature* 481 (7381): 287-94. <https://doi.org/10.1038/nature10760>.
- Lucifero, Diana, Mellissa R. W. Mann, Marisa S. Bartolomei, et Jacquetta M. Trasler. 2004. « Gene-Specific Timing and Epigenetic Memory in Oocyte Imprinting ». *Human Molecular Genetics* 13 (8): 839-49. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh104>.
- Lushbaugh, C. C., et G. W. Casarett. 1976. « The Effects of Gonadal Irradiation in Clinical Radiation Therapy: A Review ». *Cancer* 37 (2 Suppl): 1111-25. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197602\)37:2+<1111::aid-cncr2820370821>3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197602)37:2+<1111::aid-cncr2820370821>3.0.co;2-e).
- Ma, Jun-Yu, Sen Li, Lei-Ning Chen, Heide Schatten, Xiang-Hong Ou, et Qing-Yuan Sun. 2020. « Why Is Oocyte Aneuploidy Increased with Maternal Aging? » *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao* 47 (11): 659-71. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2020.04.003>.
- Macaulay, Angus D., Isabelle Gilbert, Julieta Caballero, Rodrigo Barreto, Eric Fournier, Prudencio Tossou, Marc-André Sirard, et al. 2014. « The Gametic Synapse: RNA Transfer to the Bovine Oocyte1 ». *Biology of Reproduction* 91 (4). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.119867>.
- Mahadevaiah, Shantha K., Déborah Bourc'his, Dirk G. de Rooij, Timothy H. Bestor, James M. A. Turner, et Paul S. Burgoyne. 2008. « Extensive Meiotic Asynapsis in Mice Antagonises Meiotic Silencing of Unsynapsed Chromatin and Consequently Disrupts Meiotic Sex Chromosome Inactivation ». *The Journal of Cell Biology* 182 (2): 263-76. <https://doi.org/10.1083/jcb.200710195>.
- Mahdavi, Seyed Rabie, Mahdieh Tutuni, Bagher Farhood, Nahid Nafisi, Shiva Ghasemi, Hamidreza Mirzaee, Soraya Ahmadi, et Ahad Alizadeh. 2019. « Measurement of Peripheral Dose to the Pelvic Region and the Associated Risk for Cancer Development after Breast Intraoperative Electron Radiation Therapy ». *Journal of Radiological Protection: Official Journal of the Society for Radiological Protection* 39 (1): 278-91. <https://doi.org/10.1088/1361-6498/aafdc8>.
- Maheshwari, A., et P. A. Fowler. 2008. « Primordial Follicular Assembly in Humans – Revisited ». *Zygote* 16 (4): 285-96. <https://doi.org/10.1017/S0967199408004802>.

- Mamsen, L. Salto, M. C. Lutterodt, E. W. Andersen, A. G. Byskov, et C. Yding Andersen. 2011. « Germ Cell Numbers in Human Embryonic and Fetal Gonads during the First Two Trimesters of Pregnancy: Analysis of Six Published Studies ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 26 (8): 2140-45. <https://doi.org/10.1093/humrep/der149>.
- Mao, Z, M Bozzella, A Seluanov, et V Gorbunova. 2008. « Comparison of Nonhomologous End Joining and Homologous Recombination in Human Cells ». *DNA Repair* 7 (10): 1765-71. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.06.018>.
- Marcinkiewicz, J. L., A. Krishna, C. M. Cheung, et P. F. Terranova. 1994. « Oocytic Tumor Necrosis Factor Alpha: Localization in the Neonatal Ovary and throughout Follicular Development in the Adult Rat ». *Biology of Reproduction* 50 (6): 1251-60. <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.6.1251>.
- Marine, J.-C., et G. Lozano. 2010. « Mdm2-Mediated Ubiquitylation: P53 and Beyond ». *Cell Death and Differentiation* 17 (1): 93-102. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.68>.
- Marklund, Anna, Frida E. Lundberg, Sandra Eloranta, Elham Hedayati, Karin Pettersson, et Kenny A. Rodriguez-Wallberg. 2021. « Reproductive Outcomes After Breast Cancer in Women With vs Without Fertility Preservation ». *JAMA Oncology* 7 (1): 86. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.5957>.
- Marková, E., N. Schultz, et I. Y. Belyaev. 2007. « Kinetics and Dose-Response of Residual 53BP1/Gamma-H2AX Foci: Co-Localization, Relationship with DSB Repair and Clonogenic Survival ». *International Journal of Radiation Biology* 83 (5): 319-29. <https://doi.org/10.1080/09553000601170469>.
- Matsuda, Fuko, Naoko Inoue, Noboru Manabe, et Satoshi Ohkura. 2012. « Follicular Growth and Atresia in Mammalian Ovaries: Regulation by Survival and Death of Granulosa Cells ». *The Journal of Reproduction and Development* 58 (1): 44-50. <https://doi.org/10.1262/jrd.2011-012>.

- Mayeur, Anne, Vincent Puy, Victoria Windal, Laetitia Hesters, Vanessa Gallot, Alexandra Benoit, Michael Grynberg, Charlotte Sonigo, et Nelly Frydman. 2021. « Live Birth Rate after Use of Cryopreserved Oocytes or Embryos at the Time of Cancer Diagnosis in Female Survivors: A Retrospective Study of Ten Years of Experience ». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, avril. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02168-3>.
- Mazaud Guittot, Séverine, Celine J. Guigon, Noëlline Coudouel, et Solange Magre. 2006. « Consequences of Fetal Irradiation on Follicle Histogenesis and Early Follicle Development in Rat Ovaries ». *Biology of Reproduction* 75 (5): 749-59. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.050633>.
- Mazaud, Séverine, Céline J. Guigon, Anne Lozach, Noëlline Coudouel, Maguelone G. Forest, Hervé Coffigny, et Solange Magre. 2002. « Establishment of the Reproductive Function and Transient Fertility of Female Rats Lacking Primordial Follicle Stock after Fetal γ -Irradiation ». *Endocrinology* 143 (12): 4775-87. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220464>.
- Mazaud, Séverine, Romain Guyot, Céline J. Guigon, Noëlline Coudouel, Brigitte Le Magueresse-Battistoni, et Solange Magre. 2005. « Basal Membrane Remodeling during Follicle Histogenesis in the Rat Ovary: Contribution of Proteinases of the MMP and PA Families ». *Developmental Biology* 277 (2): 403-16. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.10.001>.
- Mazerbourg, S., C. A. Bondy, J. Zhou, et P. Monget. 2003. « The Insulin-like Growth Factor System: A Key Determinant Role in the Growth and Selection of Ovarian Follicles? A Comparative Species Study ». *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene* 38 (4): 247-58. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00440.x>.
- McGee, E. A., et A. J. Hsueh. 2000. « Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles ». *Endocrine Reviews* 21 (2): 200-214. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0394>.
- McLaren, A. 1991. « Sex Determination in Mammals ». *Oxford Reviews of Reproductive Biology* 13: 1-33.

- McLaren, A. 2000. « Germ and Somatic Cell Lineages in the Developing Gonad ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 163 (1-2): 3-9. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(99\)00234-8](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(99)00234-8).
- McNatty, Kenneth P., Jennifer L. Juengel, Karen L. Reader, Stan Lun, Samu Myllymaa, Steve B. Lawrence, Andrea Western, et al. 2005. « Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 Co-Operate to Regulate Granulosa Cell Function ». *Reproduction (Cambridge, England)* 129 (4): 473-80. <https://doi.org/10.1530/rep.1.0511>.
- McVey, Mitch, Varandt Y. Khodaverdian, Damon Meyer, Paula Gonçalves Cerqueira, et Wolf-Dietrich Heyer. 2016. « Eukaryotic DNA Polymerases in Homologous Recombination ». *Annual Review of Genetics* 50 (novembre): 393-421. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035243>.
- Mehta, Anuja, et James E. Haber. 2014. « Sources of DNA Double-Strand Breaks and Models of Recombinational DNA Repair ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (9): a016428. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016428>.
- Meirow, D., et D. Nugent. 2001. « The Effects of Radiotherapy and Chemotherapy on Female Reproduction ». *Human Reproduction Update* 7 (6): 535-43. <https://doi.org/10.1093/humupd/7.6.535>.
- Menke, Douglas B., Jana Koubova, et David C. Page. 2003. « Sexual Differentiation of Germ Cells in XX Mouse Gonads Occurs in an Anterior-to-Posterior Wave ». *Developmental Biology* 262 (2): 303-12. [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(03\)00391-9](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00391-9).
- Menon, Vijay, et Lawrence F. Povirk. 2017. « XLF/Cernunnos: An Important but Puzzling Participant in the Nonhomologous End Joining DNA Repair Pathway ». *DNA Repair* 58 (octobre): 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.08.003>.
- Merchant-Larios, H., et J. Chimal-Monroy. 1989. « The Ontogeny of Primordial Follicles in the Mouse Ovary ». *Progress in Clinical and Biological Research* 296: 55-63.
- Mermillod, P., et R. Marchal. 1999. « [Oocyte of domestic mammals: a model for the study of *in vitro* maturation] ». *Contraception, Fertilité, Sexualité (1992)* 27 (6): 440-48.

- Molyneaux, K. A., J. Stallock, K. Schaible, et C. Wylie. 2001. « Time-Lapse Analysis of Living Mouse Germ Cell Migration ». *Developmental Biology* 240 (2): 488-98. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0436>.
- Molyneaux, Kathleen A., Hélène Zinszner, Prabhat S. Kunwar, Kyle Schaible, Jürg Stebler, Mary Jean Sunshine, William O'Brien, et al. 2003. « The Chemokine SDF1/CXCL12 and Its Receptor CXCR4 Regulate Mouse Germ Cell Migration and Survival ». *Development (Cambridge, England)* 130 (18): 4279-86. <https://doi.org/10.1242/dev.00640>.
- Monget, Philippe, Julien Bobe, Alain Gougeon, Stéphane Fabre, Danielle Monniaux, et Rozenn Dalbès-Tran. 2012. « The Ovarian Reserve in Mammals: A Functional and Evolutionary Perspective ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 356 (1-2): 2-12. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.046>.
- Monniaux, D., A. Caraty, F. Clement, R. Dalbès-Tran, J. Dupont, S. Fabre, N. Gerard, P. Mermillod, P. Monget, et S. Uzbekova. 2009. « Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères ». *INRAE Productions Animales* 22 (2): 59-76. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2009.22.2.3335>.
- Monniaux, D., C. Huet, N. Besnard, F. Clément, M. Bosc, C. Pisselet, P. Monget, et J. C. Mariana. 1997. « Follicular Growth and Ovarian Dynamics in Mammals ». *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* 51: 3-23.
- Monniaux, Danielle, Frédérique Clément, Rozenn Dalbès-Tran, Anthony Estienne, Stéphane Fabre, Camille Mansanet, et Philippe Monget. 2014. « The Ovarian Reserve of Primordial Follicles and the Dynamic Reserve of Antral Growing Follicles: What Is the Link? » *Biology of Reproduction* 90 (4): 85. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.117077>.
- Mordes, D. A., G. G. Glick, R. Zhao, et D. Cortez. 2008. « TopBP1 Activates ATR through ATRIP and a PIKK Regulatory Domain ». *Genes & Development* 22 (11): 1478-89. <https://doi.org/10.1101/gad.1666208>.

- Moria, Anwar, Mausumi Das, Fady Shehata, Hananel Holzer, Weon-Young Son, et Togas Tulandi. 2011. « Ovarian Reserve and Oocyte Maturity in Women with Malignancy Undergoing *in Vitro* Maturation Treatment ». *Fertility and Sterility* 95 (5): 1621-23. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.12.041>.
- Morice, P., L. Juncker, A. Rey, J. El-Hassan, C. Haie-Meder, et D. Castaigne. 2000. « Ovarian Transposition for Patients with Cervical Carcinoma Treated by Radiosurgical Combination ». *Fertility and Sterility* 74 (4): 743-48. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(00\)01500-4](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(00)01500-4).
- Mork, Lindsey, Danielle M. Maatouk, Jill A. McMahon, Jin Jin Guo, Pumin Zhang, Andrew P. McMahon, et Blanche Capel. 2012. « Temporal Differences in Granulosa Cell Specification in the Ovary Reflect Distinct Follicle Fates in Mice ». *Biology of Reproduction* 86 (2): 37. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095208>.
- Motta, P. M., et S. Makabe. 1982. « Development of the Ovarian Surface and Associated Germ Cells in the Human Fetus. A Correlated Study by Scanning and Transmission Electron Microscopy ». *Cell and Tissue Research* 226 (3): 493-510. <https://doi.org/10.1007/BF00214779>.
- Motta, P. M., S. A. Nottola, et S. Makabe. 1997. « Natural History of the Female Germ Cell from Its Origin to Full Maturation through Prenatal Ovarian Development ». *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 75 (1): 5-10. [https://doi.org/10.1016/s0301-2115\(97\)00216-9](https://doi.org/10.1016/s0301-2115(97)00216-9).
- Moynahan, Mary Ellen, et Maria Jasin. 2010. « Mitotic Homologous Recombination Maintains Genomic Stability and Suppresses Tumorigenesis ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (3): 196-207. <https://doi.org/10.1038/nrm2851>.
- Myers, Michelle, F. Hamish Morgan, Seng H. Liew, Nadeen Zerafa, Thilini Upeksha Gamage, Mai Sarraj, Michele Cook, et al. 2014. « PUMA Regulates Germ Cell Loss and Primordial Follicle Endowment in Mice ». *Reproduction (Cambridge, England)* 148 (2): 211-19. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0666>.
- Nakaki, Fumio, Katsuhiko Hayashi, Hiroshi Ohta, Kazuki Kurimoto, Yukihiro Yabuta, et Mitinori Saitou. 2013. « Induction of Mouse Germ-Cell Fate by Transcription Factors *in Vitro* ». *Nature* 501 (7466): 222-26. <https://doi.org/10.1038/nature12417>.

- Nakamura, Kyosuke, Giulia Saredi, Jordan R. Becker, Benjamin M. Foster, Nhung V. Nguyen, Tracey E. Beyer, Laura C. Cesa, et al. 2019. « H4K20me0 Recognition by BRCA1-BARD1 Directs Homologous Recombination to Sister Chromatids ». *Nature Cell Biology* 21 (3): 311-18. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0282-9>.
- Nam, Edward A., et David Cortez. 2011. « ATR Signalling: More than Meeting at the Fork ». *Biochemical Journal* 436 (3): 527-36. <https://doi.org/10.1042/BJ20102162>.
- Nénot, Jean-Claude. 2009. « Recommandations 2007 de la Commission internationale de protection radiologique ». TEC&DOC. https://www.irsn.fr/FR/Larecherche/publications-documentation/collection-ouvrages-IRSN/Documents/CIPR_103.pdf.
- Nguyen, Daniel H., Rebecca G. Jaszczak, et Diana J. Laird. 2019. « Heterogeneity of Primordial Germ Cells ». In *Current Topics in Developmental Biology*, 135:155-201. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.04.009>.
- Nguyen, Quynh-Nhu, Nadeen Zerafa, Jock K. Findlay, Martha Hickey, et Karla J. Hutt. 2021. « DNA Repair in Primordial Follicle Oocytes Following Cisplatin Treatment ». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 38 (6): 1405-17. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02184-3>.
- Nimonkar, Amitabh V., Jochen Genschel, Eri Kinoshita, Piotr Polaczek, Judith L. Campbell, Claire Wyman, Paul Modrich, et Stephen C. Kowalczykowski. 2011. « BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN Constitute Two DNA End Resection Machineries for Human DNA Break Repair ». *Genes & Development* 25 (4): 350-62. <https://doi.org/10.1101/gad.2003811>.
- Norris, Rachael P., Marina Freudzon, Lisa M. Mehlmann, Ann E. Cowan, Alexander M. Simon, David L. Paul, Paul D. Lampe, et Laurinda A. Jaffe. 2008. « Luteinizing Hormone Causes MAP Kinase-Dependent Phosphorylation and Closure of Connexin 43 Gap Junctions in Mouse Ovarian Follicles: One of Two Paths to Meiotic Resumption ». *Development (Cambridge, England)* 135 (19): 3229-38. <https://doi.org/10.1242/dev.025494>.
- Oakberg, Eugene F. 1956. « Duration of Spermatogenesis in the Mouse and Timing of Stages of the Cycle of the Seminiferous Epithelium ». *American Journal of Anatomy* 99 (3): 507-16. <https://doi.org/10.1002/aja.1000990307>.

- Offenberg, H. H., J. A. Schalk, R. L. Meuwissen, M. van Aalderen, H. A. Kester, A. J. Dietrich, et C. Heyting. 1998. « SCP2: A Major Protein Component of the Axial Elements of Synaptonemal Complexes of the Rat ». *Nucleic Acids Research* 26 (11): 2572-79. <https://doi.org/10.1093/nar/26.11.2572>.
- Oktaý, Kutluk, Volkan Turan, Giuliano Bedoschi, Fernanda S. Pacheco, et Fred Moy. 2015. « Fertility Preservation Success Subsequent to Concurrent Aromatase Inhibitor Treatment and Ovarian Stimulation in Women With Breast Cancer ». *Journal of Clinical Oncology* 33 (22): 2424-29. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.3723>.
- Orisaka, Makoto, Yumiko Miyazaki, Aya Shirafuji, Chiyo Tamamura, Hideaki Tsuyoshi, Benjamin K. Tsang, et Yoshio Yoshida. 2021. « The Role of Pituitary Gonadotropins and Intraovarian Regulators in Follicle Development: A Mini-Review ». *Reproductive Medicine and Biology* 20 (2): 169-75. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12371>.
- Pacheco, Sarai, Andros Maldonado-Linares, Marina Marcet-Ortega, Cristina Rojas, Ana Martínez-Marchal, Judit Fuentes-Lazaro, Julian Lange, et al. 2018. « ATR Is Required to Complete Meiotic Recombination in Mice ». *Nature Communications* 9 (1): 2622. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04851-z>.
- Pajokh, M., F. Mesbah, H. Bordbar, et T. Talaei-Khozani. 2018. « Different Cell Death Types Determination in Juvenile Mice Ovarian Follicles ». *Iranian Journal of Veterinary Research* 19 (4): 298-303.
- Pajokh, Mojdeh, Tahereh Talaei-Khozani, Hossein Bordbar, et Fakhroddin Mesbah. 2019. « Apoptosis, Autophagy, and Necrosis in Murine Embryonic Gonadal Ridges and Neonatal Ovaries: An Animal Model ». *Iranian Journal of Medical Sciences* 44 (1): 35-43.
- Pan, Hua, Marilyn J. O'brien, Karen Wigglesworth, John J. Eppig, et Richard M. Schultz. 2005. « Transcript Profiling during Mouse Oocyte Development and the Effect of Gonadotropin Priming and Development *in Vitro* ». *Developmental Biology* 286 (2): 493-506. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.08.023>.

- Pan, Jing, Mariko Sasaki, Ryan Kniewel, Hajime Murakami, Hannah G. Blitzblau, Sam E. Tischfield, Xuan Zhu, et al. 2011. « A Hierarchical Combination of Factors Shapes the Genome-Wide Topography of Yeast Meiotic Recombination Initiation ». *Cell* 144 (5): 719-31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.009>.
- Pangas, Stephanie A., Youngsok Choi, Daniel J. Ballow, Yangu Zhao, Heiner Westphal, Martin M. Matzuk, et Aleksandar Rajkovic. 2006. « Oogenesis Requires Germ Cell-Specific Transcriptional Regulators Sohlh1 and Lhx8 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (21): 8090-95. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601083103>.
- Paredes, Alfonso, Cecilia Garcia-Rudaz, Bredford Kerr, Veronica Tapia, Gregory A. Dissen, Maria E. Costa, Anda Cornea, et Sergio R. Ojeda. 2005. « Loss of Synaptonemal Complex Protein-1, a Synaptonemal Complex Protein, Contributes to the Initiation of Follicular Assembly in the Developing Rat Ovary ». *Endocrinology* 146 (12): 5267-77. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0965>.
- Parisi, S., M. J. McKay, M. Molnar, M. A. Thompson, P. J. van der Spek, E. van Drunen-Schoenmaker, R. Kanaar, E. Lehmann, J. H. Hoeijmakers, et J. Kohli. 1999. « Rec8p, a Meiotic Recombination and Sister Chromatid Cohesion Phosphoprotein of the Rad21p Family Conserved from Fission Yeast to Humans ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (5): 3515-28. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.5.3515>.
- Park, Young Bong, Marcel Hohl, Michał Padjasek, Eunyoung Jeong, Kyeong Sik Jin, Artur Krężel, John H J Petrini, et Yunje Cho. 2017. « Eukaryotic Rad50 Functions as a Rod-Shaped Dimer ». *Nature Structural & Molecular Biology* 24 (3): 248-57. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3369>.
- Paull, Tanya T. 2021. « Reconsidering Pathway Choice: A Sequential Model of Mammalian DNA Double-Strand Break Pathway Decisions ». *Current Opinion in Genetics & Development* 71 (décembre): 55-62. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2021.06.011>.
- Paulsen, Renee D., et Karlene A. Cimprich. 2007. « The ATR Pathway: Fine-Tuning the Fork ». *DNA Repair* 6 (7): 953-66. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.02.015>.
- Pelliniemi, Lauri J., et Lauri Lauteala. 1981. « Development of Sexual Dimorphism in the Embryonic Gonad ». *Human Genetics* 58 (1). <https://doi.org/10.1007/BF00284151>.

- Pepling, M. E., et A. C. Spradling. 1998. « Female Mouse Germ Cells Form Synchronously Dividing Cysts ». *Development (Cambridge, England)* 125 (17): 3323-28.
- Pepling, M. E., et A. C. Spradling. 2001. « Mouse Ovarian Germ Cell Cysts Undergo Programmed Breakdown to Form Primordial Follicles ». *Developmental Biology* 234 (2): 339-51. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0269>.
- Pepling, Melissa E. 2012. « Follicular Assembly: Mechanisms of Action ». *Reproduction (Cambridge, England)* 143 (2): 139-49. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0299>.
- Perez, G. I., R. Robles, C. M. Knudson, J. A. Flaws, S. J. Korsmeyer, et J. L. Tilly. 1999. « Prolongation of Ovarian Lifespan into Advanced Chronological Age by Bax-Deficiency ». *Nature Genetics* 21 (2): 200-203. <https://doi.org/10.1038/5985>.
- Pesce, M., M. G. Farrace, M. Piacentini, S. Dolci, et M. De Felici. 1993. « Stem Cell Factor and Leukemia Inhibitory Factor Promote Primordial Germ Cell Survival by Suppressing Programmed Cell Death (Apoptosis) ». *Development (Cambridge, England)* 118 (4): 1089-94.
- Pesty, Arlette, Mireille Doussau, Jean-Baptiste Lahaye, et Brigitte Lefèvre. 2010. « Whole-Body or Isolated Ovary (60)Co Irradiation: Effects on *in Vivo* and *in Vitro* Folliculogenesis and Oocyte Maturation ». *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)* 29 (1): 93-98. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.10.007>.
- Petes, T. D. 2001. « Meiotic Recombination Hot Spots and Cold Spots ». *Nature Reviews. Genetics* 2 (5): 360-69. <https://doi.org/10.1038/35072078>.
- Piganeau, Marion, Hind Ghezraoui, Anne De Cian, Lionel Guittat, Mark Tomishima, Loic Perrouault, Oliver René, et al. 2013. « Cancer Translocations in Human Cells Induced by Zinc Finger and TALE Nucleases ». *Genome Research* 23 (7): 1182-93. <https://doi.org/10.1101/gr.147314.112>.
- Plug, A. W., A. H. Peters, K. S. Keegan, M. F. Hoekstra, P. de Boer, et T. Ashley. 1998. « Changes in Protein Composition of Meiotic Nodules during Mammalian Meiosis ». *Journal of Cell Science* 111 (Pt 4) (février): 413-23.

- Polishuk, Z., et H. Schreiber. 1956. « The Effect of X-Rays on the Ovaries in Childhood and Adolescence ». *The British Journal of Radiology* 29 (348): 687. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-29-348-687>.
- Porrás-Gómez, Tania Janeth, et Norma Moreno-Mendoza. 2017. « Neo-Oogenesis in Mammals ». *Zygote* 25 (4): 404-22. <https://doi.org/10.1017/S0967199417000363>.
- Pouget, J. P., J. L. Ravanat, T. Douki, M. J. Richard, et J. Cadet. 1999. « Measurement of DNA Base Damage in Cells Exposed to Low Doses of Gamma-Radiation: Comparison between the HPLC-EC and Comet Assays ». *International Journal of Radiation Biology* 75 (1): 51-58. <https://doi.org/10.1080/095530099140807>.
- Poulain, Marine, Nelly Frydman, Sophie Tourpin, Vincent Muczynski, Vincent Mucsynski, Benoit Souquet, Alexandra Benachi, René Habert, Virginie Rouiller-Fabre, et Gabriel Livera. 2014. « Involvement of Doublesex and Mab-3-Related Transcription Factors in Human Female Germ Cell Development Demonstrated by Xenograft and Interference RNA Strategies ». *Molecular Human Reproduction* 20 (10): 960-71. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau058>.
- Prieto, I., J. A. Suja, N. Pezzi, L. Kremer, C. Martínez-A, J. S. Rufas, et J. L. Barbero. 2001. « Mammalian STAG3 Is a Cohesin Specific to Sister Chromatid Arms in Meiosis I ». *Nature Cell Biology* 3 (8): 761-66. <https://doi.org/10.1038/35087082>.
- Puy, Vincent, Vilma Barroca, Sébastien Messiaen, Véronique Ménard, Claire Torres, Caroline Devanand, Delphine Moison, et al. 2021. « Mouse Model of Radiation-Induced Premature Ovarian Insufficiency Reveals Compromised Oocyte Quality: Implications for Fertility Preservation ». *Reproductive BioMedicine Online*, juillet, S1472648321003114. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.06.027>.
- Qiao, Huanyu, H. B. D. Prasada Rao, Yan Yun, Sumit Sandhu, Jared H. Fong, Manali Sapre, Michael Nguyen, et al. 2018. « Impeding DNA Break Repair Enables Oocyte Quality Control ». *Molecular Cell* 72 (2): 211-221.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.031>.
- Rabinovici, J., et R. B. Jaffe. 1990. « Development and Regulation of Growth and Differentiated Function in Human and Subhuman Primate Fetal Gonads ». *Endocrine Reviews* 11 (4): 532-57. <https://doi.org/10.1210/edrv-11-4-532>.

- Rajah, R., et G. S. Sundaram. 1994. « Protein Distribution and Gene Expression of Collagen Type IV in the Neonatal Rat Ovary during Follicle Formation ». *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)* 40 (6): 769-80.
- Rajkovic, Aleksandar, Stephanie A. Pangas, Daniel Ballow, Nobuhiro Suzumori, et Martin M. Matzuk. 2004. « NOBOX Deficiency Disrupts Early Folliculogenesis and Oocyte-Specific Gene Expression ». *Science (New York, N.Y.)* 305 (5687): 1157-59. <https://doi.org/10.1126/science.1099755>.
- Rass, Emilie, Anastazja Grabarz, Isabelle Plo, Jean Gautier, Pascale Bertrand, et Bernard S. Lopez. 2009. « Role of Mre11 in Chromosomal Nonhomologous End Joining in Mammalian Cells ». *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (8): 819-24. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1641>.
- Ratts, V. S., J. A. Flaws, R. Kolp, C. M. Sorenson, et J. L. Tilly. 1995. « Ablation of Bcl-2 Gene Expression Decreases the Numbers of Oocytes and Primordial Follicles Established in the Post-Natal Female Mouse Gonad ». *Endocrinology* 136 (8): 3665-68. <https://doi.org/10.1210/endo.136.8.7628407>.
- Reddy, Pradeep, Lian Liu, Deepak Adhikari, Krishna Jagarlamudi, Singareddy Rajareddy, Yan Shen, Chun Du, et al. 2008. « Oocyte-Specific Deletion of Pten Causes Premature Activation of the Primordial Follicle Pool ». *Science (New York, N.Y.)* 319 (5863): 611-13. <https://doi.org/10.1126/science.1152257>.
- Reddy, Pradeep, Lijun Shen, Chong Ren, Karin Boman, Eva Lundin, Ulrika Ottander, Peter Lindgren, Yi-Xun Liu, Qing-Yuan Sun, et Kui Liu. 2005. « Activation of Akt (PKB) and Suppression of FKHL1 in Mouse and Rat Oocytes by Stem Cell Factor during Follicular Activation and Development ». *Developmental Biology* 281 (2): 160-70. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.02.013>.
- Reid, Dylan A., Sarah Keegan, Alejandra Leo-Macias, Go Watanabe, Natasha T. Strande, Howard H. Chang, Betul Akgol Oksuz, et al. 2015. « Organization and Dynamics of the Nonhomologous End-Joining Machinery during DNA Double-Strand Break Repair ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (20): E2575-84. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420115112>.

- Reinholdt, Laura G., et John C. Schimenti. 2005. « Mei1 Is Epistatic to Dmc1 during Mouse Meiosis ». *Chromosoma* 114 (2): 127-34. <https://doi.org/10.1007/s00412-005-0346-4>.
- Renaudin, Xavier, et Filippo Rosselli. 2020. « The FANC/BRCA Pathway Releases Replication Blockades by Eliminating DNA Interstrand Cross-Links ». *Genes* 11 (5): 585. <https://doi.org/10.3390/genes11050585>.
- Revenkova, E., M. Eijpe, C. Heyting, B. Gross, et R. Jessberger. 2001. « Novel Meiosis-Specific Isoform of Mammalian SMC1 ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (20): 6984-98. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.20.6984-6998.2001>.
- Rich, Tina, Rachel L. Allen, et Andrew H. Wyllie. 2000. « Defying Death after DNA Damage ». *Nature* 407 (6805): 777-83. <https://doi.org/10.1038/35037717>.
- Richards, M. A., S. M. O'Reilly, A. Howell, W. D. George, I. S. Fentiman, M. A. Chaudary, D. Crowther, et R. D. Rubens. 1990. « Adjuvant Cyclophosphamide, Methotrexate, and Fluorouracil in Patients with Axillary Node-Positive Breast Cancer: An Update of the Guy's/Manchester Trial ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 8 (12): 2032-39. <https://doi.org/10.1200/JCO.1990.8.12.2032>.
- Richardson, C., et M. Jasin. 2000. « Frequent Chromosomal Translocations Induced by DNA Double-Strand Breaks ». *Nature* 405 (6787): 697-700. <https://doi.org/10.1038/35015097>.
- Rinaldi, Vera D., Ewelina Bolcun-Filas, Hiroshi Kogo, Hiroki Kurahashi, et John C. Schimenti. 2017. « The DNA Damage Checkpoint Eliminates Mouse Oocytes with Chromosome Synapsis Failure ». *Molecular Cell* 67 (6): 1026-1036.e2. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.07.027>.
- Robert, T., A. Nore, C. Brun, C. Maffre, B. Crimi, V. Guichard, H.-M. Bourbon, et B. de Massy. 2016. « The TopoVIB-Like Protein Family Is Required for Meiotic DNA Double-Strand Break Formation ». *Science* 351 (6276): 943-49. <https://doi.org/10.1126/science.aad5309>.

- Roch, Benoit, Vincent Abramowski, Julie Chaumeil, et Jean-Pierre de Villartay. 2019. « Cernunnos/Xlf Deficiency Results in Suboptimal V(D)J Recombination and Impaired Lymphoid Development in Mice ». *Frontiers in Immunology* 10 (mars): 443. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00443>.
- Rodrigues, Patricia, Darlene Limback, Lynda K. McGinnis, Carlos E. Plancha, et David F. Albertini. 2009. « Multiple Mechanisms of Germ Cell Loss in the Perinatal Mouse Ovary ». *Reproduction (Cambridge, England)* 137 (4): 709-20. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0203>.
- Rodrigues-Moreira, Sarah, Stéphanie G. Moreno, Giulia Ghinatti, Daniel Lewandowski, Françoise Hoffschir, Federica Ferri, Anne-Sophie Gallouet, et al. 2017. « Low-Dose Irradiation Promotes Persistent Oxidative Stress and Decreases Self-Renewal in Hematopoietic Stem Cells ». *Cell Reports* 20 (13): 3199-3211. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.013>.
- Rogakou, E. P., C. Boon, C. Redon, et W. M. Bonner. 1999. « Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks *in Vivo* ». *The Journal of Cell Biology* 146 (5): 905-16. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.5.905>.
- Roos, Wynand P., et Bernd Kaina. 2006. « DNA Damage-Induced Cell Death by Apoptosis ». *Trends in Molecular Medicine* 12 (9): 440-50. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.07.007>.
- Rosendahl, Mikkel, Morten Tolstrup Andersen, Elisabeth Ralfkiær, Lars Kjeldsen, Mette Klarskov Andersen, et Claus Yding Andersen. 2010. « Evidence of Residual Disease in Cryopreserved Ovarian Cortex from Female Patients with Leukemia ». *Fertility and Sterility* 94 (6): 2186-90. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.11.032>.
- Rothkamm, K., et M. Lobrich. 2003. « Evidence for a Lack of DNA Double-Strand Break Repair in Human Cells Exposed to Very Low x-Ray Doses ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (9): 5057-62. <https://doi.org/10.1073/pnas.0830918100>.
- Roux, Christophe, Clotilde Amiot, Germain Agnani, Yves Aubard, Pierre-Simon Rohrlich, et Pascal Piver. 2010. « Live Birth after Ovarian Tissue Autograft in a Patient with Sickle Cell Disease Treated by Allogeneic Bone Marrow Transplantation ». *Fertility and Sterility* 93 (7): 2413.e15-2413.e19. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.12.022>.

- Saba, Rie, Quan Wu, et Yumiko Saga. 2014. « CYP26B1 Promotes Male Germ Cell Differentiation by Suppressing STRA8-Dependent Meiotic and STRA8-Independent Mitotic Pathways ». *Developmental Biology* 389 (2): 173-81. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.02.013>.
- Saitou, Mitinori. 2009. « Germ Cell Specification in Mice ». *Current Opinion in Genetics & Development* 19 (4): 386-95. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.06.003>.
- San Filippo, Joseph, Patrick Sung, et Hannah Klein. 2008. « Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination ». *Annual Review of Biochemistry* 77: 229-57. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255>.
- Sánchez, Flor, et Johan Smitz. 2012. « Molecular Control of Oogenesis ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1822 (12): 1896-1912. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.013>.
- Sarraj, Mai A., et Ann E. Drummond. 2012. « Mammalian Foetal Ovarian Development: Consequences for Health and Disease ». *Reproduction (Cambridge, England)* 143 (2): 151-63. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0247>.
- Sasaki, Hiroyuki, et Yasuhisa Matsui. 2008. « Epigenetic Events in Mammalian Germ-Cell Development: Reprogramming and Beyond ». *Nature Reviews. Genetics* 9 (2): 129-40. <https://doi.org/10.1038/nrg2295>.
- Sasaki, Kotaro, Shihori Yokobayashi, Tomonori Nakamura, Ikuhiro Okamoto, Yukihiro Yabuta, Kazuki Kurimoto, Hiroshi Ohta, et al. 2015. « Robust *In Vitro* Induction of Human Germ Cell Fate from Pluripotent Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 17 (2): 178-94. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.06.014>.
- Satoh, M. 1991. « Histogenesis and Organogenesis of the Gonad in Human Embryos ». *Journal of Anatomy* 177 (août): 85-107.
- Satoh, Yasunari, Jun-ichi Asakawa, Mayumi Nishimura, Tony Kuo, Norio Shinkai, Harry M. Cullings, Yohei Minakuchi, et al. 2020. « Characteristics of Induced Mutations in Offspring Derived from Irradiated Mouse Spermatogonia and Mature Oocytes ». *Scientific Reports* 10 (1): 37. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56881-2>.

- Saunders, Pt, Jm Turner, M Ruggiu, M Taggart, Ps Burgoyne, D Elliott, et Hj Cooke. 2003. « Absence of mDazl produces a final block on germ cell development at meiosis ». *Reproduction*, novembre, 589-97. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1260589>.
- Sauvat, F., N. Binart, C. Poirot, et S. Sarnacki. 2009. « Preserving Fertility in Prepubertal Children ». *Hormone Research* 71 Suppl 1 (janvier): 82-86. <https://doi.org/10.1159/000178045>.
- Sawyer, Heywood R., Peter Smith, Derek A. Heath, Jennifer L. Juengel, St John Wakefield, et Kenneth P. McNatty. 2002. « Formation of Ovarian Follicles during Fetal Development in Sheep ». *Biology of Reproduction* 66 (4): 1134-50. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.4.1134>.
- Schalk, J. A., A. J. Dietrich, A. C. Vink, H. H. Offenberg, M. van Aalderen, et C. Heyting. 1998. « Localization of SCP2 and SCP3 Protein Molecules within Synaptonemal Complexes of the Rat ». *Chromosoma* 107 (8): 540-48. <https://doi.org/10.1007/s004120050340>.
- Schatz, David G., et Yanhong Ji. 2011. « Recombination Centres and the Orchestration of V(D)J Recombination ». *Nature Reviews. Immunology* 11 (4): 251-63. <https://doi.org/10.1038/nri2941>.
- Scherthan, H. 2001. « A Bouquet Makes Ends Meet ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2 (8): 621-27. <https://doi.org/10.1038/35085086>.
- Schmahl, J., E. M. Eicher, L. L. Washburn, et B. Capel. 2000. « Sry Induces Cell Proliferation in the Mouse Gonad ». *Development (Cambridge, England)* 127 (1): 65-73.
- Schultz, Linda B., Nabil H. Chehab, Asra Malikzay, et Thanos D. Halazonetis. 2000. « P53 Binding Protein 1 (53bp1) Is an Early Participant in the Cellular Response to DNA Double-Strand Breaks ». *Journal of Cell Biology* 151 (7): 1381-90. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.7.1381>.
- Scott, B. R., K. M. Gott, C. A. Potter, et J. Wilder. 2013. « A Comparison of *in Vivo* Cellular Responses to CS-137 Gamma Rays and 320-KV X Rays ». *Dose-Response* 11 (4): dose-response.1. <https://doi.org/10.2203/dose-response.12-050.Scott>.

- Scully, Ralph, Arvind Panday, Rajula Elango, et Nicholas A. Willis. 2019. « DNA Double-Strand Break Repair-Pathway Choice in Somatic Mammalian Cells ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 20 (11): 698-714. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0>.
- Selby, P. B., S. S. Lee, E. M. Kelly, J. W. Bangham, G. D. Raymer, et P. R. Hunsicker. 1991. « Specific-Locus Experiments Show That Female Mice Exposed near the Time of Birth to Low-LET Ionizing Radiation Exhibit Both a Low Mutational Response and a Dose-Rate Effect ». *Mutation Research* 249 (2): 351-67. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(91\)90010-I](https://doi.org/10.1016/0027-5107(91)90010-I).
- Setiaputra, Dheva, et Daniel Durocher. 2019. « Shieldin – the Protector of DNA Ends ». *EMBO Reports* 20 (5). <https://doi.org/10.15252/embr.201847560>.
- Shalom-Paz, Einat, Benny Almog, Fady Shehata, Jack Huang, Hananel Holzer, Ri-Cheng Chian, Weon-Young Son, et Seang Lin Tan. 2010. « Fertility Preservation for Breast-Cancer Patients Using IVM Followed by Oocyte or Embryo Vitrification ». *Reproductive BioMedicine Online* 21 (4): 566-71. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.05.003>.
- Shapira, Moran, Marie-Madeleine Dolmans, Sherman Silber, et Dror Meirou. 2020. « Evaluation of Ovarian Tissue Transplantation: Results from Three Clinical Centers ». *Fertility and Sterility* 114 (2): 388-97. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.03.037>.
- Shibata, Atsushi, Davide Moiani, Andrew S. Arvai, Jefferson Perry, Shane M. Harding, Marie-Michelle Genois, Ranjan Maity, et al. 2014. « DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice Is Directed by Distinct MRE11 Nuclease Activities ». *Molecular Cell* 53 (1): 7-18. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.11.003>.
- Shim, Eun Yong, Woo-Hyun Chung, Matthew L. Nicolette, Yu Zhang, Melody Davis, Zhu Zhu, Tanya T. Paull, Grzegorz Ira, et Sang Eun Lee. 2010. « *Saccharomyces Cerevisiae* Mre11/Rad50/Xrs2 and Ku Proteins Regulate Association of Exo1 and Dna2 with DNA Breaks ». *The EMBO Journal* 29 (19): 3370-80. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.219>.
- Shimasaki, Shunichi, R. Kelly Moore, Fumio Otsuka, et Gregory F. Erickson. 2004. « The Bone Morphogenetic Protein System in Mammalian Reproduction ». *Endocrine Reviews* 25 (1): 72-101. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0007>.

- Shroff, Robert, Ayelet Arbel-Eden, Duane Pilch, Grzegorz Ira, William M. Bonner, John H. Petrini, James E. Haber, et Michael Lichten. 2004. « Distribution and Dynamics of Chromatin Modification Induced by a Defined DNA Double-Strand Break ». *Current Biology: CB* 14 (19): 1703-11. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.09.047>.
- Sienski, Grzegorz, Derya Dönertas, et Julius Brennecke. 2012. « Transcriptional Silencing of Transposons by Piwi and Maelstrom and Its Impact on Chromatin State and Gene Expression ». *Cell* 151 (5): 964-80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.040>.
- Silber, Sherman. 2015. « Unifying Theory of Adult Resting Follicle Recruitment and Fetal Oocyte Arrest ». *Reproductive Biomedicine Online* 31 (4): 472-75. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.06.022>.
- Simon, A. M., D. A. Goodenough, E. Li, et D. L. Paul. 1997. « Female Infertility in Mice Lacking Connexin 37 ». *Nature* 385 (6616): 525-29. <https://doi.org/10.1038/385525a0>.
- Singleton, B. K., M. I. Torres-Arzayus, S. T. Rottinghaus, G. E. Taccioli, et P. A. Jeggo. 1999. « The C Terminus of Ku80 Activates the DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (5): 3267-77. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.5.3267>.
- Slovinská, Lucia, Alica Elbertová, et Eva Misúrová. 2004. « Transmission of Genome Damage from Irradiated Male Rats to Their Progeny ». *Mutation Research* 559 (1-2): 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.12.005>.
- So, Ayeong, Tangui Le Guen, Bernard S. Lopez, et Josée Guirouilh-Barbat. 2017. « Genomic Rearrangements Induced by Unscheduled DNA Double Strand Breaks in Somatic Mammalian Cells ». *The FEBS Journal* 284 (15): 2324-44. <https://doi.org/10.1111/febs.14053>.
- Soh, Y. Q. Shirleen, Maria M. Mikedis, Mina Kojima, Alexander K. Godfrey, Dirk G. de Rooij, et David C. Page. 2017. « MeioC Maintains an Extended Meiotic Prophase I in Mice ». *PLoS Genetics* 13 (4): e1006704. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006704>.

- Souquet, Benoit, Emilie Abby, Roxane Hervé, Friederike Finsterbusch, Sophie Tourpin, Ronan Le Bouffant, Clotilde Duquenne, et al. 2013. « MEIOB Targets Single-Strand DNA and Is Necessary for Meiotic Recombination ». Édité par Mathilde Grelon. *PLoS Genetics* 9 (9): e1003784. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003784>.
- Soygur, B., R. G. Jaszczak, A. Fries, D. H. Nguyen, S. Malki, G. Hu, N. Demir, R. Arora, et D. J. Laird. 2021. « Intercellular Bridges Coordinate the Transition from Pluripotency to Meiosis in Mouse Fetal Oocytes ». *Science Advances* 7 (15): eabc6747. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc6747>.
- Speed, R. M. 1982. « Meiosis in the Foetal Mouse Ovary. I. An Analysis at the Light Microscope Level Using Surface-Spreading ». *Chromosoma* 85 (3): 427-37. <https://doi.org/10.1007/BF00330366>.
- Steinfeld, Justin B., Ondrej Beláň, Youngho Kwon, Tsuyoshi Terakawa, Amr Al-Zain, Michael J. Smith, J. Brooks Crickard, et al. 2019. « Defining the Influence of Rad51 and Dmc1 Lineage-Specific Amino Acids on Genetic Recombination ». *Genes & Development* 33 (17-18): 1191-1207. <https://doi.org/10.1101/gad.328062.119>.
- Stringer, Jessica M., Amy Winship, Nadeen Zerafa, Matthew Wakefield, et Karla Hutt. 2020. « Oocytes Can Efficiently Repair DNA Double-Strand Breaks to Restore Genetic Integrity and Protect Offspring Health ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (21): 11513-22. <https://doi.org/10.1073/pnas.2001124117>.
- Su, You-Qiang, Koji Sugiura, Yong Woo, Karen Wigglesworth, Sonya Kamdar, Jason Affourtit, et John J. Eppig. 2007. « Selective Degradation of Transcripts during Meiotic Maturation of Mouse Oocytes ». *Developmental Biology* 302 (1): 104-17. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.09.008>.
- Suh, Eun-Kyung, Annie Yang, Arminja Kettenbach, Casimir Bamberger, Ala H. Michaelis, Zhou Zhu, Julia A. Elvin, Roderick T. Bronson, Christopher P. Crum, et Frank McKeon. 2006. « P63 Protects the Female Germ Line during Meiotic Arrest ». *Nature* 444 (7119): 624-28. <https://doi.org/10.1038/nature05337>.

- Sun, Yingli, Xiaofeng Jiang, Shujuan Chen, Norvin Fernandes, et Brendan D. Price. 2005. « A Role for the Tip60 Histone Acetyltransferase in the Acetylation and Activation of ATM ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (37): 13182-87. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504211102>.
- Symington, Lorraine S. 2016. « Mechanism and Regulation of DNA End Resection in Eukaryotes ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 51 (3): 195-212. <https://doi.org/10.3109/10409238.2016.1172552>.
- Tadi, Satish K., Carine Tellier-Lebègue, Clément Nemoz, Pascal Drevet, Stéphane Audebert, Sunetra Roy, Katheryn Meek, Jean-Baptiste Charbonnier, et Mauro Modesti. 2016. « PAXX Is an Accessory C-NHEJ Factor That Associates with Ku70 and Has Overlapping Functions with XLF ». *Cell Reports* 17 (2): 541-55. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.026>.
- Tam, P. P., et M. H. Snow. 1981. « Proliferation and Migration of Primordial Germ Cells during Compensatory Growth in Mouse Embryos ». *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 64 (août): 133-47.
- Tanaka, S. S., Y. Toyooka, R. Akasu, Y. Katoh-Fukui, Y. Nakahara, R. Suzuki, M. Yokoyama, et T. Noce. 2000. « The Mouse Homolog of Drosophila Vasa Is Required for the Development of Male Germ Cells ». *Genes & Development* 14 (7): 841-53.
- Tarsounas, Madalena, et Patrick Sung. 2020. « The Antitumorigenic Roles of BRCA1–BARD1 in DNA Repair and Replication ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21 (5): 284-99. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0218-z>.
- The ESHRE Guideline Group on Female Fertility Preservation, Richard A Anderson, Frédéric Amant, Didi Braat, Arianna D'Angelo, Susana M Chuva de Sousa Lopes, Isabelle Demeestere, et al. 2020. « ESHRE Guideline: Female Fertility Preservation† ». *Human Reproduction Open* 2020 (4): hoaa052. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa052>.
- Thomas, Fiona H., Jean-François Ethier, Shunichi Shimasaki, et Barbara C. Vanderhyden. 2005. « Follicle-Stimulating Hormone Regulates Oocyte Growth by Modulation of Expression of Oocyte and Granulosa Cell Factors ». *Endocrinology* 146 (2): 941-49. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0826>.

- Turner, James M. A., Shantha K. Mahadevaiah, Oscar Fernandez-Capetillo, André Nussenzweig, Xiaoling Xu, Chu-Xia Deng, et Paul S. Burgoyne. 2005. « Silencing of Unsynapsed Meiotic Chromosomes in the Mouse ». *Nature Genetics* 37 (1): 41-47. <https://doi.org/10.1038/ng1484>.
- Turner, James M.A., Shantha K. Mahadevaiah, Peter J.I. Ellis, Michael J. Mitchell, et Paul S. Burgoyne. 2006. « Pachytene Asynapsis Drives Meiotic Sex Chromosome Inactivation and Leads to Substantial Postmeiotic Repression in Spermatids ». *Developmental Cell* 10 (4): 521-29. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.02.009>.
- Uda, Manuela, Chris Ottolenghi, Laura Crisponi, Jose Elias Garcia, Manila Deiana, Wendy Kimber, Antonino Forabosco, Antonio Cao, David Schlessinger, et Giuseppe Pilia. 2004. « Foxl2 Disruption Causes Mouse Ovarian Failure by Pervasive Blockage of Follicle Development ». *Human Molecular Genetics* 13 (11): 1171-81. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh124>.
- Underbrink, A. G., A. M. Kellerer, R. E. Mills, et A. H. Sparrow. 1976. « Comparison of X-Ray and Gamma-Ray Dose-Response Curves for Pink Somatic Mutations in Tradescantia Clone 02 ». *Radiation and Environmental Biophysics* 13 (4): 295-303. <https://doi.org/10.1007/BF01331174>.
- Vader, Gerben, et Andrea Musacchio. 2014. « HORMA Domains at the Heart of Meiotic Chromosome Dynamics ». *Developmental Cell* 31 (4): 389-91. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.009>.
- Van den Bossche, Jolien, Andreas Domen, Marc Peeters, Christophe Deben, Ines De Pauw, Julie Jacobs, Sven De Bruycker, et al. 2019. « Radiosensitization of Non-Small Cell Lung Cancer Cells by the Plk1 Inhibitor Volasertib Is Dependent on the P53 Status ». *Cancers* 11 (12): E1893. <https://doi.org/10.3390/cancers11121893>.
- Vera, Gabriella, Paola Rivera-Munoz, Vincent Abramowski, Laurent Malivert, Annick Lim, Christine Bole-Feysot, Christelle Martin, et al. 2013. « Cernunnos Deficiency Reduces Thymocyte Life Span and Alters the T Cell Repertoire in Mice and Humans ». *Molecular and Cellular Biology* 33 (4): 701-11. <https://doi.org/10.1128/MCB.01057-12>.
- Vernet, Nadège, Diana Condrea, Chloé Mayere, Betty Féret, Muriel Klopfenstein, William Magnant, Violaine Alunni, et al. 2020. « Meiosis Occurs Normally in the Fetal Ovary of

- Mice Lacking All Retinoic Acid Receptors ». *Science Advances* 6 (21): eaaz1139. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz1139>.
- Virant-Klun, Irma, Nicolas Zech, Primoz Rozman, Andrej Vogler, Branko Cvjeticanin, Polona Klemenc, Elvira Malicev, et Helena Meden-Vrtovec. 2008. « Putative Stem Cells with an Embryonic Character Isolated from the Ovarian Surface Epithelium of Women with No Naturally Present Follicles and Oocytes ». *Differentiation; Research in Biological Diversity* 76 (8): 843-56. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2008.00268.x>.
- Visser, Jenny A., Frank H. de Jong, Joop S. E. Laven, et Axel P. N. Themmen. 2006. « Anti-Müllerian Hormone: A New Marker for Ovarian Function ». *Reproduction (Cambridge, England)* 131 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00529>.
- Vorobtsova, I. E. 2000. « Irradiation of Male Rats Increases the Chromosomal Sensitivity of Progeny to Genotoxic Agents ». *Mutagenesis* 15 (1): 33-38. <https://doi.org/10.1093/mutage/15.1.33>.
- Walker, John R., Richard A. Corpina, et Jonathan Goldberg. 2001. « Structure of the Ku Heterodimer Bound to DNA and Its Implications for Double-Strand Break Repair ». *Nature* 412 (6847): 607-14. <https://doi.org/10.1038/35088000>.
- Wallace, W. H. B., A. B. Thomson, et T. W. Kelsey. 2003. « The Radiosensitivity of the Human Oocyte ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 18 (1): 117-21. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg016>.
- Wallace, W. H., S. M. Shalet, J. H. Hendry, P. H. Morris-Jones, et H. R. Gattamaneni. 1989. « Ovarian Failure Following Abdominal Irradiation in Childhood: The Radiosensitivity of the Human Oocyte ». *The British Journal of Radiology* 62 (743): 995-98. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-62-743-995>.
- Wallace, W. Hamish B., Angela B. Thomson, Frank Saran, et Tom W. Kelsey. 2005. « Predicting Age of Ovarian Failure after Radiation to a Field That Includes the Ovaries ». *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics* 62 (3): 738-44. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2004.11.038>.

- Wallace, W.H.B., A.B. Thomson, et T.W. Kelsey. 2003. « The Radiosensitivity of the Human Oocyte ». *Human Reproduction* 18 (1): 117-21. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg016>.
- Wang, Jun-Jie, Wei Ge, Qiu-Yue Zhai, Jing-Cai Liu, Xiao-Wen Sun, Wen-Xiang Liu, Lan Li, et al. 2020. « Single-Cell Transcriptome Landscape of Ovarian Cells during Primordial Follicle Assembly in Mice ». Édité par Polina V. Lishko. *PLOS Biology* 18 (12): e3001025. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001025>.
- Wang, Ningling, Xunli Yin, Yu Tao, Yun Wang, et Qianqian Zhu. 2021. « Cumulative Live Birth Rates over Multiple Complete Cycles of *in Vitro* Fertilisation Cycles: 10-Year Cohort Study of 20,687 Women Following Freeze-All Strategy from One Single Centre ». *Archives of Gynecology and Obstetrics*, août. <https://doi.org/10.1007/s00404-021-06063-1>.
- Wang, Xiaobin S., Brian J. Lee, et Shan Zha. 2020. « The Recent Advances in Non-Homologous End-Joining through the Lens of Lymphocyte Development ». *DNA Repair* 94 (octobre): 102874. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102874>.
- Wang, Xiaoyi, et Melissa E. Pepling. 2021. « Regulation of Meiotic Prophase One in Mammalian Oocytes ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (mai): 667306. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.667306>.
- Wang, Yijing, Zhen Teng, Ge Li, Xinyi Mu, Zhengpin Wang, Lizhao Feng, Wanbao Niu, et al. 2015. « Cyclic AMP in Oocytes Controls Meiotic Prophase I and Primordial Folliculogenesis in the Perinatal Mouse Ovary ». *Development*, janvier, dev.112755. <https://doi.org/10.1242/dev.112755>.
- Wang, Yong-Yong, Yuan-Chao Sun, Xiao-Feng Sun, Shun-Feng Cheng, Bo Li, Xi-Feng Zhang, Massimo De Felici, et Wei Shen. 2017. « Starvation at Birth Impairs Germ Cell Cyst Breakdown and Increases Autophagy and Apoptosis in Mouse Oocytes ». *Cell Death & Disease* 8 (2): e2613. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.3>.
- Watanabe, Ren, et Naoko Kimura. 2018. « Non-Suckling Starvation of Neonatal Mice Promotes Primordial Follicle Formation with Activation of Ovarian Autophagy ». *The Journal of Reproduction and Development* 64 (1): 89-94. <https://doi.org/10.1262/jrd.2017-126>.

- Watson, J. D., et F. H. Crick. 1953. « Molecular Structure of Nucleic Acids; a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid ». *Nature* 171 (4356): 737-38. <https://doi.org/10.1038/171737a0>.
- West, J, K Kirk, Y Goyder, et M Lyon. 1985. « Discrimination between the Effects of X-Ray Irradiation of the Mouse Oocyte and Uterus on the Induction of Dominant Lethals and Congenital AnomaliesII. Localised Irradiation Experiments ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 149 (2): 231-38. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(85\)90029-6](https://doi.org/10.1016/0027-5107(85)90029-6).
- Western, Patrick S., Jocelyn A. Bergen, Denise C. Miles, et Andrew H. Sinclair. 2010. « Male Fetal Germ Cell Differentiation Involves Complex Repression of the Regulatory Network Controlling Pluripotency ». *The FASEB Journal* 24 (8): 3026-35. <https://doi.org/10.1096/fj.09-151555>.
- Weterings, Eric, Nicole S. Verkaik, Guido Keijzers, Bogdan I. Florea, Shih-Ya Wang, Laura G. Ortega, Naoya Uematsu, David J. Chen, et Dik C. van Gent. 2009. « The Ku80 Carboxy Terminus Stimulates Joining and Artemis-Mediated Processing of DNA Ends ». *Molecular and Cellular Biology* 29 (5): 1134-42. <https://doi.org/10.1128/MCB.00971-08>.
- Wikander, Ida, Frida E. Lundberg, Hanna Nilsson, Birgit Borgström, et Kenny A. Rodriguez-Wallberg. 2021. « A Prospective Study on Fertility Preservation in Prepubertal and Adolescent Girls Undergoing Hematological Stem Cell Transplantation ». *Frontiers in Oncology* 11: 692834. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.692834>.
- Williams, R. Scott, Gabriel Moncalian, Jessica S. Williams, Yoshiki Yamada, Oliver Limbo, David S. Shin, Lynda M. Grocock, et al. 2008. « Mre11 Dimers Coordinate DNA End Bridging and Nuclease Processing in Double-Strand-Break Repair ». *Cell* 135 (1): 97-109. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.017>.
- Winship, Amy L, Jessica M Stringer, Seng H Liew, et Karla J Hutt. 2018. « The Importance of DNA Repair for Maintaining Oocyte Quality in Response to Anti-Cancer Treatments, Environmental Toxins and Maternal Ageing ». *Human Reproduction Update* 24 (2): 119-34. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy002>.

- Wittenborn, Thomas Rea, Cecilia Fahlquist Hagert, Alexey Ferapontov, Sofie Fonager, Lisbeth Jensen, Gudrun Winther, et Søren Egedal Degn. 2021. « Comparison of Gamma and X-Ray Irradiation for Myeloablation and Establishment of Normal and Autoimmune Syngeneic Bone Marrow Chimeras ». *PloS One* 16 (3): e0247501. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247501>.
- Wojtasz, Lukasz, Jeffrey M. Cloutier, Marek Baumann, Katrin Daniel, János Varga, Jun Fu, Konstantinos Anastassiadis, et al. 2012. « Meiotic DNA Double-Strand Breaks and Chromosome Asynapsis in Mice Are Monitored by Distinct HORMAD2-Independent and -Dependent Mechanisms ». *Genes & Development* 26 (9): 958-73. <https://doi.org/10.1101/gad.187559.112>.
- Wojtasz, Lukasz, Katrin Daniel, Ignasi Roig, Ewelina Bolcun-Filas, Huiling Xu, Verawan Boonsanay, Christian R. Eckmann, et al. 2009. « Mouse HORMAD1 and HORMAD2, Two Conserved Meiotic Chromosomal Proteins, Are Depleted from Synapsed Chromosome Axes with the Help of TRIP13 AAA-ATPase ». *PLoS Genetics* 5 (10): e1000702. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000702>.
- Xie, Anyong, Amy Kwok, et Ralph Scully. 2009. « Role of Mammalian Mre11 in Classical and Alternative Nonhomologous End Joining ». *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (8): 814-18. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1640>.
- Xu, Huiling, Matthew D. Beasley, William D. Warren, Gijsbertus T. J. van der Horst, et Michael J. McKay. 2005. « Absence of Mouse REC8 Cohesin Promotes Synapsis of Sister Chromatids in Meiosis ». *Developmental Cell* 8 (6): 949-61. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.03.018>.
- Yamashiro, Chika, Kotaro Sasaki, Yukihiro Yabuta, Yoji Kojima, Tomonori Nakamura, Ikuhiro Okamoto, Shihori Yokobayashi, et al. 2018. « Generation of Human Oogonia from Induced Pluripotent Stem Cells *in Vitro* ». *Science* 362 (6412): 356-60. <https://doi.org/10.1126/science.aat1674>.
- Yan, C., P. Wang, J. DeMayo, F. J. DeMayo, J. A. Elvin, C. Carino, S. V. Prasad, et al. 2001. « Synergistic Roles of Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 in Ovarian Function ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 15 (6): 854-66. <https://doi.org/10.1210/mend.15.6.0662>.

- Yan, Jun, et Anton M. Jetten. 2008. « RAP80 and RNF8, Key Players in the Recruitment of Repair Proteins to DNA Damage Sites ». *Cancer Letters* 271 (2): 179-90. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.04.046>.
- Yang, Annie, Mourad Kaghad, Yunmei Wang, Emily Gillett, Mark D Fleming, Volker Dötsch, Nancy C Andrews, Daniel Caput, et Frank McKeon. 1998. « P63, a P53 Homolog at 3q27–29, Encodes Multiple Products with Transactivating, Death-Inducing, and Dominant-Negative Activities ». *Molecular Cell* 2 (3): 305-16. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80275-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80275-0).
- Yu, Xiaochun, et Junjie Chen. 2004. « DNA Damage-Induced Cell Cycle Checkpoint Control Requires CtIP, a Phosphorylation-Dependent Binding Partner of BRCA1 C-Terminal Domains ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (21): 9478-86. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.21.9478-9486.2004>.
- Yu, Xiaochun, Shuang Fu, Maoyi Lai, Richard Baer, et Junjie Chen. 2006. « BRCA1 Ubiquitinates Its Phosphorylation-Dependent Binding Partner CtIP ». *Genes & Development* 20 (13): 1721-26. <https://doi.org/10.1101/gad.1431006>.
- Yun, Maximina H., et Kevin Hiom. 2009. « CtIP-BRCA1 Modulates the Choice of DNA Double-Strand-Break Repair Pathway throughout the Cell Cycle ». *Nature* 459 (7245): 460-63. <https://doi.org/10.1038/nature07955>.
- Zhang, Hua, Wenjing Zheng, Yan Shen, Deepak Adhikari, Hiroo Ueno, et Kui Liu. 2012. « Experimental Evidence Showing That No Mitotically Active Female Germline Progenitors Exist in Postnatal Mouse Ovaries ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (31): 12580-85. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206600109>.
- Zhang, Yu, Xuefei Zhang, Zhaoqing Ba, Zhuoyi Liang, Edward W. Dring, Hongli Hu, Jiangman Lou, et al. 2019. « The Fundamental Role of Chromatin Loop Extrusion in Physiological V(D)J Recombination ». *Nature* 573 (7775): 600-604. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1547-y>.

- Zhao, Bailin, Eli Rothenberg, Dale A. Ramsden, et Michael R. Lieber. 2020. « The Molecular Basis and Disease Relevance of Non-Homologous DNA End Joining ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21 (12): 765-81. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00297-8>.
- Zhao, Bailin, Go Watanabe, et Michael R Lieber. 2020. « Polymerase μ in Non-Homologous DNA End Joining: Importance of the Order of Arrival at a Double-Strand Break in a Purified System ». *Nucleic Acids Research* 48 (7): 3605-18. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa094>.
- Zheng, Ping, et Jurrien Dean. 2007. « Oocyte-Specific Genes Affect Folliculogenesis, Fertilization, and Early Development ». *Seminars in Reproductive Medicine* 25 (4): 243-51. <https://doi.org/10.1055/s-2007-980218>.
- Zheng, Wenjing, Hua Zhang, Nagaraju Gorre, Sanjiv Risal, Yan Shen, et Kui Liu. 2014. « Two Classes of Ovarian Primordial Follicles Exhibit Distinct Developmental Dynamics and Physiological Functions ». *Human Molecular Genetics* 23 (4): 920-28. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt486>.
- Zickler, D., et N. Kleckner. 1998. « The Leptotene-Zygotene Transition of Meiosis ». *Annual Review of Genetics* 32: 619-97. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.32.1.619>.
- Zickler, Denise, et Nancy Kleckner. 2015. « Recombination, Pairing, and Synapsis of Homologs during Meiosis ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (6): a016626. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016626>.
- Zuckerman, S. 1951. « The number of oocytes in the mature ovary ». *Recent Prog Horm Res*, 1951, sect. 6.

ANNEXES

LISTE DES PUBLICATIONS

- Puy V., Barroca V., Messiaen S., Menard V., Torres C., Devanand C., Moison D., Lewandowski D., Guerquin M.J., Martini E., Frydman N., Livera G.. Mouse model of radio-induced premature ovarian insufficiency reveals compromised oocyte quality: implications for fertility preservation. RBMO, 2021, doi : <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.06.027>

En préparation :

- Puy V., Messiaen S., Barroca V., Guerquin MJ, Ménard V., Devanand C., Frydman N., Martini E. and Livera G.. The switch from homologous recombination to non homologous end joining repair pathway in the mammalian female germline.

Études ancillaires :

- Mayeur A., Puy V., Windal V., Hesters L., Gallot V., Benoit A., Grynberg M., Sonigo C. and Frydman N.. Live birth rate after use of cryopreserved oocytes or embryos at the time of cancer diagnosis in female survivors: a retrospective study of ten years of experience. JARG, 2021

- Puy V., Dupeux M., Mayeur A., Grynberg M., Benoit A., Bendayan M., Zhegari F., Hesters L., Gallot V., Prevot S., Frydman N. and Sonigo C.. Controlled ovarian hyperstimulation applied before unilateral oophorectomy improves fertility preservation in cancer patients. (révision Human reproduction)

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

- Puy V., Barroca V., Messiaen S., Menard V., Torres C., Devanand C., Moison D., Lewandowski D., Guerquin, M.J., Martini E., Frydman N., Livera G.. Differential mouse-oocyte radiosensitivity as a function of the follicle stage. ESHRE 2019, Vienne (poster).

- Puy V., Barroca V., Messiaen S., Menard V., Torres C., Devanand C., Moison D., Lewandowski D., Guerquin, M.J., Martini E., Frydman N., Livera G.. Difference of radiosensitivity in mouse oocyte as a function of the follicle stage. Premier prix de communication orale à l'assemblée générale collège BMDR, décembre 2020.

- Puy V., Barroca V., Messiaen S., Menard V., Torres C., Devanand C., Moison D., Lewandowski D., Guerquin, M.J., Martini E., Frydman N., Livera G.. Oocyte radiosensitivity in mammals. Journée IRSN, septembre 2021 (communication orale).

Titre : Génotoxicité des rayonnements ionisants au cours de l'ovogenèse chez les mammifères

Mots clés : Fertilité, Rayonnements ionisants, Réparation de l'ADN, Risque héréditaire, Ovogenèse

Résumé : La fertilité féminine dépend en partie du nombre et de la qualité des ovocytes. Les cassures double-brin de l'ADN (CDBs) sont les lésions les plus délétères induites par les rayonnements ionisants (RI). Elles peuvent conduire à la mort cellulaire ou être prises en charge par des mécanismes de réparation plus ou moins fidèles tels que la recombinaison homologue (RH) ou par jonctions des extrémités non homologues (NHEJ). Nous avons étudié expérimentalement la radiosensibilité ovocytaire et les mécanismes de réparation des CDBs chez la Souris et chez la Femme en utilisant des modèles *in vivo* et *in vitro* dans une perspective intégrée.

Chez la Souris, les ovocytes de la réserve ovarienne (DL50 < 50mGy) sont beaucoup plus radiosensibles que ceux entrés en croissance (DL50 > 8Gy). Les ovocytes radio-résistants sont capables de survivre à long terme, peuvent être ovulés et fécondés. Les souris irradiées conservent une fertilité transitoire témoignant de la fonctionnalité des ovocytes radio-résistants. Cependant, l'exposition aux RI altère la qualité ovocytaire en augmentant le taux d'aneuploïdie de manière corrélée à une augmentation de la mortalité embryonnaire.

Après irradiation, les ovocytes de la réserve s'engagent exclusivement dans la RH avec le chargement de RAD51. Au contraire, les ovocytes entrés en croissance engagent moins la résection. Ces derniers utilisent le NHEJ canonique, nécessaire à leur survie après irradiation. Dans les ovocytes en croissance la présence de 53BP1 est en faveur d'une prise en charge non-résective des CDBs. L'étude de souris invalidées pour *Xlf* nous a permis de démontrer l'implication du NHEJ canonique dans la radiorésistance des ovocytes en croissance chez la Souris.

Chez la Femme, l'utilisation d'un système de culture organotypique de fragments ovariens nous a permis de démontrer la plus forte radiorésistance des ovocytes de la réserve comparativement à la souris. La présence de 53BP1 suggère que le NHEJ pourrait être impliqué dans cette survie ovocytaire comme pour les ovocytes murins en croissance. L'ensemble de ces données suggèrent que la qualité ovocytaire peut être affectée après irradiation et que les conceptions naturelles après exposition aux RI pourraient être à risque d'effets héréditaires.

Title : Genotoxicity of ionizing radiation during oogenesis in mammals

Keywords : DNA repair, Fertility, Hereditary risk, Ionizing radiation, Oogenesis

Abstract : Female fertility depends in part on the number and quality of oocytes. Ionising radiation (IR) has genotoxic effects that can induce cell death. DNA double strand breaks (DSBs) are the most deleterious lesions induced by IR and are dealt with by more or less faithful repair mechanisms such as homologous recombination (HR) or non-homologous end joining (NHEJ). We experimentally investigated radiosensitivity and DSB repair mechanisms in the mouse and human oocyte using *in vivo* and *in vitro* models in an integrated perspective.

In mouse, oocytes in the ovarian reserve (LD50 < 50mGy) are much more radiosensitive than those in the growing oocytes (LD50 > 8Gy). Radiation-resistant oocytes are able to survive in the long term, can be ovulated and fertilized. Irradiated mice had transient fertility indicating the functionality of the radioresistant oocytes. However, IR exposure alters oocyte quality by increasing the aneuploidy rate in a manner that correlates with increased embryonic lethality.

After irradiation, reserve oocytes exclusively use HR with RAD51 loading. In contrast, growing oocytes engage less DNA resection. These use the canonical NHEJ, mandatory for their survival after irradiation. In growing oocytes the presence of 53BP1 is in favour of a non-resecting management of CBDs. The study of mice invalidated for *Xlf* allowed us to demonstrate the involvement of canonical NHEJ in the radioresistance of growing oocytes in mouse.

In human ovaries, using of an organotypic culture system, we showed the higher radioresistance of reserve oocytes compared to mouse ones. The presence of 53BP1 suggests that NHEJ may be involved in this oocyte survival as for growing murine oocytes.

Taken together, these data suggest that oocyte quality may be affected after irradiation and that natural conceptions after IR exposure may be at risk of hereditary effects.