

Année 2013

**MÉMOIRE DU DIPLOME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES de**

Conformément aux dispositions du décret 90-810 du 10 septembre 1990  
tient lieu de :

**THESE POUR LE**

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**BOUCRET LISA**

** n (e) le : 06/03/1987   ALENCON**

**L'expression des gènes mitochondriaux dans les cellules du  
cumulus, reflet des processus de vieillissement ovarien ?**

**Lundi 28 octobre 2013**

**MEMBRES DU JURY :**

**Mr Alain JARDEL** (Président), PU, Université d'Angers

**Me Pascale MAY-PANLOUP** (Directeur), MCU-PH, Université d'Angers

**Mr Pascal REYNIER** (Examineur), PU-PH, Université d'Angers

**Me Sophie LEMERLE** (Examineur), PH, CHU d'Angers



## Liste des enseignants

Année Universitaire 2012-2013

### **PROFESSEURS**

BENOIT Jean-Pierre  
BOUET Gilles  
BOURY Franck  
CALENDA Alphonse  
DUVAL Olivier  
FOUSSARD Françoise  
JARDEL Alain  
MAHAZA Chetaou  
MARCHAIS Véronique  
MAURAS Geneviève  
MAURAS Yves  
PASSIRANI Catherine  
RICHOMME Pascal  
ROBERT Raymond  
SAULNIER Patrick  
SERAPHIN Denis  
VENIER Marie-Claire

### **Disciplines**

Pharmacotechnie  
Chimie Physique Générale et Minérale  
Biophysique  
Biologie Moléculaire - Biotechnologie  
Chimie Thérapeutique  
Biochimie Générale et Clinique  
Physiologie  
Bactériologie - Virologie  
Bactériologie et Virologie  
Biologie Cellulaire  
Toxicologie  
Chimie générale – Chimie analytique  
Pharmacognosie  
Parasitologie et Mycologie médicale  
Biophysique pharmaceutique et biostatistiques  
Chimie Organique  
Pharmacotechnie

### **MAITRES DE CONFERENCES**

ANNAIX Véronique  
BASTIAT Guillaume  
BAGLIN Isabelle  
BATAILLE Nelly  
BENOIT Jacqueline  
CLÈRE Nicolas  
CORVEZ Pol  
DERBRE Séverine

### **Disciplines**

Biochimie Générale et Clinique  
Biophysique pharmaceutique et biostatistiques  
Pharmaco - Chimie  
Biologie Cellulaire et Moléculaire  
Pharmacologie et Pharmacocinétique  
Pharmacologie  
Sémiologie  
Pharmacognosie

**MAITRES DE CONFERENCES**

DUBREUIL Véronique  
ÉVEILLARD Matthieu  
FAURE Sébastien  
FLEURY Maxime  
GALLAND Françoise  
GIRAUD Sandrine  
GUILLET David  
HELESBEUX Jean-Jacques  
JOLIVET Jean-Paul  
KHAN Mustayeen  
LAGARCE Frédéric  
LANDREAU Anne  
LARCHER Gérald  
LE RAY Anne-Marie  
LICZNAR Patricia  
MALLET Marie-Sabine  
MAROT Agnès  
MILTGEN-LANCELOT Caroline  
  
NAIL BILLAUD Sandrine  
OGER Jean-Michel  
PECH Brigitte  
SCHINKOVITZ Andréas  
TRICAUD Anne

**A.H.U.**

SPIESSER-ROBELET Laurence

**PRAG (Professeurs Agrégés)**

HANOTTE Caroline  
ROUX Martine

**PRCE (Professeurs certifiés affectés  
dans l'enseignement supérieur)**

GENARD Nicole  
LECOMTE Stéphane

**Disciplines**

Chimie Analytique  
Bactériologie - Virologie  
Pharmacologie Physiologie  
Immunologie  
Biophysique  
Biologie moléculaire et cellulaire  
Chimie Analytique  
Chimie Organique  
Biophysique  
Chimie Générale et Minérale  
Pharmacotechnie-Biopharmacie  
Botanique  
Biochimie Générale et Clinique  
Valorisation des substances naturelles  
Bactériologie - Virologie  
Chimie Analytique et Bromatologie  
Parasitologie et Mycologie médicale  
Management et gestion des organisations  
de santé  
Immunologie  
Chimie  
Pharmacotechnie  
Pharmacognosie  
Biologie Cellulaire

**Disciplines**

Pharmacie clinique et Éducation Thérapeutique

**Disciplines**

Economie – Gestion  
Espagnol

Anglais  
Anglais

**ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT**

Je, soussigné(e), BOUCRET LISA, déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Signature :

Lisa Boucret

Cet engagement de non plagiat doit être inséré en première page de tous les rapports, dossiers, mémoires.

## REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier le Professeur Alain Jardel qui me fait l'honneur de présider ce jury. Je vous remercie également pour l'enseignement fourni tout au long de mon cursus. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde et respectueuse reconnaissance.

Je tiens également à remercier le Docteur Pascale May-Panloup pour avoir dirigé ce travail, m'avoir accueillie dans son laboratoire, et m'avoir permis de continuer au sein de son équipe. Je vous sais gré de votre dynamisme et de votre rigueur, tant dans l'encadrement de ce projet, que de celui de la pratique quotidienne.

Je remercie ensuite le Professeur Pascal Reynier pour son accueil au sein du pôle de biologie. Vous me faites l'honneur de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

Je voudrais aussi remercier le Docteur Sophie Lemerle d'avoir accepté de participer au jury de soutenance de thèse. Vous me faites l'honneur d'examiner ce travail, soyez assurée de ma profonde gratitude.

J'adresse également de sincères remerciements au Professeur Vincent Procaccio pour m'avoir chaleureusement accueillie au sein de l'équipe « mitochondrie » du laboratoire UMR CNRS 6214 INSERM 1083, ainsi que pour son enthousiasme pour ce sujet passionnant que constitue la mitochondrie.

Mes remerciements vont aussi bien sûr à toute l'équipe du centre d'AMP du CHU d'Angers. Un grand merci à Véro, aux techniciennes du laboratoire, et à Marie, pour leur gentillesse tout au long de ma formation. J'associe également à ces remerciements tous les membres de l'équipe clinique.

Un énorme MERCI à Valérie, pour sa gentillesse et sa disponibilité à toute épreuve (l'épreuve du feu étant celle des standards...). Merci aussi à Arnaud Chevrollier, ainsi qu'aux doctorants et étudiants pour leur co-habitation régulière dans la bonne humeur.

Par ailleurs, j'adresse une pensée aux amis : les inconditionnels du lycée (y compris les rivaux de Bellevue...), toute la joyeuse bande internat de pharma (Pityriasis !), le groupe

des filles, les gourmets du RU, auquel est lié un merci *limité* à Thomas et Audrey. Je n'oublie pas non plus les qp1ciens rennais, la fine équipe de parasito chercheuse de demodex, Juanito et Téterne. A Ugo l'Atypique, G., et Jérémie.

Un clin d'œil aussi pour les nouveaux-venus : Lucas, Léanna, Loevan, Loris, Eleanore, Laure, et aux autres à venir...

Je remercie aussi toute ma famille, avec une pensée particulière pour Pascal. Merci aussi aux parents Brun.

Enfin, un grand merci à mes parents si gentils, soeurette et vagabond, et à mon musicien chéri.

## TABLE DES MATIERES

Liste des figures

Liste des abréviations

<b>1/ Généralités bibliographiques</b> .....	15
A. FERTILITE ET VIELLISSEMENT OVARIEN .....	17
I. Epidémiologie de la fertilité .....	17
1. Définitions et étiologies .....	17
2. Importance de l'âge sur la fertilité.....	17
3. Place de l'AMP .....	18
II. Vieillesse ovarien .....	19
1. Atrésie folliculaire .....	19
2. Altérations qualitatives .....	21
3. Evaluation de la réserve ovarienne.....	22
B. OVOCYTE ET MICRO-ENVIRONNEMENT FOLLICULAIRE .....	22
I. Ovogenèse .....	22
II. Folliculogenèse.....	24
1. Différents types histologiques de follicules .....	25
2. Chronologie .....	26
III. Communication bidirectionnelle ovocyte/cumulus.....	28
1. Mécanismes mis en jeu .....	28
a) Jonctions communicantes .....	29
b) Signaux paracrines [38, 39] .....	30
2. Implications : Les cellules folliculeuses pourraient-elles représenter des marqueurs potentiels de la qualité ovocytaire ?.....	31
C. MITOCHONDRIE ET FERTILITE.....	32
I. Généralités sur les mitochondries.....	32
1. Organisation et structure .....	33
a) Organisation .....	33
b) Structure .....	33
2. Fonctions des mitochondries .....	34
a) Métabolisme énergétique .....	34
b) Autres rôles.....	35
3. Dynamique mitochondriale .....	36
a) Fusion et fission .....	36
b) Mitophagie .....	38
c) Voies d'import mitochondrial .....	38
4. Génome mitochondrial .....	39
a) Organisation .....	39
b) Réplication.....	41
c) Transcription .....	43
d) Régulation transcriptionnelle de la biogenèse mitochondriale .....	43
e) Pathologies mitochondriales et transmission .....	45

II. Devenir des mitochondries pendant l'ovogenèse et l'embryogenèse .....	46
a) Mitochondrie et ovogenèse .....	46
b) Transmission maternelle à l'embryon .....	48
c) Embryogenèse précoce.....	48
III. Mitochondries et vieillissement ovarien .....	49
a) Rôle dans l'apoptose.....	49
b) Mitochondries et théorie du vieillissement .....	50
<b>2/ Vieillesse ovarien et mitochondrie : objectifs de ce travail .....</b>	<b>56</b>
<b>3/ Matériels et méthodes .....</b>	<b>59</b>
A. ENCADREMENT.....	60
B. POPULATION ETUDIEE .....	60
I. Description .....	60
II. Modalités de recrutement et d'information.....	60
III. Critères de sélection.....	60
IV. Nombre de patientes incluses .....	61
C. ECHANTILLONS BIOLOGIQUES.....	61
D. QUANTIFICATION DE L'ADN .....	62
I. Extraction de l'ADN .....	62
II. Optimisation des conditions de PCR .....	63
1. Définition des amorces .....	63
2. Choix des amorces .....	64
3. Préparation des standards.....	64
4. PCR quantitative.....	66
a) Protocole opératoire .....	66
b) Contrôles .....	66
c) Gamme d'étalonnage.....	66
d) Quantification.....	67
III. Validation des résultats.....	67
E. QUANTIFICATION DES TRANSCRITS.....	68
I. Extraction de l'ARN.....	68
II. Reverse Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) .....	69
F. ANALYSES STATISTIQUES .....	70
<b>4/ Résultats.....</b>	<b>72</b>
A. POPULATION.....	73
B. QUANTIFICATION DE L'ADN MITOCHONDRIAL .....	74
I. Quantification de l'ADNmt ovocytaire .....	74
II. Quantification de l'ADNmt dans les cellules folliculeuses .....	74
III. Corrélation ADNmt folliculaire / ADNmt ovocytaire.....	74
C. EXPRESSION GENIQUE DANS LES CELLULES FOLLICULEUSES.....	74
<b>5/ Conclusion -Perspectives .....</b>	<b>77</b>
<b>6/ Annexes .....</b>	<b>83</b>
<b>7/ Bibliographie.....</b>	<b>86</b>



## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Modèle de Wallace représentant le déclin des follicules primordiaux avec l'âge .....	19
Figure 2 : Pourcentage de la réserve ovarienne en fonction de l'âge .....	20
Figure 3 : Facteurs mis en jeu dans l'entrée en croissance du follicule primordial.....	22
Figure 4 : Implications de la voie de PI3K dans l'activation ou le maintien au repos des follicules..	22
Figure 5 : Schéma général de l'ovogenèse .....	24
Figure 6 : Représentation schématique des différents stades de la folliculogenèse .....	26
Figure 7 : Folliculogenèse, ovogenèse et cycle ovarien.....	28
Figure 8 : a) Organisation schématique d'une mitochondrie, b) Coupe électronique.....	33
Figure 9 : La chaîne respiratoire mitochondriale.....	35
Figure 10 : Remodelage mitochondrial, par les phénomènes de fusion et de fission .....	37
Figure 11 : Transport des protéines dans la mitochondrie .....	39
Figure 12 : Le génome mitochondrial humain .....	40
Figure 13 : Sites nécessaires à la réplication et à la transcription de l'ADNmt .....	42
Figure 14: Goulot d'étranglement génétique mitochondrial .....	46
Figure 15 : Evolution du taux d'ADN mitochondrial pendant l'ovogenèse et l'embryogenèse .....	47
Figure 16 : Deux grandes voies de l'apoptose .....	50
Figure 17 : Protocole d'extraction de l'ADN avec le kit NucleoSpin® Tissue de Macherey-Nagel ....	63
Figure 18 : Protocole de purification des produits de PCR avec le kit « High Pure PCR Product Purification kit » de Roche Diagnostics.....	65
Figure 19 : a) Quantification des standards d'ADNmt par rapport au marqueur de taille « GeneRulerLow Range DNA ladder ». b) Témoins négatifs.....	66
Figure 20: Plaque « F1r1 ovocyte » : Quantification de l'ADN mitochondrial dans les ovocytes. a) Courbe de fluorescence des standards en fonction du nombre de cycles, b) Gamme d'étalonnage des standards, c) Courbe de fluorescence des échantillons en fonction du nombre de cycles, d) Courbe de fusion des échantillons. ....	68
Figure 21 : Protocole d'extraction de l'ARN avec le kit NucleoSpin® RNA XS de Macherey-Nagel...	69
Figure 22 : Comparaison du taux d'ADNmt ovocytaire selon le profil DOR ou NOR.....	74
Figure 23 : Comparaison du taux d'ADNmt dans les cellules folliculeuses selon le profil ovarien ...	74
Figure 24 : Comparaison de l'expression de la catalase selon le profil DOR ou NOR.....	75
Figure 25 : Comparaison de l'expression de la SOD <sub>2</sub> selon le profil DOR ou NOR.....	75

Figure 26 : Comparaison de l'expression de PGC-1 $\beta$ selon le profil DOR ou NOR .....	75
Figure 27 : Comparaison de l'expression de SIRT1 selon le profil DOR ou NOR.....	76
Figure 28 : Comparaison de l'expression de SIRT3 selon le profil DOR ou NOR.....	76

### **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Différents transcrits de l'ADN mitochondrial.....	40
Tableau 2 : Double origine génétique des sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale....	41
Tableau 3 : Description des amorces utilisées pour la qPCR.....	64
Tableau 4 : Description des amorces utilisées pour la RT-qPCR.....	70
Tableau 5 : Caractéristiques des deux types de population "DOR" et "NOR" .....	73

## ABREVIATIONS

**ADAM TS-1** : A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin type 1 motif

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**ADNc** : ADN complémentaire

**ADNmt** : ADN mitochondrial

**ADP** : Adénosine Di-Phosphate

**AIF** : Apoptosis Initiating Factor

**AMH** : Hormone Anti-Mullérienne

**AMP** : Assistance Médicale à la Procréation

**AMPc** : Adénosine MonoPhosphate cyclique

**ANT** : Adenine Nucleotide Translocase

**AOD** : Atrophie Optique Dominante

**APAF-1** : Apoptotic Protease Activating Factor-1

**ARN** : acide ribonucléique

**ARNm** : ARN messenger

**ARNPOLmt** : ARN polymerase mitochondriale

**ARNr** : ARN ribosomal

**ARNt** : ARN de transfert

**ATP** : Adénosine Tri-Phosphate

**AUGMENT** : Autologous Germline Mitochondrial Energy Transfer

**Bak** : Bcl-2 homologous Antagonist/Killer

**Bax** : Bcl-2-Associated X Protein

**Bcl-2** : B-cell lymphoma 2

**BER** : Base-Excision Repair

**BMP** : Bone Morphogenetic Protein

**CAD** : Caspase Activated Dnase

**CCO** : Complexe Cumulo-Ovocyttaire

**CFA** : Compte des Follicules Antraux

**CHCHD3** : Coiled-coil Helix Coiled-coil Helix Domain-containing protein 3

**CNGOF** : Collège National des Gynécologues Obstétriciens Français

**Cox-2** : Cyclo-Oxygénase-2

**CPP** : Comité de Protection des Personnes

**CSB** : Conserved Sequence Blocks

**CSF** : Cytostatic Factor

**Ct** : Cycle treshold

**D-Loop** : Displacement Loop

**dNTP** : désoxyribonucléotide

**DOR** : Diminished Ovarian Reserve

**DPI** : Diagnostic Pré-Implantatoire

**DRP1** : Dynamin-Related Protein 1

**e-SET** : elective-Single Embryo Transfer

**FAD** : Flavine Adenine Dinucléotide

**FDA** : Food and Drug Administration

**FIG $\alpha$**  : Factor in the germline alpha

**FIS1** : mitochondrial FISsion 1 protein

**FIV** : Fécondation In Vitro

**FOXL2** : Forkhead Box L2

**FSH** : Follicle Stimulating Hormone

**GDF9** : Growth Differentiation Factor 9

**GP** : Globule Polaire

**GVBD** : Germinal Vesicle Break Down

**Has-2** : Hyaluronique Synthase-2

**HDAC** : Histone DésACétylase

**ICSI** : Intra-Cytoplasmic Sperm Injection

**IUI** : Insémination Intra-Utérine

**IMC** : Indice de Masse Corporelle

**IMSI** : Intracytoplasmic Morphologically-selected Sperm Injection

**IFN** : Interferon

**IRP** : Iron Regulatory Protein

**ISCU** : Iron-Sulfur Cluster scaffold protein-U

**kDa** : kiloDalton

**KL** : Kit-Ligand

**LH** : Luteinizing Hormone

**LSP** : Light Strand Promter

**MAS** : Meiosis Activating Stérol

**MII** : métaphase II

**MELAS** : Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Strokeliike episodes syndrom

**MERRF** : Myoclonic Epilepsy with Ragged-Red-Fibers syndrom

**MFRTA** : Mitochondrial Free Radical Theory of Aging

**MIB**: Mitochondrial Intermembranespace Bridging complex

**MIV** : Maturation In Vitro

**MFN1 et 2** : Mitofusine 1 et 2

**MnSOD** : SuperOxide Dismutase à Manganèse

**MOMP** : Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization

**MPF** : M-Phase Promoting Factor

**MRP RNase** : Mitochondrial RNA Processing RNase

**mTOR** : mammalian Target Of Rapamycin

**NAD** : Nicotinamide Adenine Dinucléotide

**NCoA3** : Nuclear Receptor Coactivator 3

**NOR** : Normal Ovarian Reserve

**NRF 1** : Nuclear Respiratory Factor 1

**OMI** : Oocyte Meiotic Inhibitor

**OPA1** : Optic Atrophy 1

**OSC** : Oogonial Stem Cells

**OSF** : Oocyte-Secreted Factor

**OXPPOS** : Oxydative Phosphorylation

**PI3K** : Phospho-Inositide 3-Kinase

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**Puma** : p53 up-regulated modulator of apoptosis

**qPCR** : quantitative Polymerase Chain Reaction

**PDH** : Pyruvate DésHydrogénase

**RT-qPCR** : Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction

**POLG** : POLymérase Gamma

**PPAR1** : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-1

**PTEN** : Phosphatase et TENsin homolog

**PTPC** : Permeability-Transition Pore Complex

**ROC** : Receiver Operating Characteristic Curve

**ROS** : Reactive Oxygen Species

**SAM50** : Sorting and Assembling Machinery 50

**SER** : Smooth Endoplasmic Reticulum

**SF1** : Steroidogenic Factor 1

**Sirtuin** : Silent Information Regulator

**TAS** : Terminaison Associated Sequences

**TEC** : Transfert d'Embryon Congelé

**TFAM** : Transcription Factor A Mitochondrial

**TGF  $\beta$**  : Transforming Growth Factor  $\beta$

**TIM** : Translocase of Inner Membrane

**TNF  $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

**TOM** : Translocase of Outer Membrane

**TRAIL** : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

**TXN1** : Thioredoxin 1

**VDAC** : Voltage-Dependant Anion Channel

**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor

**ZP** : Zone Pellucide

# **1/ Généralités bibliographiques**



La fécondabilité, c'est-à-dire la probabilité de concevoir par cycle, diminue avec l'âge. Ce constat, conjugué à l'augmentation de l'âge de la grossesse chez la femme (30 ans en France en 2010), permet d'appréhender pourquoi l'infertilité liée à l'âge constitue actuellement une problématique prépondérante dans les consultations d'infertilité. La baisse de la fertilité avec l'âge est déterminée par la diminution à la fois quantitative et qualitative de la réserve ovarienne [1]. A partir de 35 ans, on observe une diminution accélérée de ce stock ovocytaire correspondant à un déclin de la fertilité. Chez certaines patientes, cette diminution de la réserve ovarienne (DOR) survient prématurément avec une altération précoce des marqueurs de la réserve ovarienne. Elle est généralement associée à une mauvaise réponse à la stimulation ovarienne et à des chances de grossesse diminuées en FIV [2, 3].

La mitochondrie, organe cytoplasmique quantitativement le plus important dans l'ovocyte, pourrait intervenir à deux titres dans la pathogenèse de cette DOR : d'une part en raison de son rôle sur la qualité ovocytaire, et d'autre part du fait de son implication dans l'atrésie folliculaire via son rôle dans l'apoptose.

Au sein du follicule ovarien, le dialogue entre ovocyte et cellules folliculeuses joue un rôle majeur dans la croissance et la maturation de l'ovocyte, avec l'acquisition de sa compétence à la méiose et au développement embryonnaire. Les cellules folliculeuses fournissent nutriments et facteurs de croissance, tandis que parallèlement, l'ovocyte sécrète des facteurs paracrines appelés OSF (Oocyte-Secreted Factor), tels que le GDF-9 (Growth Differentiation Factor 9) et le BMP-15 (Bone Morphogenetic Protein 15), supportant ainsi la croissance, la prolifération et la différenciation des cellules folliculeuses.

Ce travail se base sur l'hypothèse d'une implication de la mitochondrie dans les processus de vieillissement ovarien, dont les cellules folliculeuses pourraient être le témoin. Après quelques données épidémiologiques sur la fertilité, avec notamment l'importance du critère de l'âge de la femme sur la fécondabilité, nous évoquerons le rôle majeur des cellules folliculeuses dans la biogenèse ovocytaire, par un système de signalisation bidirectionnelle entre l'ovocyte et la cellule folliculeuse. Puis, nous présenterons quelques rappels sur la mitochondrie, et nous détaillerons leur importance dans la qualité ovocytaire et la genèse de l'infertilité. Dans un deuxième temps, nous présenterons les différentes techniques utilisées

afin de mener à bien ce projet, et nous exposerons les résultats obtenus. Enfin pour clore ce travail, nous discuterons de l'enjeu de ce projet dans la compréhension du vieillissement ovarien, avant d'exposer les perspectives que nous envisageons par la suite d'explorer.

## **A. FERTILITE ET VIELLISSEMENT OVARIEN**

### **I. Epidémiologie de la fertilité**

#### **1. Définitions et étiologies**

La fertilité se définit comme l'aptitude biologique à obtenir une naissance vivante, tandis que la fécondité fait référence à un état, c'est-à-dire le fait d'avoir eu un enfant vivant. En France, la prévalence de l'infertilité est estimée à 15 %, ce qui signifie qu'un couple sur six consulte au moins une fois dans sa vie pour une difficulté à procréer, soit 60 000 nouveaux couples par an en France. Deux approches sont principalement utilisées pour mesurer la fertilité : le Délai Nécessaire pour Concevoir (DNC), et la fécondabilité, c'est-à-dire la probabilité de concevoir à chaque cycle. Les étiologies incriminées sont réparties comme suit : facteur masculin prédominant (20 %), facteur féminin (33 %), facteur mixte à la fois féminin et masculin (39 %), tandis que les étiologies idiopathiques représentent tout de même 8 % des cas [4]. L'âge des couples désirant un enfant occupe une place prépondérante et croissante parmi ces causes d'infertilité.

#### **2. Importance de l'âge sur la fertilité**

En France, l'âge de la première maternité est de 28 ans en moyenne en 2010, soit quatre ans plus tard qu'à la fin des années 1960, tandis que l'âge moyen des mères à l'accouchement quel que soit le rang de naissance de l'enfant atteint 30 ans. Ce report d'âge, responsable d'une diminution relative de la fertilité, expliquerait, au moins en partie, l'augmentation du nombre de couples ayant recours aux techniques d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP). En effet, la fécondabilité naturelle d'un couple diminue avec l'âge : de 25 % par cycle à l'âge de 25 ans elle passe à 12 % à 35 ans et seulement 6 % à 42 ans.

Avec l'effet cumulatif des cycles, à 25 ans, les chances de grossesse sont de 60 % après six mois d'exposition optimale, de 80 % après un an, et de 90 % après deux ans. Ces valeurs sont diminuées de 50 % chez les femmes de 35 ans, et jusqu'à 75 % pour les femmes de 42 ans. Ainsi, à cet âge, la probabilité cumulée de grossesse n'atteint que 25 % après deux ans d'essai.

Par ailleurs, la prévalence des fausses-couches spontanées augmente également avec l'âge : de 12 % de FCS à 25 ans, on passe à 35 % à 35 ans, jusqu'à près de 50 % à 42 ans, en raison probablement d'une chute de la réceptivité endométriale, associée à une diminution de la qualité ovocytaire embryonnaire [5].

### **3. Place de l'AMP**

D'après le rapport de l'Agence de la Biomédecine, 141 277 tentatives d'AMP ont été réalisées en 2011, avec environ 2 fois plus tentatives de FIV qu'il y a 10 ans (79 529 cycles de FIV intraconjugales contre 37 946 en 1999 d'après le rapport FIVNAT). Selon l'indication, la prise en charge du couple sera orientée vers la technique appropriée : IUI (Insémination Intra-Utérine), FIV (Fécondation In Vitro) classique, ICSI (IntraCytoplasmic Spermatozoïde Injection), TEC (Transfert d'Embryon Congelé) voire IMSI (Intracytoplasmic Morphologically-selected Sperm Injection), don de gamètes ou d'embryons, DPI (Diagnostic Pré-Implantatoire), DPC (Diagnostic Pré-Conceptionnel), MIV (Maturation In Vitro)... Cependant, malgré l'essor des techniques, les taux de succès en AMP restent relativement faibles, puisqu'on estime le taux de grossesse échographique en FIV à 23 %, et le taux d'accouchement à 19 % par ponction. L'âge de la femme constitue également un facteur péjoratif sur les taux de grossesse en AMP. L'âge moyen des patientes lors d'un premier recours à la FIV est de 34,7 ans en 2002 (FIVNAT 2002), alors que la proportion de FIV entreprises chez des femmes après 40 ans est en constante augmentation, passant de 12 % en 1997 à 15 % en 2008. Or, la chute des taux de succès en FIV s'amorce dès 35 ans : le taux d'accouchement par ponction passe de près de 20 % avant 30 ans à 13.1 % à 37 ans et à 6.5 % à 42 ans (FIVNAT 2006). Selon le modèle de Léridon, il est possible d'évaluer les chances de succès d'un couple cherchant à avoir un enfant selon l'âge de la femme en début de grossesse [6] :

- Sur 100 femmes cherchant à concevoir à partir de 30 ans, 91 auront un enfant dans les 4 ans sans recourir à l'AMP, 3 y parviendront ensuite grâce à l'AMP et les 6 autres resteront sans enfant ;
- Sur 100 femmes cherchant à concevoir à partir de 35 ans, 82 auront un enfant dans les trois ans, 4 grâce à l'AMP, et 14 resteront sans enfant ;

- A partir de 40 ans, 57 femmes réussiront à concevoir dans les deux ans, 7 en recourant à l'AMP et 36 resteront sans enfant.

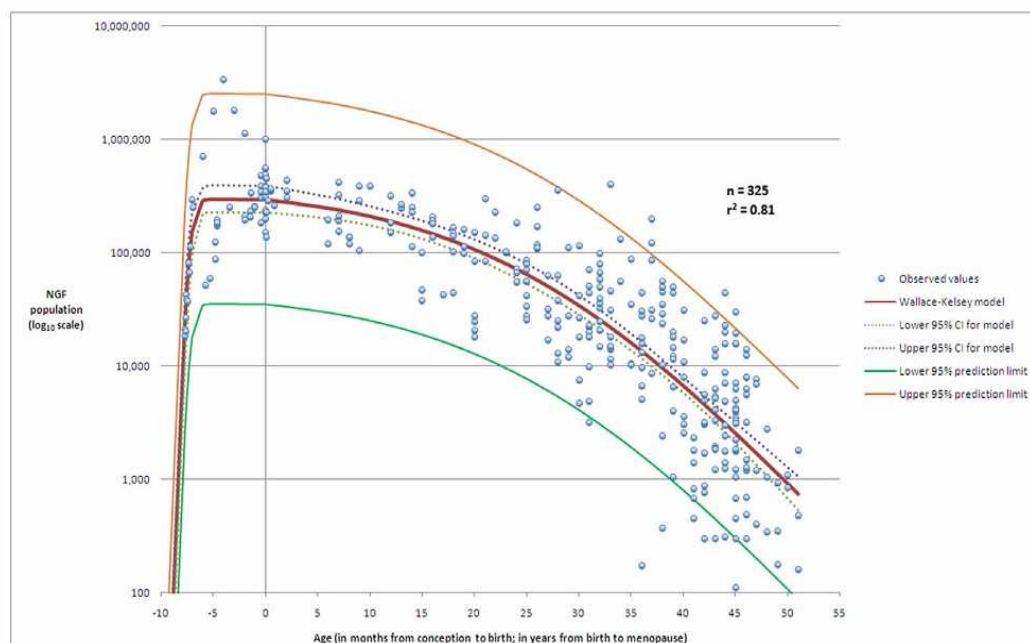
Le rôle prépondérant de la qualité ovocytaire dans la chute de la fertilité avec l'âge est illustré par le modèle du don d'ovocyte. En effet, chez les receveuses âgées (> 40 ans) bénéficiant d'ovocytes issus de femmes jeunes, le taux de succès en AMP avoisine celui de femmes jeunes effectuant une FIV en intraconjugal [7].

En conséquence, le Collège National des Gynécologues Obstétriciens Français (CNGOF) recommande de consulter après un an de rapports réguliers en l'absence de grossesse, et dès 6 mois si la femme a plus de 35 ans [8].

## II. Vieillesse ovarien

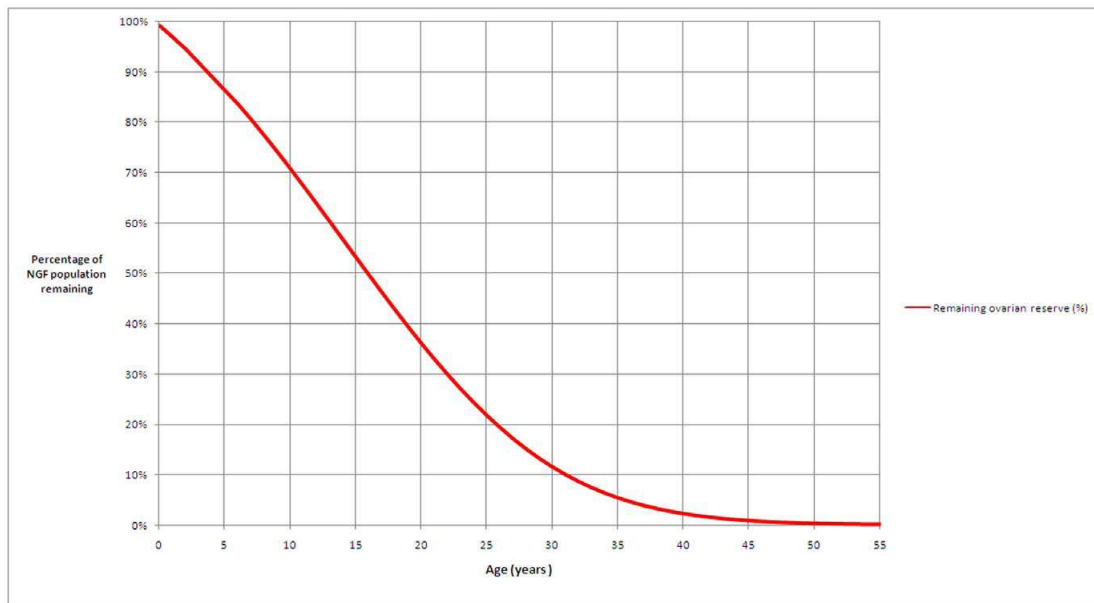
### 1. Atrésie folliculaire

Le pool ovocytaire est constitué dès le cinquième mois de la vie intra-utérine. Puis, physiologiquement, on observe une diminution de ce stock par apoptose, de façon exponentielle avec l'âge [9], avec un point d'inflexion à 35 ans. Au cinquième mois de la vie intra-utérine, 6 à 7 millions de follicules primordiaux sont présents, puis décroît aux alentours de 1 million à la naissance, atteint 300 000 à la puberté, pour arriver à une valeur critique de 25 000 à un âge moyen de 37,5 ans ; et aboutir à environ 1 500 à la ménopause (Figure 1) [10].



**Figure 1** : Modèle de Wallace représentant le déclin des follicules primordiaux avec l'âge [11]

De récentes études estiment que 95 % des femmes de 30 ans possèdent moins de 12 % du stock initial de follicules et qu'à l'âge de 40 ans, il reste moins de 3 % du stock initial [12] (Figure 2).



**Figure 2** : Pourcentage de la réserve ovarienne en fonction de l'âge [11]

La diminution accélérée du stock ovocytaire s'accompagne d'une élévation de la FSH, liée à une libération diminuée d'inhibine B par l'ovaire. On observe initialement un raccourcissement des cycles menstruels, puis une irrégularité des cycles. Le stade suivant est caractérisé par l'épuisement folliculaire, signant la ménopause. Celle-ci survient à 51 ans en moyenne, mais 10 % des femmes seront ménopausées à l'âge de 45 ans, 1 % avant 40 ans et 0,1 % avant 30 ans. On estime que l'infertilité précède d'environ 13 ans la survenue de la ménopause, soit vers un âge moyen de 41 ans, mais plus précocement chez un certain nombre de femmes [12]. En supposant cet intervalle fixe de 13 ans entre le début du déclin accéléré de la fertilité et la ménopause, une proportion importante de femmes d'une trentaine d'années asymptomatiques serait à risque d'apparition précoce d'une hypofertilité. Ainsi, chez certaines patientes, la diminution de la réserve ovarienne (DOR) survient prématurément avec une altération précoce des marqueurs de la réserve ovarienne. Elle est généralement associée à une moins bonne réponse à la stimulation ovarienne et à des chances de grossesses diminuées en FIV [2, 3].

Ce vieillissement précoce, touchant 10 % de la population générale, est à différencier de l'Insuffisance Ovarienne Prématurationnée (IOP). Celle-ci est caractérisée par une aménorrhée de plus de 4 mois, survenant avant l'âge de 40 ans, et associée à un taux de FSH > 40 UI/L sur au moins 2 prélèvements [13]. Sa prévalence est estimée à 1-2 % de la population féminine.

## **2. Altérations qualitatives**

En plus de la diminution du pool de follicules primordiaux, il existe également une accumulation d'anomalies qualitatives au sein des ovocytes restants : délétions et déplétions de l'ADN mitochondrial [14], anomalies de formation du fuseau méiotique et non-disjonctions méiotiques [15] à l'origine d'aneuploidies et de fausses couches, sclérose vasculaire induisant une ischémie de l'ovaire... Grondahl et al. [16] ont montré que 342 gènes sont exprimés dans les ovocytes différemment selon l'âge de la patiente, et constituent donc des candidats potentiels prédictifs de la qualité ovocytaire. Une autre étude menée sur 500 ovocytes en métaphase II de souris a identifié sur 11 000 transcrits 5 % de gènes (530 gènes) dont l'expression génique était significativement modifiée [17].

Par ailleurs, les cellules de la granulosa sont le siège de nombreuses modifications liées à l'âge : diminution de l'index mitotique, augmentation de l'apoptose, diminution de la synthèse des glycoprotéines, des stéroïdes, et des facteurs de croissance, avec une perturbation de l'interaction entre l'ovocyte et les cellules folliculeuses.

De nombreux facteurs de signalisation sont impliqués dans la perte folliculaire : les facteurs pro-apoptotiques bax [18] et Fas-Fas ligand [19], le facteur anti-apoptotique Bcl-2, les facteurs de survie ovocytaire Kit ligand-c-kit [20, 21], le facteur de transcription FOXL2 [21] exprimé dans les cellules de la granulosa et inhibiteur de l'activation des follicules de la réserve, ou la voie de signalisation PTEN-PI3K-Akt (Figure 4) [22]. Sont impliqués également GDF9, BMP-4, BMP-7, BMP-15, l'AMH, la FSH, le récepteur nucléaire SF1 ou le LIF stimulant la synthèse du KL par les cellules de la granulosa (Figure 3)...Par ailleurs, alors que la dégénérescence de l'ovocyte par apoptose est à l'origine de la disparition des follicules primordiaux et primaires, dans les follicules à antrum, l'atrésie est initiée par l'apoptose des cellules de la granulosa, puis des cellules de la thèque [23].

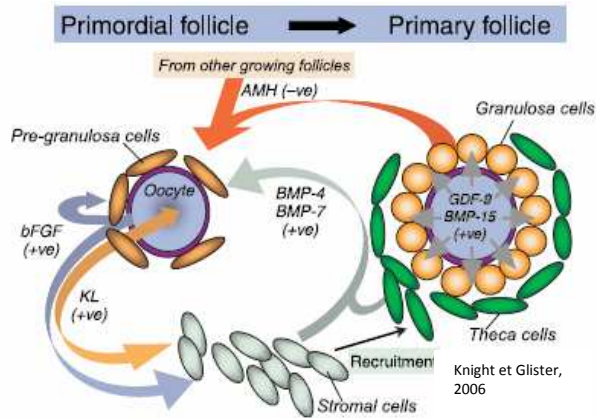


Figure 3 : Facteurs mis en jeu dans l'entrée en croissance du follicule primordial

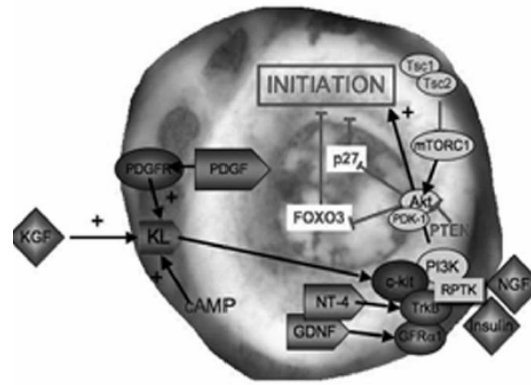


Figure 4 : Implications de la voie de PI3K dans l'activation ou le maintien au repos des follicules primordiaux [22]

### **3. Evaluation de la réserve ovarienne**

L'évaluation de la réserve ovarienne par les dosages hormonaux constitue un préalable incontournable à la prise en charge d'une infertilité. Le bilan hormonal sera pratiqué au début du cycle menstruel (J2-J3 du cycle). Il comprendra le dosage de la FSH plasmatique conjointement de celui de l'oestradiolémie, associé au dosage de l'AMH dont la valeur est indépendante du cycle menstruel. Le Compte des Follicules Antraux (CFA) sera réalisé par échographie en 1<sup>ère</sup> partie de cycle. L'AMH et le CFA, pour lesquels De Vet a montré une bonne corrélation [24], constituent de bons marqueurs de la réponse ovarienne à une stimulation ovarienne. Ils permettent de définir potentiellement de bonnes ou de mauvaises répondeuses, mais ont cependant une faible valeur prédictive de survenue de grossesse [25]. En outre, le dosage de l'AMH, en tant que marqueur de la qualité ovocytaire demeure largement controversé [26].

## **B. OVOCYTE ET MICRO-ENVIRONNEMENT FOLLICULAIRE**

### **I. Ovogenèse**

L'ovogenèse représente l'ensemble des processus permettant la multiplication, la croissance et la différenciation des cellules germinales femelles jusqu'au stade de l'ovocyte mature. Ces phénomènes sont sous la dépendance du dialogue existant entre l'ovocyte et les cellules folliculeuses. C'est un processus discontinu, se déroulant de la vie fœtale, jusqu'à la ménopause, et se déroulant selon la chronologie suivante (Figure 5 et annexe 1) [27] :

- Multiplification : Les ovogonies se multiplient par mitose pendant la vie foetale, et entrent en méiose jusqu'au stade d'ovocyte I, bloqué en fin de prophase de première division (noyau sous forme de vésicule germinative). Les ovocytes I s'associent avec les cellules périovocytaires, pour former les follicules primordiaux.
- Croissance : Cette longue phase, débutant après la naissance et se terminant lors de la maturation finale du follicule, permet à l'ovocyte de passer d'une taille de 35-40  $\mu\text{m}$  à une taille de 120  $\mu\text{m}$  de diamètre. Le noyau, au stade de vésicule germinative, voit son diamètre doubler de taille. L'ovocyte est alors le siège de phénomènes de transcription et de synthèses protéiques intenses (ZP1, ZP2 et ZP3, protéines du cycle cellulaire) et de modifications cytoplasmiques (au niveau mitochondrial, de l'appareil de Golgi, des granules corticaux, et de la zone pellucide). Au fur et à mesure de sa croissance, l'ovocyte pourra alors acquérir sa compétence méiotique puis sa compétence au développement, se finalisant après la décharge ovulante de LH. A la fin de la phase de croissance, la chromatine se réorganise au niveau périnucléolaire, et les activités de transcription s'estompent.
- Maturation: Elle comprend une maturation cytoplasmique, nucléaire et membranaire. La maturation cytoplasmique correspond à la capacité que possède un ovocyte mature à subir une fécondation ainsi qu'à soutenir un développement embryonnaire normal, grâce à l'accumulation de transcrits maternels. Au cours de la croissance ovocytaire, l'acquisition de la compétence cytoplasmique reste difficilement appréciable, en dehors de l'évaluation du diamètre de l'ovocyte. Concernant la maturation nucléaire, chaque mois et ce jusqu'à la ménopause, le pic préovulatoire de LH permettra à un ovocyte de reprendre sa méiose (métaphase I, anaphase I et télophase I). L'ovocyte expulse alors son premier globule polaire, sans subir d'interphase, puis débute sa deuxième division méiotique jusqu'au stade de métaphase II. Seul le processus de fécondation lui permettra de terminer sa méiose (anaphase II et télophase II), et d'expulser son deuxième globule polaire.



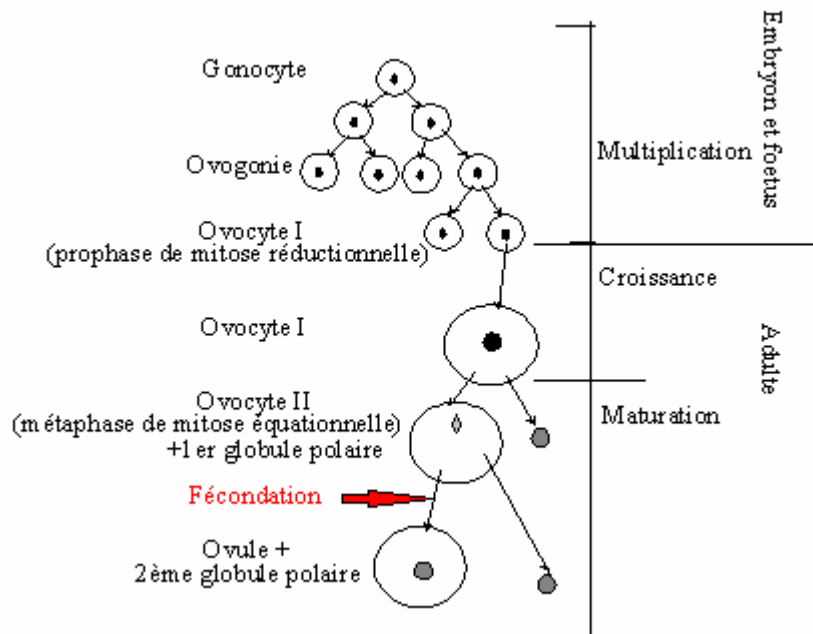


Figure 5 : Schéma général de l'ovogenèse [28]

Au niveau moléculaire, l'inhibition de la reprise de méiose au stade de prophase I est rendue possible grâce à des facteurs folliculaires comme l'OMI (Oocyte Meiotic Inhibitor), et grâce des facteurs ovocytaires comme une concentration élevée en AMPc. En revanche, la décharge ovulante de LH va bloquer la transmission du signal OMI, induire une synthèse de Stéroïdes Activateurs de Méiose (MAS) par les cellules du cumulus, une libération de calcium intracellulaire, et diminuer la concentration d'AMPc, permettant ainsi la reprise de la méiose. Celle-ci est également initiée par un facteur cytoplasmique, le MPF (M-Phase Promoting Factor), qui induit la phosphorylation de diverses cibles (histones 1, l'ARN polymérase, protéines associées aux microfilaments...). Ces phénomènes entraînent la rupture de la vésicule germinative (GVBD), la condensation des chromosomes, le remodelage du cytosquelette pour la mise en place du fuseau méiotique, ainsi que des modifications de la synthèse protéique. Le maintien de l'ovocyte en métaphase II est alors permis grâce au facteur cytotatique CSF, kinase inhibant la dégradation des cyclines et permettant le maintien d'un taux élevé de MPF.

## II. Folliculogenèse

La folliculogenèse correspond à la succession des différentes étapes du développement folliculaire de la sortie de la réserve jusqu'à l'ovulation ou l'involution [27]. C'est un phénomène continu où l'ovaire a une activité propre et une régulation locale, alors que l'axe hypothalamo-hypophysaire ne régule, à partir de la puberté et de façon cyclique, que les étapes de la folliculogenèse terminale et de l'ovulation. L'évolution folliculaire la plus

commune est l'atrésie (99.9%), puisque sur un stock foetal de 7 millions de follicules, 400 follicules seulement iront jusqu'à l'ovulation.

### **1. Différents types histologiques de follicules**

Au cours de son développement, un follicule va passer par différents stades (Figure 6 et annexe 2) :

- Follicule primordial : Un follicule primordial est constitué d'un ovocyte bloqué en fin de prophase I, et d'une couche de cellules folliculeuses endothéliformes aplaties. Les follicules primordiaux représentent plus de 95 % de la population folliculaire totale de l'ovaire, constituant la "réserve ovarienne".
- Follicule primaire : Un follicule primaire est constitué d'un ovocyte bloqué en fin de prophase I, et d'une couche de cellules folliculeuses cubiques. La membrane de Slavjanski devient visible, ainsi que le premier signe de formation de la zone pellucide.
- Follicule secondaire : Ce follicule est composé d'un ovocyte bloqué en fin de prophase I, et de plusieurs couches de cellules folliculeuses cubiques, constituant la granulosa.
- Follicule préantral : Ce follicule présente un nombre supérieur de couches de cellules de la granulosa, tandis que les cellules du stroma s'organisent en thèques interne et externe. C'est à ce stade que le follicule devient sensible aux gonadotrophines.
- Follicule tertiaire ou cavitaire ou « à antrum » : A ce stade apparaît une cavité riche en liquide folliculaire, l'antrum. Les cellules folliculeuses s'organisent en cumulus oophorus au niveau duquel fait saillie l'ovocyte (la couche cellulaire interne prenant le nom de corona radiata), et en granulosa murale pour celles regroupées le long de la paroi folliculaire. La thèque interne, très vascularisée, est formée de cellules chargées d'aromatiser les androgènes en estrogènes, tandis que la thèque externe est constituée de cellules stromales.

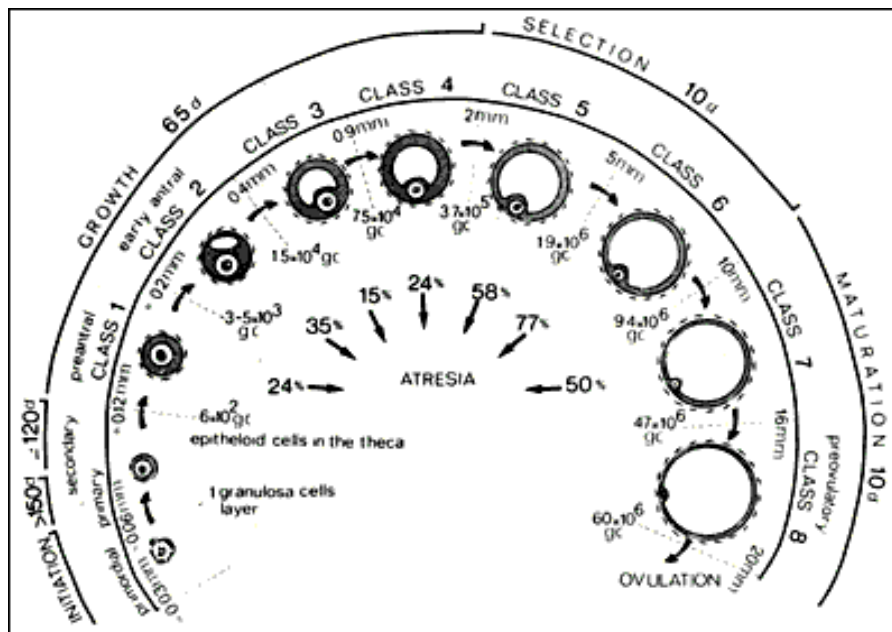


Figure 6 : Représentation schématisique des différents stades de la folliculogénèse [29]

## 2. Chronologie

La folliculogénèse suit la dynamique suivante (Figure 7) :

- Quiescence des follicules primordiaux
- Initiation de la croissance folliculaire de base

Cette étape correspond au passage du stade de follicule primordial à primaire. Le nombre de follicules sortant de la réserve par jour est proportionnel à la réserve ovarienne. Chez une femme de 20 ans, une vingtaine de follicules par jour initient ainsi leur croissance. L'ovocyte augmente en taille, de même que son noyau. A partir d'une certaine taille, l'envoi de signaux paracrines aux cellules péri-ovocytaires entraîne leur transformation en cellules cubiques, ainsi que leur multiplication. Les facteurs impliqués sont notamment le Kit-Ligand et son récepteur c-kit, le LIF ; tandis que l'AMH, produite par les cellules de la granulosa des follicules primaires à antraux de 2-7 mm, exerce un rétrocontrôle négatif en inhibant l'initiation de la croissance des follicules primordiaux.

- Croissance folliculaire de base

Cette phase permet le passage du stade de follicule primaire au stade de follicule à antrum de 2-5 mm de diamètre. Elle implique des facteurs ovocytaires, tels que GDF9 et BMP15, nécessaires à la croissance des follicules primaires et à la formation des follicules secondaires.

- Développement folliculaire terminal

Cette dernière phase se trouve sous la dépendance des gonadotrophines, avec par conséquent un impact possible des traitements de stimulation de l'ovulation en FIV. D'une durée de 15 jours, elle est activée dès la régression du corps jaune du cycle précédent, et permet le passage d'un follicule de 2 mm de diamètre au stade pré-ovulatoire de 20 mm, avec une multiplication intense des cellules de la granulosa. Trois étapes successives sont à distinguer [27] :

- Recrutement : Suite à la régression du corps jaune pendant la phase lutéale du cycle précédent, la chute conjointe de l'estradiol et de l'inhibine A entraîne par rétrocontrôle l'augmentation de la FSH. Les follicules antraux recrutables, c'est-à-dire sensibles aux gonadotrophines, entrent alors en croissance terminale, constituant une cohorte de follicules. Pendant la phase folliculaire précoce, l'augmentation progressive de la FSH permet la multiplication des cellules de la granulosa, puis l'acquisition sur celles-ci de récepteurs à FSH, induisant ainsi l'expression d'une activité aromatasé convertissant les androgènes en estrogènes.

- Sélection : En milieu de phase folliculaire, sous l'effet de l'augmentation progressive de l'estradiol et de l'inhibine B sécrétés par les follicules recrutés, le taux de FSH diminue. La chute brutale de la FSH n'est pas supportable par tous les follicules, et seuls les follicules ayant le seuil de réponse à la FSH le plus bas - correspondant au nombre d'ovulation caractéristique de l'espèce - poursuivent leur croissance.

- Dominance : Cette phase voit la croissance et la maturation du follicule préovulatoire, la régression par atrophie des autres follicules de la cohorte, et le blocage du recrutement de nouveaux follicules. Progressivement le follicule passe de FSH- à LH-dépendant, par acquisition de récepteurs à LH sur la granulosa et pourra ainsi répondre à la décharge pré-ovulatoire de LH.

- Ovulation

L'ovulation correspond à l'expulsion de l'ovocyte hors du follicule. L'augmentation exponentielle de la sécrétion d'estradiol par le follicule dominant exerce un rétrocontrôle positif sur la sécrétion de LH. L'ovulation survient alors environ 36 heures après le début du pic de LH. De nombreux remaniements morphologiques interviennent, comprenant l'arrêt des divisions cellulaires des cellules de la granulosa, la rupture des jonctions perméables entre les cellules de la granulosa, la dissociation des cellules du cumulus oophorus (sécrétion importante d'acide hyaluronique) sous l'effet de facteurs ovocytaires tels GDF 9 et BMP 15,

la pénétration des vaisseaux dans la granulosa, la tuméfaction de la thèque externe, l'aplatissement des cellules de l'épithélium ovarien, et enfin la contraction et la rupture folliculaire, avec la libération du liquide folliculaire. De nombreux facteurs folliculaires ou ovocytaires sont impliqués au moment de l'ovulation : l'estradiol et la progestérone, des facteurs intervenant sur le système vasculaire et l'angiogénèse (oxyde d'azote, endothéline, système rénine-angiotensine, VEGF), des protéases (plasmine, collagénase, ADAM TS-1, cathepsine L), et des facteurs pro-inflammatoires (TNF  $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , histamine, bradykinine).

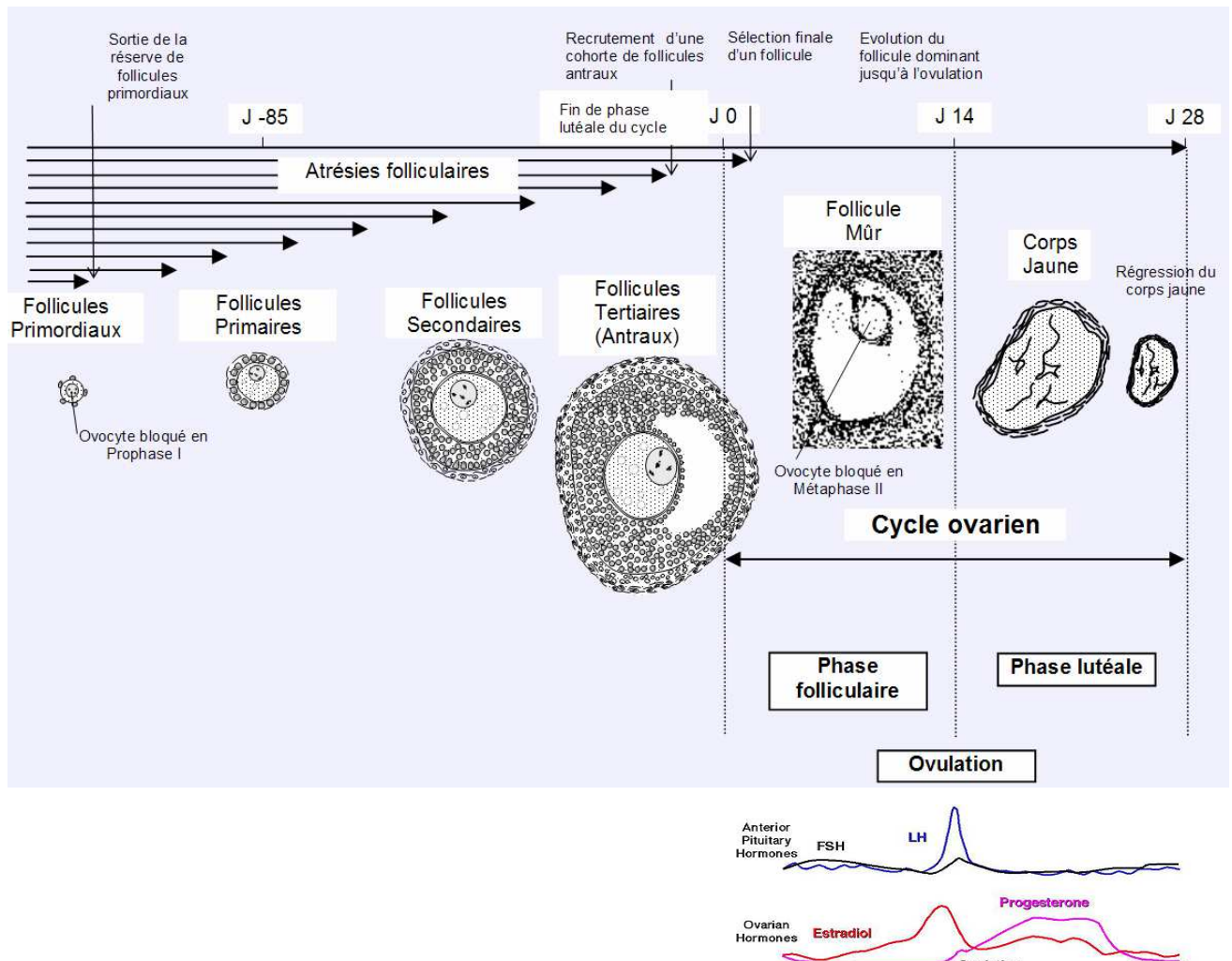


Figure 7 : Folliculogénèse, ovogénèse et cycle ovarien

### III. Communication bidirectionnelle ovocyte/cumulus

#### 1. Mécanismes mis en jeu

Il existe un dialogue intense qui s'établit entre l'ovocyte et son microenvironnement folliculaire, selon deux types de mécanismes : les jonctions communicantes et les signaux paracrines. Ces échanges réciproques s'avèrent indispensables pour que les phénomènes de folliculogénèse et d'ovogénèse s'effectuent de manière harmonieuse et coordonnée. Cet

échange intéresse principalement les cellules du cumulus, qui malgré leur origine commune, se comportent très différemment des cellules de la granulosa murale. C'est à partir du stade tertiaire que les cellules du cumulus - composées de 5 000 à 8 000 cellules - se différencient des cellules de la granulosa et que s'intensifie le dialogue entre l'ovocyte et les cellules folliculeuses. Les facteurs sécrétés par l'ovocyte (GDF9, BMP15, BMP6, et les activines) seraient à l'origine de cette différenciation entre cellules du cumulus et cellules de la granulosa murale [30, 31].

#### a) Jonctions communicantes

Les cellules de la corona radiata présentent à leur pôle apical des prolongements cytoplasmiques qui traversent la zone pellucide jusqu'à l'oolemme. A l'extrémité se trouvent des jonctions communicantes permettant la diffusion de certaines substances, de poids moléculaire inférieur à 1 kDa : ions, métabolites, seconds messagers (AMPc, GMPc), nucléotides et certains acides aminés [32].

Structurellement, les jonctions communicantes sont formées de protéines de la famille des connexines. Ces sous-unités protéiques s'assemblent en hexamère pour former un connexon [33]. Un connexon est constitué d'un seul type de connexines (connexon homomérique) ou de plusieurs types combinés ensemble (connexon hétéromérique). Lorsque deux extrémités de connexons cylindriques provenant de cellules adjacentes se touchent, ils forment un canal intercellulaire reliant les deux cellules. Si les deux connexons sont identiques, la jonction est dite homotypique, en revanche, deux connexons différents forment une jonction hétérotypique. Les connexines37 (Cx37) sont constitutives des jonctions entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa, tandis que les connexines 43 (Cx43) composent les jonctions qui se mettent en place entre les cellules de la granulosa elles-mêmes. Au fur et à mesure de la croissance folliculaire, les jonctions communicantes augmentent en nombre et en dimension [34]. A partir de l'ovulation, lors de la reprise de la méiose, les prolongements cytoplasmiques se rétractent et les jonctions communicantes entre l'ovocyte et les cellules du cumulus disparaissent (mais persistent entre les cellules du cumulus elles-même). Cependant, l'intégrité du complexe cumulo-ovocyttaire reste indispensable pour le transport de celui-ci dans l'oviducte, via des phénomènes d'adhésion aux cellules épithéliales tubaires. La régulation de la communication par l'intermédiaire des

gap-junctions s'effectue par des réactions de phosphorylation des connexines, ainsi que par l'endocytose et la dégradation protéolytique des connexons.

La zone pellucide constituant une barrière imperméable à certaines protéines et sucres de haut poids moléculaire, les cellules du cumulus vont assurer un rôle nutritionnel essentiel à la croissance ovocytaire [35]. Les cellules du cumulus absorbent de nombreuses substances et les transmettent à l'ovocyte via les jonctions communicantes. On estime qu'environ 85 % des nutriments nécessaires à la croissance de l'ovocyte transitent par les cellules folliculeuses [36]. De plus, les cellules du cumulus ont la capacité de métaboliser préalablement certaines substances qui ne seraient pas directement assimilables par l'ovocyte. Les cellules du cumulus transforment ainsi le glucose en pyruvate, celui-ci étant ensuite acheminé à l'ovocyte et utilisé à des fins énergétiques. De la même façon, les cellules du cumulus métabolisent la cystine en cystéine, ensuite transmise à l'ovocyte pour la synthèse du glutathion. Le glutathion est alors impliqué dans la rupture des ponts disulfures permettant la décondensation de la chromatine du spermatozoïde, dans le remplacement des protamines par des histones [37], dans la formation des pronuclei, et dans la protection anti-oxydante contre les radicaux libres.

#### b) Signaux paracrines [38, 39]

Des facteurs paracrines sont échangés de manière bidirectionnelle entre l'ovocyte et les cellules du cumulus, avec une boucle de régulation entre les deux partenaires. Les signaux paracrines diffusent selon un gradient de concentration, et permettent la différenciation des cellules folliculeuses les plus proches de l'ovocyte, créant alors un micro-environnement spécialisé autour de l'ovocyte [40].

- Facteurs exprimés par l'ovocyte

Le récepteur de type tyrosine-kinase *c-kit* est indispensable à l'initiation de la croissance folliculaire du pool de follicules primordiaux, à la prolifération des cellules de la granulosa, à la différenciation des cellules de la thèque, et à la formation de l'antrum [41]. Le facteur *Figa* (Factor in the germline  $\alpha$ ) régule la production de molécules d'adhésion permettant la cohésion entre l'ovocyte et les cellules somatiques essentiels à l'organisation initiale des follicules primaires [42], ainsi que l'expression coordonnée des gènes *ZP1*, *ZP2* et *ZP3*. Les facteurs *GDF9* et *BMP15*, membres de la famille du TGF- $\beta$ , sont nécessaires à la folliculogénèse précoce, à la différenciation et à la prolifération des cellules de la granulosa.

Ainsi, les femmes présentant une mutation hétérozygote de *BMP15* dans la région propeptide souffrent d'insuffisance ovarienne prématurée [43]. Par ailleurs, *GDF9* intervient dans la mise en place de la matrice extra-cellulaire d'acide hyaluronique [30], tandis que *BMP15* joue un rôle dans la protection des cellules du cumulus contre l'apoptose [44]. Au moment de l'ovulation, *GDF9* va également augmenter l'expression des gènes codant pour la cyclo-oxygénase-2 (Cox-2) et pour l'acide hyaluronique synthase-2 (Has-2). Par ailleurs, *BMP15* et *GDF9* entretiennent un système de régulation en boucle avec les facteurs *kit*/*kit*-ligand [41].

- Facteurs exprimés par les cellules du cumulus

Le facteur *Kit Ligand KL* intervient dans la croissance et la maturation ovocytaire, par son rôle anti-apoptotique sur les cellules germinales primordiales. Les récepteurs à la LH (*LHR*) et à la progestérone (*PR*) sont acquis par les cellules du cumulus lors de la maturation finale de l'ovocyte, suite à l'activation des récepteurs à la FSH. L'activation des *LHR* entraîne un influx calcique intracellulaire provenant des cellules du cumulus et du milieu extracellulaire via les jonctions communicantes. Les oscillations calciques sont indispensables à la rupture de la membrane nucléaire (GVBD), à la reprise de méiose, au blocage de la polyspermie, et à la décondensation du noyau mâle. La cyclo-oxygénase *Cox2* induit la synthèse de la prostaglandine E2, qui elle-même joue un rôle dans la rupture de la paroi folliculaire, l'expansion du cumulus et la maturation de l'ovocyte. *Has-2* induit la synthèse d'acide hyaluronique nécessaire à la formation de la matrice extra-cellulaire.

## **2. Implications : Les cellules folliculeuses pourraient-elles représenter des marqueurs potentiels de la qualité ovocytaire ?**

Cette hypothèse a été étudiée en Fécondation In Vitro afin d'affiner les critères de sélection embryonnaire indirectement sur la qualité ovocytaire initiale. En effet, le choix des embryons à transférer ou à congeler est actuellement fondé sur des critères morphologiques, subjectifs et imparfaits : cinétique d'évolution, nombre et régularité des blastomères, fragmentation, existence d'un clivage précoce, présence de blastomères multinucléés. La politique actuelle de l'e-SET (elective-Single Embryo Transfer) vise à ne sélectionner pour le transfert intra-utérin que les embryons de bonne qualité, en privilégiant les transferts mono-embryonnaires afin de réduire le risque de grossesse multiple, tout en préservant les chances de conception.



En ce qui concerne la morphologie ovocytaire, certains critères de mauvais pronostic ont été proposés, comme les vacuoles d'endocytose, l'amas de SER, le bull's eye, une zone pellucide épaisse ou hérissée, un espace périvitellin élargi ou granuleux, un globule polaire polylobé ou fragmenté... mais ceux-ci se révèlent également imparfaits. Ainsi, le développement en routine de nouveaux marqueurs qui permettraient d'évaluer la qualité ovocytaire semble crucial, l'objectif étant de mettre au point de nouveaux marqueurs non invasifs et répondant aux critères suivants : reproductibilité, facilité de mise en œuvre, rapidité de réponse compatible avec le délai du transfert embryonnaire, faible coût et indépendance avec les autres critères morphologiques.

L'étroite relation morpho-fonctionnelle qui existe entre les cellules folliculeuses et l'ovocyte pendant l'ensemble des processus d'ovogenèse et de folliculogenèse laisse supposer que les cellules folliculeuses pourraient représenter des marqueurs non invasifs de la qualité ovocytaire. L'expression de certains gènes dans les cellules folliculeuses serait liée au profil DOR des patientes [45, 46], mais aussi à la maturité ovocytaire initiale [40, 47], à la fécondabilité [40, 48], à la qualité et au développement embryonnaires [40, 49, 50], ainsi qu'aux probabilités de grossesse [51, 52]. D'autres équipes ont montré que l'apoptose des cellules du cumulus pourrait constituer un facteur prédictif négatif de la qualité ovocytaire et de la survenue de grossesse [53].

D'autres approches enfin consisteraient à identifier une signature moléculaire du liquide folliculaire ou du milieu de culture [54-56].

## **C. MITOCHONDRIE ET FERTILITE**

### **I. Généralités sur les mitochondries**

Les mitochondries sont des organites intracellulaires présents dans la plupart des cellules eucaryotes aérobies (à l'exception des érythrocytes), dont le nombre peut varier de quelques unités à plusieurs milliers, en fonction du type cellulaire et des besoins énergétiques de la cellule. Leur origine semble remonter à 1.5 milliards d'années, par endosymbiose d'une  $\alpha$ -protéobactérie par une cellule procaryote. Elles jouent un rôle central dans le métabolisme énergétique, en fournissant l'essentiel de l'ATP utilisé pour les différents travaux cellulaires (72 kg d'ATP/jour pour un homme au repos), soit un rendement 17 fois supérieur à celui de la glycolyse. Une succession de réactions d'oxydo-réduction ménagées (chaîne respiratoire) permet la synthèse finale d'ATP, couplée à la consommation

d'O<sub>2</sub>, définissant le principe de l'O<sub>2</sub>PHOS (Oxidative Phosphorylation) [57]. Véritable usine énergétique de la cellule, et chef d'orchestre de diverses autres fonctions métaboliques, on conçoit dès lors l'importance de cet organite et les conséquences pathologiques qui résultent de son dysfonctionnement.

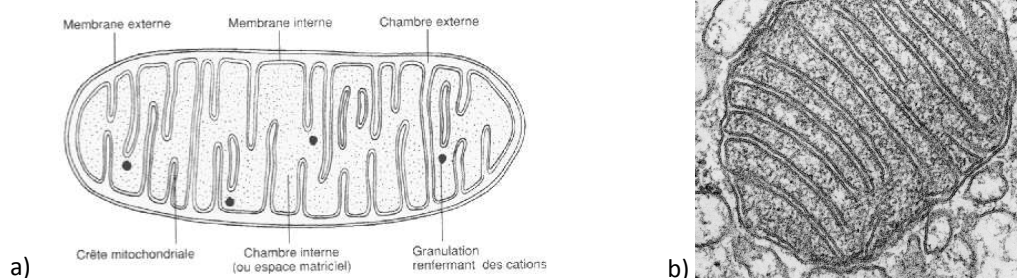
## **1. Organisation et structure**

### **a) Organisation**

Les mitochondries présentent une très grande plasticité en ce qui concerne leur taille, leur forme et leur distribution. Le nom de mitochondrie dérive d'ailleurs du grec « mitos » (filament), et « chondros » (granule), en raison de l'aspect variable au microscope optique. Leur taille peut varier de 0.5 à 1 µm de diamètre et de 2 à 10 µm de long. Par ailleurs, les mitochondries ne sont pas statiques. Elles se déplacent notamment dans les zones très demandeuses en énergie (zone périnucléaire par exemple) au moyen de protéines associées au cytosquelette. Dans certains types cellulaires, elles restent localisées à un site de consommation de l'ATP : enroulées en hélice autour de la pièce intermédiaire du spermatozoïde, ou entre des myofibrilles adjacentes dans les cellules du muscle cardiaque.

### **b) Structure**

La mitochondrie est limitée par une double membrane, membrane externe et membrane interne, permettant de définir deux compartiments, l'espace matriciel, et l'espace inter-membranaire (Figure 8).



**Figure 8** : a) Organisation schématique d'une mitochondrie, b) Coupe électronique

- La membrane externe : C'est une bicouche lipidique, dont la composition est proche de celle de la membrane plasmique. Elle est perméable aux petites molécules grâce à la présence d'une protéine transmembranaire VDAC (Voltage-Dependant Anion Channel) et aux plus grosses molécules grâce aux translocases TOM (Translocase of Outer Membrane).

- L'espace inter-membranaire : C'est un espace d'une épaisseur de 4 à 7 nm, qui contient une forte concentration en protons mis en jeu dans les phénomènes de phosphorylation et conférant à cet espace une charge positive. On y trouve également des molécules de cytochrome c intervenant dans l'apoptose et des petites molécules inférieures à 10 kDa.

- La membrane interne : Cette membrane, composée d'environ 80 % de protéines et 20 % de lipides, présente donc une organisation très différente de celle des autres membranes biologiques. En raison de sa richesse en cardiolipines, elle est très peu perméable en ions et le passage de molécules à travers cette membrane nécessite la présence de transporteurs, comme l'ANT (Adenine Nucleotide Translocase) qui échange l'ATP mitochondrial en échange de l'ADP cytosolique. Les protéines sont quant à elles importées via des translocases nommées TIM (Translocase of Inner Membrane). Par ailleurs, la membrane interne présente de nombreuses crêtes mitochondriales, correspondant à des replis projetés dans la matrice. Dans ces crêtes sont enchâssés les complexes de la chaîne respiratoire et l'ATP synthase. Les crêtes peuvent varier en nombre selon l'activité mitochondriale, et se présenter sous différents aspects (lamellaires, tubulaires, sacculaires...)

- La matrice : Ce compartiment interne est le siège de nombreuses voies métaboliques, comme le cycle de Krebs, la  $\beta$ -oxydation des acides gras, l'oxydation du pyruvate et contient donc toutes les enzymes nécessaires à ces trois voies. Elle renferme également l'ADN mitochondrial, des mitoribosomes, des ARN messagers et des ARNs de transfert.

## **2. Fonctions des mitochondries**

### **a) Métabolisme énergétique**

Le catabolisme des molécules énergétiques représentés par la glycolyse, la transformation du pyruvate par la pyruvate déshydrogénase (PDH), la  $\beta$ -oxydation des acides gras, et le cycle de Krebs, permet de fournir à la chaîne respiratoire des équivalents réduits sous forme de  $\text{NADH}+\text{H}^+$  (Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit) et de  $\text{FADH}_2$  (Flavine Adénine Dinucléotide réduit). En fonction de leur potentiel d'oxydoréduction, les complexes de la chaîne respiratoire assurent le transport successif des électrons issus du  $\text{NADH}+\text{H}^+$  et  $\text{FADH}_2$  vers un accepteur final, l'oxygène moléculaire (Figure 9). Le flux d'électrons est pris en charge par le complexe I (NADH / ubiquinone oxydoréductase) ou par le complexe II (succinate déshydrogénase), puis successivement par la navette hydrosoluble ubiquinone, le

complexe III (ubiquinol /cytochrome c réductase), le cytochrome c de l'espace intermembranaire, le complexe IV (cytochrome c oxydase), et enfin l'oxygène moléculaire. Au niveau des complexes I, III et IV, le transfert des électrons s'accompagne d'un pompage de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, créant ainsi un gradient de pH ( $\Delta\text{pH}$ ) et de potentiel de membrane mitochondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ ). Le complexe V ou  $\text{F}_0/\text{F}_1$ -ATP synthase permet de convertir cette force protomotrice en ATP, selon la théorie chimio-osmotique. Ainsi, la partie  $\text{F}_0$ , située dans la membrane interne, transfère les protons de l'espace intermembranaire vers la matrice, tandis que la partie  $\text{F}_1$  située dans la matrice au contact de la membranaire interne utilise le gradient de protons pour convertir l'ADP en ATP.

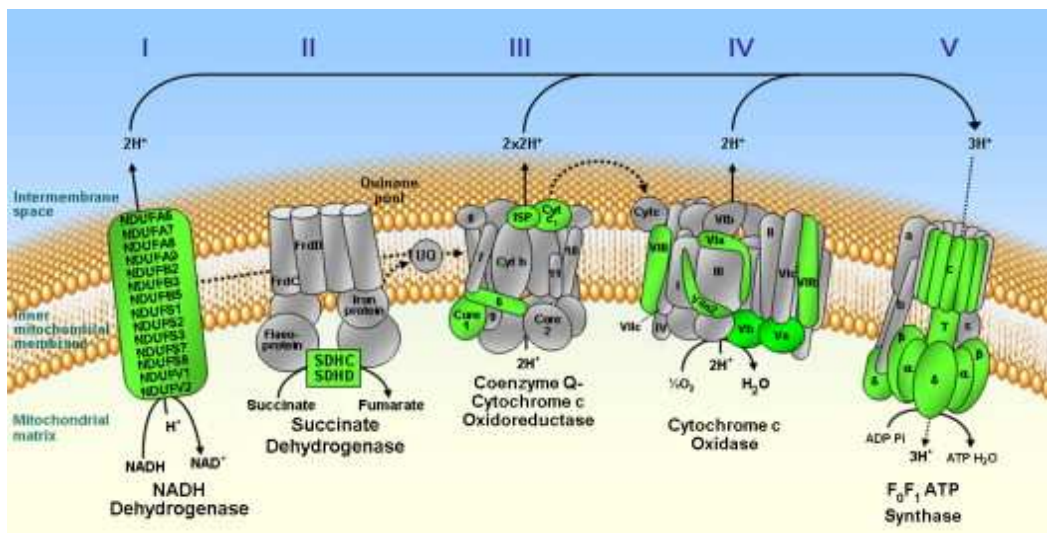


Figure 9 : La chaîne respiratoire mitochondriale

### b) Autres rôles

- Les mitochondries sont impliquées dans la biosynthèse des hormones stéroïdes, via les cytochromes P450<sub>sc</sub> et P450<sub>aldo</sub> présents dans la matrice mitochondriale. En fonction de la glande endocrine dans laquelle elle s'effectue, cette biosynthèse pourra aboutir à la formation de testostérone dans le testicule, de progestérone et d'estradiol dans l'ovaire, ou de gluco- et de minéralo-corticoïdes dans la glande surrénale.
- La mitochondrie participe, conjointement avec le réticulum endoplasmique, à la régulation de la concentration intracellulaire de calcium. Le transport de calcium s'effectue à travers des canaux ioniques (échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ).

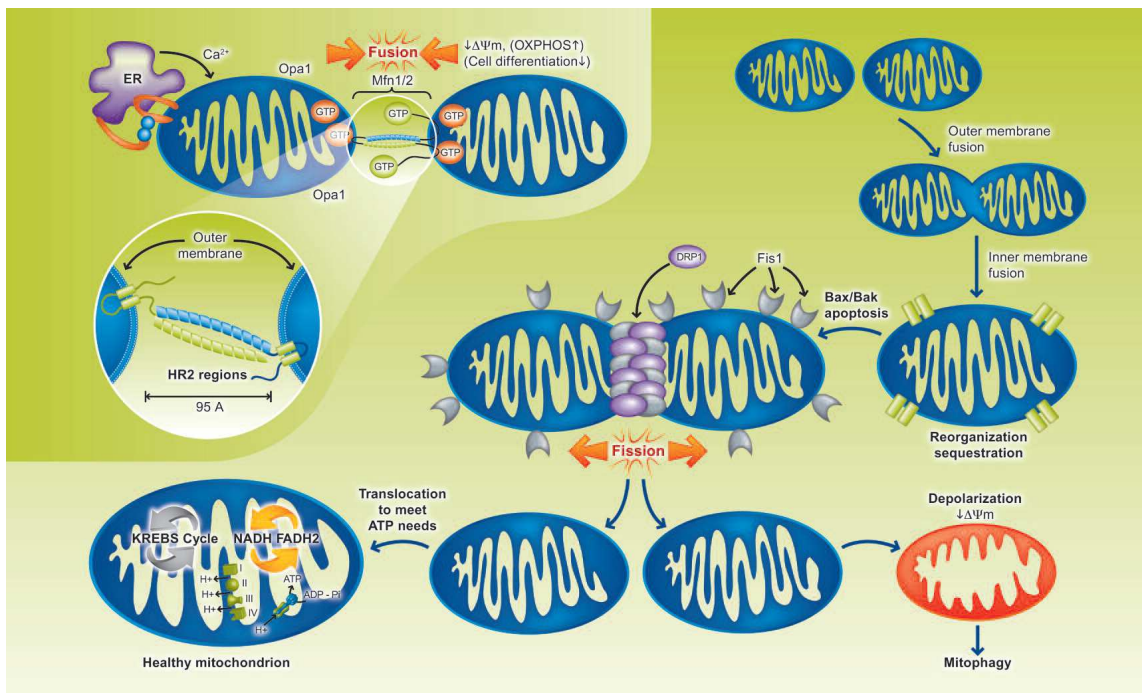
- Les mitochondries jouent un rôle dans l'homéostasie du fer et l'assemblage des protéines fer-soufre. Les centres Fer-Soufre sont des cofacteurs d'enzymes composés de  $Fe^{2+}/^{3+}$  et  $S^{2-}$ . Ils sont impliqués dans le transfert d'électrons, notamment au sein des complexes de la chaîne respiratoire, dans la liaison de substrats et leur activation, et la régulation de l'expression de gènes [58]. L'assemblage des centres FeS requiert l'assistance de la machinerie mitochondriale ISC, et notamment de la protéine « échafaudage » ISCU (Iron-Sulfur Cluster scaffold protein U), qui permet l'assemblage transitoire d'un centre fer-soufre avant son transfert à des protéines cibles acceptrices. ISCU est essentielle pour l'activité des protéines fer-soufre mitochondriales, telles que la succinate déshydrogénase et l'aconitase. La suppression de ISCU par siRNA inactive non seulement les aconitases, mais aussi perturbe l'homéostasie du fer, notamment via l'activité des protéines régulatrices IRP (Iron Regulatory Protein) [59]. Chez l'homme, certaines mutations du gène ISCU entraînent un déficit en succinate déshydrogénase et en aconitase au niveau du muscle squelettique, à l'origine d'une myopathie avec une sévère intolérance à l'exercice.

- Enfin, les mitochondries interviennent également dans l'apoptose, le vieillissement cellulaire (rôle qui sera développé plus tard), la thermogénèse la synthèse de l'hème et des nucléotides.

### **3. Dynamique mitochondriale**

#### **a) Fusion et fission**

Les mitochondries s'organisent dans la cellule selon un réseau dynamique de mitochondries interconnectées [60, 61], subissant des phénomènes continus de fusion et de fission. La fusion est sous la dépendance de 3 GTPases : les mitofusines MFN1 et MFN2 médient la fusion au niveau de la membrane externe, tandis que OPA1 (Optic Atrophy 1) est essentielle pour la fusion des membranes internes. La fission requiert quant à elle le recrutement de FIS1 (Mitochondrial Fission 1 protein) et de la GTPase DRP1 (Dynamin-Related Protein 1) (Figure 10) [62].



**Figure 10** : Remodelage mitochondrial, par les phénomènes de fusion et de fission [63]

OPA1 est une dynamine GTPase localisée dans l'espace inter-membranaire mitochondrial, ancrée à la membrane interne. Elle joue un rôle dans la bioénergétique mitochondriale. Ainsi, l'inhibition de l'expression de OPA1 par siRNA entraîne une diminution de la respiration endogène [64]. Par ailleurs, cette protéine serait aussi impliquée dans la maintenance de l'ADNmt. Elachouri et al. ont montré que la diminution de certaines isoformes de la protéine OPA1 est corrélée à une diminution de 25 % de la quantité d'ADNmt [65]. Enfin, OPA1 exercerait un rôle anti-apoptotique en séquestrant le cytochrome c au niveau des crêtes mitochondriales afin que celui-ci joue son rôle de transporteur d'électrons au complexe IV. Des mutations dans le gène OPA1 sont responsables de l'Atrophie Optique Dominante (AOD).

Les mitofusines MFN1 et 2 sont des dynamines GTPases également impliquées dans la fusion mitochondriale. MFN2 est exprimée dans le cœur, les muscles squelettiques, et dans de nombreux autres tissus à de plus faibles niveaux. Des mutations de MFN2 perturbent plusieurs processus cellulaires incluant le métabolisme oxydatif, la progression du cycle cellulaire, la mort cellulaire, et sont à l'origine de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2A (CMT2A). Les cellules dépourvues de MFN1 et MFN2 présentent une fusion mitochondriale complètement altérée, ainsi qu'une faible croissance cellulaire, une hétérogénéité dans leur potentiel de membrane mitochondriale, et une respiration cellulaire diminuée [64].

## b) Mitophagie

Les mitochondries sont détruites par autophagie, processus sélectif de dégradation des mitochondries endommagées par dégradation lysosomale, selon une demi-vie de 6 à 10 jours. Leur renouvellement est assuré par la scissiparité de mitochondries préexistantes en mitochondries-filles plus petites, qui augmenteront ensuite de volume. Le mécanisme de division est rapide (environ une minute), et indépendant du cycle cellulaire.

## c) Voies d'import mitochondrial

Un système de transport efficace est nécessaire pour importer les protéines du cytoplasme vers la mitochondrie. En effet, la majorité des protéines mitochondriales est synthétisée sur les ribosomes cytoplasmiques, sous forme de précurseurs contenant des signaux peptidiques d'absorption. Au niveau de la membrane externe, les protéines structurées en feuillet  $\beta$  sont transportées à travers le complexe TOM, puis sont prises en charge par une machinerie spécifique, le complexe SAM (Sorting and Assembling Machinery) (Figure 11) [66]. Cet ensemble protéique permet le tri et l'assemblage des protéines de la membrane externe. Il assure aussi le transport des protéines insolubles vers l'espace intermembranaire, où elles seront prises en charge par des protéines chaperonnes ; pour prendre place dans la membrane interne ou franchir le portail TIM22 les conduisant au sein de la matrice.

Le complexe SAM est constitué principalement de trois protéines : SAM50, SAM35 et SAM37. Plus particulièrement, SAM50 s'organise en un large complexe protéique MIB (Mitochondrial Intermembranespace Bridging), conjointement avec d'autres protéines de la membrane interne (mitofilines et CHCHD3). Les expériences de knockdown ont montré qu'au sein de ce complexe, SAM50 joue un rôle crucial dans l'assemblage des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire codées par la mitochondrie, mais aussi dans l'intégrité structurale des crêtes, le maintien de la forme des mitochondries et la régulation du réseau mitochondrial [67].

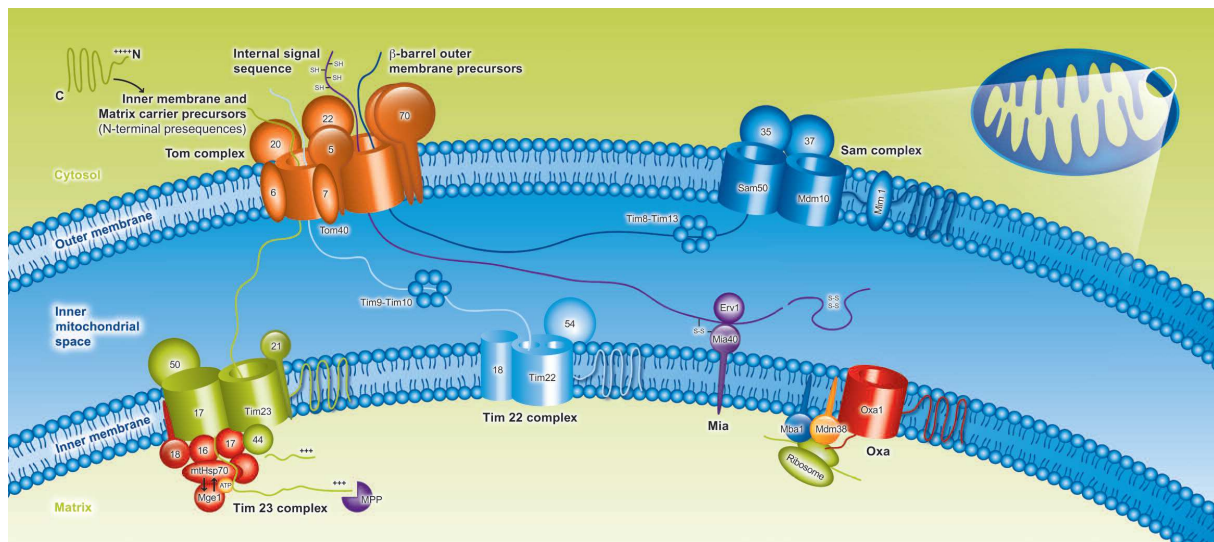


Figure 11 : Transport des protéines dans la mitochondrie [63]

## 4. Génome mitochondrial

### a) Organisation

L'hypothèse d'endosymbiose d'une cellule eucaryote par une protobactérie nous éclaire sur une des caractéristiques fondamentales de cet organe : il possède son propre génome. Mais au cours de l'évolution, cet ADN mitochondrial aurait perdu la plupart de ses gènes, par insertion dans l'ADN nucléaire. Ainsi, la mitochondrie, organe semi-autonome, a besoin de protéines codées par le génome nucléaire pour fonctionner.

L'ADN mitochondrial (ADNmt) est une petite molécule circulaire de 16 569 paires de bases, double brin, et dépourvue d'histones (Figure 12). Il représente environ 1 % de l'ADN cellulaire total et toute l'information génétique portée par l'ADN mitochondrial est dévolue à la chaîne respiratoire. Il comprend 37 gènes, parmi lesquels les 13 gènes de structure codant pour les sous-unités de la chaîne respiratoire, 2 ARNs ribosomiaux et 22 ARNs de transfert indispensables pour la traduction des 13 gènes de structure au sein des mitochondries.



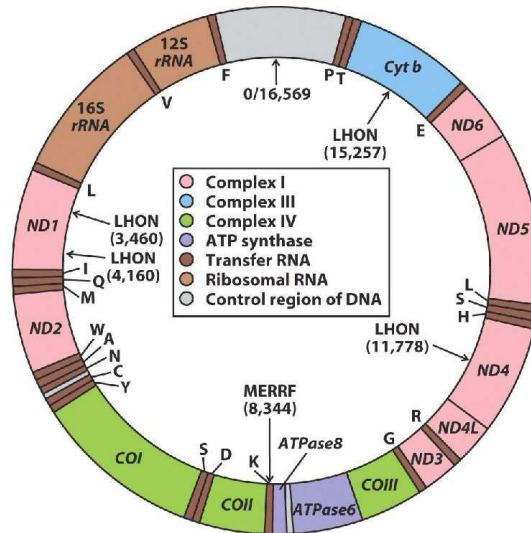


Figure 12 : Le génome mitochondrial humain [68]

Cet ADNmt double brin, possède un brin lourd (Heavy ; H) et un brin léger (Light ; L). La plupart de l'information est contenue par le brin lourd (Tableau 1).

Transcrits chaîne lourde (H)	Transcrits chaîne légère (L)
14 ARNts	8 ARNts
12 ARNm	1 ARNm
- ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L et ND5 (Complexe I), - Cytochrome b (Complexe III) - COI, COII, COIII (Complexe IV) - ATPase 6 et ATPase 8 (Complexe V)	- ND6 (complexe I)  Amorces ARN pour la réplication de la chaîne lourde
2 ARNrs	
- ARNr 12S et ARNr16S	

Tableau 1 : Différents transcrits de l'ADN mitochondrial

Cependant, la grande majorité de l'information est codée par l'ADN nucléaire. L'ADN nucléaire code ainsi pour les autres gènes des sous unités protéiques des complexes de la chaîne respiratoire (notamment la totalité des sous-unités du complexe II), et pour les gènes impliqués dans la maintenance de l'ADN mitochondrial, la synthèse, la régulation, l'adressage, et l'assemblage des sous-unités entre elles (Tableau 2).

Complexes	Nom	Sous-unités codées par le génome nucléaire	Sous-unités codées par le génome mitochondrial
I	NADH:ubiquinone oxydoréductase	36	7
II	Succinate déshydrogénase	4	0
III	Ubiquinol-cytochrome c réductase	10	1
IV	Cytochrome c oxydase	10	3
V	ATP synthase	12	2

**Tableau 2 : Double origine génétique des sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale**

L'ADN mitochondrial n'est pas réparti de façon homogène dans la mitochondrie, mais se concentre au niveau de structures nucléo-protéiques nommées nucléoïdes. Ces structures apparaissent avant la phase S de la méiose, possèdent des points d'ancrage au niveau de la membrane interne mitochondriale et sont impliquées dans la maintenance de l'ADN mitochondrial.

Le génome mitochondrial possède plusieurs particularités. Son code génétique est légèrement différent de celui de l'ADN nucléaire. Quatre codons sont concernés, comme les codons arginine AGA et AGG qui deviennent des codons stop. Une autre caractéristique est l'absence d'introns. Les gènes se trouvent contigus et parfois même chevauchants. Le seul segment non codant est une région régulatrice de 1121 pb en triple brin, nommée D-loop (Displacement Loop). Dans cette région sont localisés les sites d'initiation et les promoteurs de la transcription des deux brins ainsi que l'origine de réplication du brin H.

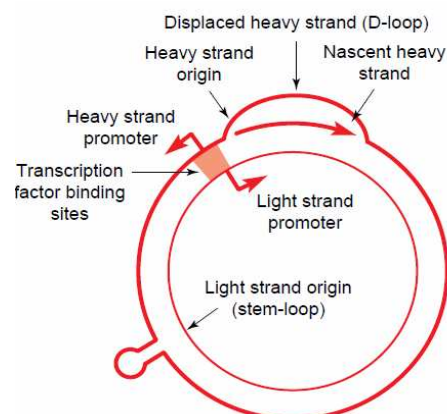
#### **b) Réplication**

Les mitochondries sont désynchronisées du cycle cellulaire. La réplication, indispensable au maintien du génome mitochondrial, n'est pas concomitante à la réplication de l'ADN nucléaire (phase S), mais se produit pendant tout le cycle cellulaire. De plus, les mitochondries et leurs génomes sont distribués de façon aléatoire aux cellules filles, selon le mécanisme de ségrégation réplivative.

La réplication des brins H et L de l'ADN mitochondrial s'effectue de façon asynchrone et asymétrique [69] à partir de deux origines de réplication distinctes  $O_H$  et  $O_L$  (Figure 13). Elle fait intervenir des facteurs codés par le génome nucléaire, et ensuite importés dans la

mitochondrie, comme l'ADN  $\gamma$ -polymérase (POLG) spécifique de la mitochondrie, et le facteur de transcription TFAM (Transcription Factor A Mitochondrial). POLG, enzyme hétérodimérique, se compose d'une sous-unité catalytique  $\alpha$  ainsi que d'une sous-unité  $\beta$  se liant à l'ADN et permettant ainsi d'augmenter l'affinité de l'enzyme pour l'ADN et sa processivité. La sous-unité  $\alpha$  possède de plus une activité 3'-5' exonucléase. TFAM est impliqué quant à lui dans la modulation du contenu en ADNmt, via son association à l'ADNmt au sein des nucléoïdes et par sa fonction de régulation de la transcription et de la réplication [70].

La réplication commence tout d'abord par la synthèse du brin lourd [71]. A cet effet, une amorce ARN est produite par transcription du brin léger, sous le contrôle du facteur de transcription mitochondrial TFAM. L'amorce synthétisée forme un hybride ARN/ADN stable, appelé R-Loop, au niveau des régions CSBI à III (Conserved Sequence Box) de la région D-Loop. L'amorce ARN est clivée en aval de CSBI par la RNase MRP (Mitochondrial RNA Processing). L'ADN  $\gamma$ -polymérase allonge alors le brin lourd à partir de cette amorce. L'élongation du brin H néosynthétisé crée une boucle de déplacement au niveau de laquelle le brin lourd se trouve sous forme simple brin. Lorsque cette boucle parvient au niveau de l'origine de réplication  $O_L$ , celle-ci adopte une conformation en épingle à cheveux reconnue par une ADN primase chargée de synthétiser une amorce ARN. L'élongation de la majorité des brins H néosynthétisés s'arrête rapidement au niveau de séquences TAS (Termination Associated Sequence), pour former une structure ADN triple brins à l'origine de la D-Loop. Cet arrêt d'élongation permettrait de réguler le nombre de copies d'ADN mitochondrial.



**Figure 13 :** Sites nécessaires à la réplication et à la transcription de l'ADNmt [72]

### c) Transcription

#### Initiation

L'initiation de la transcription s'effectue au niveau de promoteurs spécifiques des brins lourd et léger (respectivement HSP et LSP), situés dans la D-loop et orientés en sens inverse. Pour la transcription du brin lourd, il existe un deuxième promoteur H2, situé dans le gène de l'ARNt<sub>phe</sub>. La transcription de l'ADN mitochondrial s'effectue par une ARN polymérase mitochondriale (ARNPOLmt) peu sélective, tandis que des cofacteurs comme TFAM confèrent une spécificité de fixation de l'enzyme à ses promoteurs. En se fixant sur des séquences situées en amont des promoteurs HSP et LSP, TFAM entraîne une modification de conformation de l'ADN mitochondrial, ouvrant ainsi l'accès de la polymérase aux sites d'initiation de la transcription. Un autre facteur de transcription mtTFB, a été décrit comme capable de lier l'ADN mitochondrial de manière non spécifique et d'activer la transcription du brin léger en présence de TFAM.

#### Elongation

Le brin léger est transcrit sous forme d'un ARN polycistronique unique, tandis que la transcription du brin lourd génère 2 types de transcrits différents selon le site d'initiation utilisé : Le site d'initiation H1, le plus actif, produit de courts transcrits qui se terminent en aval du gène de l'ARNr 16S au niveau du gène de l'ARNt<sub>Leu</sub>. Cet arrêt de la transcription est provoqué par un facteur de terminaison appelé mTERM qui se fixerait à cet endroit. En revanche, H2 génère, à une moindre fréquence, des transcrits correspondant à l'ensemble de la séquence codante du brin lourd.

#### Modifications post-transcriptionnelles

Deux endonucléases clivent d'abord respectivement les ARNt à leurs extrémités 5' et 3'. Puis, la maturation des ARNt est complétée par ajout d'une séquence CCA en 3', tandis que les ARNm et les ARNr sont maturés par une queue poly A en 3'.

### d) Régulation transcriptionnelle de la biogenèse mitochondriale

Divers facteurs font le lien entre la demande métabolique de la cellule et la biogenèse mitochondriale [73] :

Le facteur de transcription NRF-1 (Nuclear Respiratory factor 1) est un élément clé dans le contrôle exercé par le noyau sur la mitochondrie pour activer et coordonner les différents systèmes dont dépend la phosphorylation oxydative. Le spectre d'action de cet

activateur transcriptionnel s'étend à des gènes codant pour des sous-unités de la chaîne respiratoire, mais aussi pour des protéines mitochondriales indirectement associées à la phosphorylation oxydative, impliquées dans la réplication et transcription de l'ADN mitochondrial, assemblage du complexe IV de la chaîne respiratoire [74]. Il régule aussi l'expression d'enzymes cytosoliques participant à la biosynthèse de l'hème, principal constituant des cytochromes. Huo et al. ont montré que les embryons de souris invalidés pour le gène NRF1 meurent entre le 3<sup>e</sup> jour et le 6<sup>e</sup> jour de vie, avec une déplétion de l'ADNmt [75].

PGC-1 $\alpha$  (PPAR Gamma Coactivator-1 $\alpha$ ) est un coactivateur transcriptionnel de récepteurs nucléaires tel le récepteur PPAR $\gamma$  (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor), dont l'expression est induite par des signaux extracellulaires liés à la thermogénèse, la gluconéogenèse ou la prolifération cellulaire. Il augmente l'expression de gènes nucléaires impliqués dans la biogenèse et les fonctions mitochondriales. Ainsi, PGC-1 $\alpha$ , par son interaction avec NRF-1, accroît la capacité de ce dernier à activer la transcription de ses gènes cibles [76]. Il augmente également l'expression de NRF-1 et NRF-2, des enzymes de la chaîne respiratoire, des protéines de découplage UCPs, d'enzymes de la gluconéogenèse, et de la  $\beta$ -oxydation des acides gras par l'intermédiaire du facteur PPAR $\alpha$  [77]. Par ailleurs, PGC-1 $\alpha$  serait impliqué dans le système de défense des ROS [78]. En effet, les souris invalidées pour le gène PGC-1 $\alpha$  présentent un système de protection réduit contre les radicaux libres, alors qu'un ARN interférent dirigé contre PGC-1 $\alpha$  abolit l'augmentation de l'expression des gènes des superoxydes dimutases, de la catalase et de la glutathion peroxydase, normalement induits par à un traitement par le peroxyde d'hydrogène [78].

PGC-1 $\beta$  possède une forte homologie avec PGC-1 $\alpha$  sur l'ensemble de sa séquence. PGC-1 $\beta$  se lie à NRF-1 et entraîne une augmentation de la transcription des gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale [77]. Tout comme PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$  semble impliqué dans la détoxification des ROS, en stimulant l'expression de la superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase.

Les sirtuines (Silent Information Regulator) sont des désacétylases NAD<sup>+</sup>-dépendantes. Membres de la classe III des HDACs (Histone désacétylases), elles utilisent le NAD<sup>+</sup> comme substrat et catalysent l'élimination d'un groupement acétyle à partir des résidus de lysine de protéine cibles. Les sirtuines constituent des médiateurs clés entre le

métabolisme énergétique et la signalisation cellulaire, par détection des taux de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . Il existe 7 types de sirtuines (SIRT1-7) chez l'homme. SIRT1 joue un rôle dans un certain nombre de fonctions biologiques et de maladies humaines liées à l'âge, comme la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'inflammation, la résistance au stress, la production d'insuline, l'homéostasie du glucose et des lipides. Cet effet s'effectue via la désacétylation directe ou la régulation de cibles incluant p53, Bax, PPAR $\gamma$ , PGC1 $\alpha$ , UCP2 et NF $\kappa$ B. Exprimée dans la mitochondrie, SIRT3 est aussi impliquée dans la régulation des protéines mitochondriales telle que l'acétyl-CoA synthase 2 (AceCS2). Sa fonction serait déterminante dans le potentiel de développement de l'embryon préimplantatoire. Ainsi, l'inactivation de SIRT3 par siRNA dans les ovocytes de souris augmente la production de ROS, conduisant à une activation de p53 et à une altération du développement pré-implantatoire in vitro [79].

#### e) Pathologies mitochondriales et transmission

Les pathologies mitochondriales sont des maladies métaboliques héréditaires dues à un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Elles comptent parmi les maladies métaboliques les plus fréquentes, avec une incidence de 1/5 000 naissances. Leurs présentations cliniques sont très diverses, systémiques ou bien restreintes à un seul organe. Tous les tissus peuvent être atteints mais ceux ayant les besoins énergétiques les plus importants le sont en priorité : muscle squelettique, système nerveux central, rétine, coeur et rein... A partir d'associations de symptômes, plusieurs grands phénotypes ont été définis et validés par la découverte de leur cause génétique. Parmi ceux-ci, on peut citer le syndrome MELAS (Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Strokelike episodes), ou le syndrome MERRF (Myoclonic Epilepsy with Ragged-Red-Fibers).

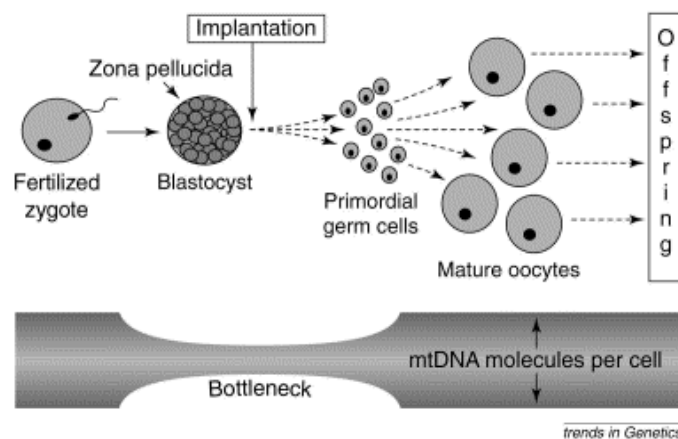
La transmission des maladies mitochondriales dépend du gène impliqué et peut donc revêtir tous les modes selon qu'il s'agit d'un gène nucléaire (autosomique récessif, autosomique dominant, lié à l'X) ou mitochondrial (sporadique, maternel). Depuis leur première description en 1988, plus d'une centaine de mutations pathogènes de l'ADN mitochondrial sont répertoriées et de nouvelles mutations sont régulièrement identifiées. Les modifications du génome comprennent des remaniements (dont la délétion commune de 4.9 kb), des mutations ponctuelles ou des déplétions de l'ADNmt. Le mode de transmission des maladies mitochondriales est par ailleurs modulé par deux phénomènes [80]. Le premier est le très faible taux de transmission des remaniements de grande taille de

l'ADNmt. La grande majorité des patients porteurs de ce type d'altération sont en fait sporadiques. Le deuxième phénomène est celui de l'hétéroplasmie. La proportion des molécules mutées est directement responsable de la sévérité du déficit et donc de la gravité des symptômes. Elle varie souvent de façon considérable d'une cellule à l'autre et donc d'un organe à l'autre. Cette hétérogénéité de la répartition tissulaire de l'hétéroplasmie est source de difficultés dans le diagnostic, le pronostic et le conseil génétique.

## **II. Devenir des mitochondries pendant l'ovogenèse et l'embryogenèse**

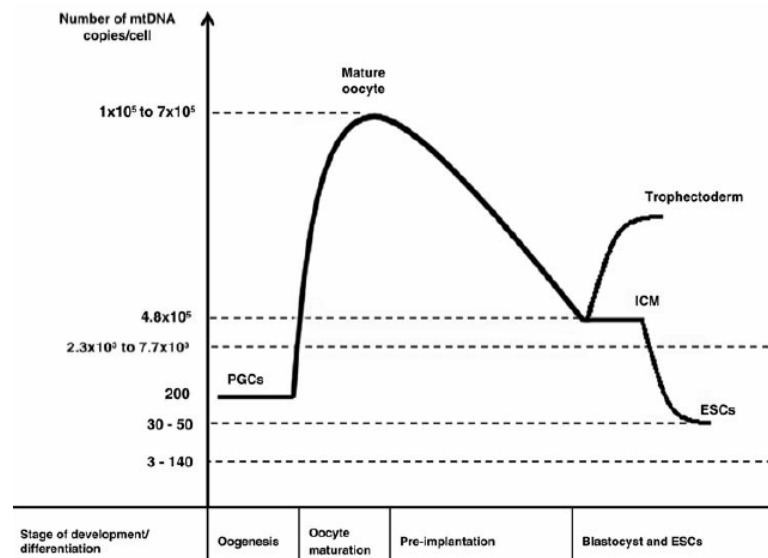
### **a) Mitochondrie et ovogenèse**

Au cours de l'ovogenèse, parallèlement à la croissance cytoplasmique, se produit une variation majeure du pool mitochondrial. La théorie du goulot d'étranglement génétique "bottleneck" (Figure 14) [81] décrit une restriction initiale du pool mitochondrial suivie d'une intense amplification par expansion clonale d'un très petit nombre d'ADNmt sélectionnés. Ce goulot génétique permet à l'ovocyte de transmettre au nouvel individu une population homoplasmique d'ADNmt. Si certains auteurs situent la bottleneck pendant l'embryogenèse précoce [82], d'autres suggèrent qu'elle se produirait pendant la folliculogénèse en période post-natale [83].



**Figure 14:** Goulot d'étranglement génétique mitochondrial

Les cellules germinales primordiales (CGP) ne contiennent qu'une dizaine de copies d'ADNmt, alors qu'au niveau des crêtes génitales, elles en contiendraient un nombre proche de 100, avoisinant 200 après différenciation en ovogonies. Le nombre de mitochondries augmente ensuite façon exponentielle : aux alentours de 6 000 pour un ovocyte au stade de prophase I d'un follicule primordial [82], contre quelques centaines de milliers pour un ovocyte mature [84] (Figure 15).



**Figure 15** : Evolution du taux d'ADN mitochondrial pendant l'ovogenèse et l'embryogenèse précoce

Conjointement à cette augmentation du contingent mitochondrial, des modifications ultra-structurales se produisent, probablement en lien avec le taux de production d'ATP [85]. En outre, les mitochondries se réorganisent dans différentes zones cellulaires en fonction des demandes énergétiques. Pendant la maturation ovocytaire, les mitochondries sont retrouvées en clusters à proximité du reticulum endoplasmique, tandis qu'au stade de vésicule germinative, elles sont groupées autour du noyau, puis migrent à la périphérie de l'ovocyte après la GVBD. Dans les ovocytes en métaphase II, les mitochondries sont surtout présentes au niveau du fuseau méiotique (s'accumulant autour des pronucléi après la fécondation, et se maintenant près du noyau jusqu'au stade de morula).

Au cours de la maturation ovocytaire, le potentiel de membrane mito ( $\Delta\Psi_m$ ) augmente significativement [86], reflet d'une augmentation du métabolisme oxydatif. Les ovocytes avec des niveaux élevés d'ATP présentent des taux de fécondation et des taux de blastulation significativement plus élevés [87]. Plus précisément, un minimum de 2 pmol d'ATP par ovocyte serait nécessaire pour soutenir la fécondation, le développement de l'embryon et l'implantation [88].



## b) Transmission maternelle à l'embryon

La transmission maternelle de l'ADN mitochondrial le dogme quasi général. Ainsi, après la fécondation, seules les mitochondries apportées par l'ovocyte sont conservées et serviront de réserve pour l'embryon au stade clivé. La transmission uniparentale de l'ADNmt implique l'élimination spécifique des mitochondries paternelles dans l'ovocyte, selon un mécanisme d'ubiquitylation d'une protéine membranaire mitochondriale, la prohibitine, dont les domaines sont masqués pendant le transit épидidymaire [89]. Cette sélection permettrait de minimiser la transmission de mutations survenant dans le sperme exposé aux ROS pendant la spermatogenèse [90].

Comme on le verra, l'ADN mitochondrial mute très vite, mais la plupart des variations de séquence sont des polymorphismes neutres. Ceux-ci s'accumulent séquentiellement dans les lignées maternelles du fait de la transmission uniparentale de l'ADNmt. Ils peuvent alors se fixer dans les générations suivantes, et définir des groupes de populations appelés haplogroupes [91]. Ces variants mitochondriaux permettent de retracer l'évolution des populations et leurs migrations. En Europe, 10 haplogroupes englobent 99 % des ADN mitochondriaux.

## c) Embryogenèse précoce

Après la fécondation et jusqu'au stade blastocyte, le contenu global en ADNmt du conceptus ne change pas, puisque il n'y aurait pas de réplication ou au moins un équilibre jusqu'à l'implantation [92, 93]. La répartition du contingent mitochondrial entre les différentes cellules implique qu'au stade blastocyste, le contenu en ADNmt se situe autour de 1 000 copies par cellule, avec un contenu mitochondrial plus dense dans le trophoctoderme que dans le bouton embryonnaire. Cette chute du contenu en ADNmt diminue progressivement la capacité à générer de l'ATP via le mécanisme d'OXPPOS. Au stade huit cellules, l'existence d'un switch entre la phosphorylation oxydative et la glycolyse aurait comme effet de diminuer l'influence des mutations de l'ADNmt aux stades précoces de développement de l'embryon.

La régulation du contenu en ADNmt après les premiers stades embryonnaires se ferait par l'intermédiaire de TFAM, puisque les expériences de transgenèse chez la souris montrent que les embryons invalidés pour TFAM présentent une diminution importante de

l'ADNmt, avec une abolition de la phosphorylation oxydative. Les embryons mutants meurent alors avant le dixième jour de leur évolution [94].

### **III. Mitochondries et vieillissement ovarien**

#### **a) Rôle dans l'apoptose**

Les mitochondries sont impliquées dans l'apoptose, élément central des phénomènes d'atrésie folliculaire, et donc de vieillissement ovarien. Deux grands mécanismes d'action sont à distinguer : le premier est déclenché par la liaison des molécules de mort à leurs récepteurs de surface, tandis que l'autre est généré par des signaux intra-cellulaires et médié par la mitochondrie (Figure 16) [95].

#### *Apoptose médiée par les récepteurs de mort cellulaire (voie extrinsèque)*

Ces événements sont initiés par la fixation des ligands à leurs récepteurs de mort de la surface cellulaire, tels Fas, TNF-R1, IFN et TRAIL-R (TNF-related apoptosis-inducing Ligand Receptors), ce qui induit la transmission du signal apoptotique et l'activation des procaspases en caspases (caspases 8).

#### *Apoptose médiée par la mitochondrie (voie intrinsèque)*

L'intégrité de la membrane mitochondriale externe est strictement régulée par des interactions entre différents membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Ainsi, selon ce mécanisme, l'activation de Bax et Bak entraîne la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP), permettant la fuite de cytochrome c, de l'espace inter-membranaire vers le cytosol. Cette perméabilisation induit une entrée anormale d'eau et d'électrolytes dans la matrice mitochondriale (ballonisation de la mitochondrie), ainsi que la dissipation du gradient de protons, et donc la chute du potentiel de membrane  $\Delta\Psi$ , le découplage de la phosphorylation oxydative et l'arrêt de la synthèse d'ATP.

#### *Cascade des caspases et assemblage de l'apoptosome*

La libération de cytochrome c dans le cytosol induit la formation d'un complexe nommé apoptosome, formé de cytochrome c, d'APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1), de procaspase 9 et d'ATP. Ce complexe induit le recrutement et l'activation en cascade des caspases, permettant le clivage des protéines et enzymes essentielles à la

viabilité de la cellule, tandis que la translocation nucléaire des facteurs pro-apoptotiques AIF (Apoptosis Initiating Factor) et CAD (Caspase Activated Dnase) permet de dégrader la chromatine.

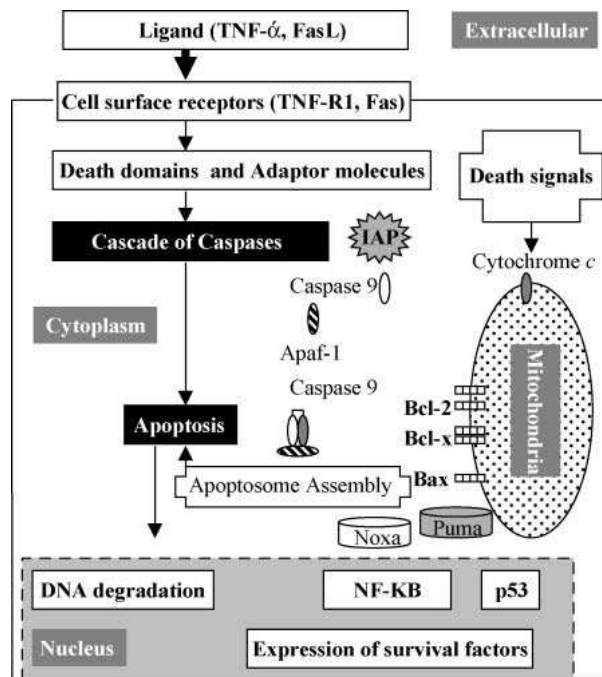


Figure 16 : Deux grandes voies de l'apoptose [95]

### Régulation de l'apoptose

Un équilibre subtil existe entre molécules pro- et anti-apoptotiques pour la bonne régulation de la survie ou de la perte folliculaire. De nombreuses voies de signalisation sont impliquées dans l'atrésie folliculaire, incluant comme on l'a vu le système Bax/Bcl-2, les caspases, le TNF $\alpha$ , Fas, mais aussi le TGF  $\beta$ , p53, la prohibitine, c-myc, et les endothélines.

Le rôle du système Bcl-2/Bax dans la survie/atrésie folliculaire est soutenu par divers résultats expérimentaux : les souris invalidées pour Bcl-2 entraîne une diminution du nombre de follicules primordiaux [96], alors que la surexpression de Bcl-2 induit une réduction de l'apoptose des larges follicules antraux et une augmentation de la folliculogenèse [97]. De plus, les souris déficientes en Bax présentent des follicules anormaux avec un excès de cellules de la granulosa [98], alors que l'expression de Bax est élevée dans les cellules de la granulosa de follicules atrétiques [99].

### b) Mitochondries et théorie du vieillissement

#### *Anomalies mitochondriales*

Des anomalies mitochondriales apparaissent au fur et à mesure du vieillissement, dans différents types cellulaires, et notamment au niveau ovocytaire.

Sur le plan général, le nombre de mitochondries décroît avec l'âge dans les cellules hépatiques murines et humaines, tout comme le nombre de copies d'ADNmt et les taux protéiques mitochondriaux. En outre, la capacité de la chaîne respiratoire est diminuée jusqu'à 40 % dans les mitochondries d'hépatocytes de rats âgés [100]. Chez l'homme, une diminution similaire de la fonction de la chaîne respiratoire a été rapportée dans le foie, le cœur et les muscles squelettiques [101].

Au niveau ovocytaire, Hamatani et al. ont mis en évidence des différences d'expression génique liées à l'âge, pour différents gènes impliqués dans la fonction mitochondriale (mt-Nd3 et mt-ATP6), le stress oxydatif (SOD1 et TXN1) (mais aussi dans d'autres fonctions comme l'organisation du cytosquelette, la structure de la chromatine, la méthylation de l'ADN, la stabilité du génome, et le cycle cellulaire) [17]. Ces modifications de la fonction mitochondriale coïncident avec une diminution du taux d'ATP et du potentiel de membrane retrouvée dans les ovocytes âgés [102]. Par ailleurs, des modifications morphologiques seraient également associées : un gonflement anormal des mitochondries, et une perturbation de la morphologie des crêtes sont retrouvés dans les ovocytes de femmes d'un âge reproductif avancé [103].

#### *Stress oxydatif et mutations de l'ADNmt*

La mitochondrie est le lieu de production principal des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les radicaux libres provoquent des dommages oxydatifs au niveau des différentes structures cellulaires (ADN, lipides et protéines).

Le taux de mutation de l'ADNmt est 10 à 20 fois supérieur à celui des gènes nucléaires, notamment dans la région contrôle, mais la plupart des mutations sont des polymorphismes neutres. L'apparition d'une variation de séquence dans l'ADNmt aboutit à un mélange intracellulaire de molécules normales et mutées : l'hétéroplasmie. En dehors de tout contexte pathologique, un individu est homoplasmique, mais voit progressivement s'accumuler des mutations au cours du temps. La proportion d'ADN muté par rapport à l'ADN normal peut varier selon les tissus. Si ce taux dépasse une valeur critique spécifique du

tissu considéré, des caractéristiques cliniques vont se manifester, il s'agit de l'effet seuil [104].

Ce taux de mutation résulterait de l'absence d'histones, d'un système de réparation de l'ADN incomplet (système de réparation BER Base-Excision Repair), et d'une exposition continue aux radicaux libres générés par la chaîne d'électrons. Par ailleurs, le génome mitochondrial étant majoritairement codant, chaque mutation est potentiellement capable d'altérer la fonction mitochondriale.

*La production mitochondriale de ROS a été à l'origine de la théorie des radicaux libres mitochondriaux sur le vieillissement (MFRTA, Mitochondrial Free Radical Theory of Aging)*

Au cours du vieillissement, les mutations somatiques induites par les radicaux libres de l'oxygène s'accumulent, conduisant en un déclin de la fonction mitochondriale et des capacités énergétiques [12]. Selon un cercle vicieux, les mutations de l'ADNmt en induisant une dysfonction de la chaîne respiratoire, accentuent elles-mêmes la production de ROS et l'accumulation de nouvelles mutations. Le stress oxydatif est considéré comme le facteur majeur du déclin général des tissus associés à l'âge, les maladies dégénératives, la mort cellulaire programmée et le cancer [105].

Le modèle de la souris « Mutator » illustrerait cette relation entre mutations de l'ADNmt et vieillissement. Dans ce modèle, l'ADN polymérase mitochondriale POLG présente une activité polymérase intacte (réplication normale), mais se trouve mutée dans son domaine d'activité exonucléase (absence de correction des erreurs de réplication). La conséquence est une accumulation de mutations, une instabilité des complexes de la chaîne respiratoire par substitution de certains acides aminés, ainsi qu'une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire. Ces souris voient leur fertilité diminuée de façon notable dès 20 semaines, alors qu'à 25 semaines, âge du jeune adulte, elles présentent un tableau de sénescence (ostéoporose, anémie, cyphose, alopecie, diminution du tissu adipeux et hypertrophie cardiaque), avec une espérance de vie divisée par deux.

*Les ovocytes seraient particulièrement sujets au stress oxydant*

Tout d'abord, du fait d'une phase de quiescence particulièrement longue, les ovocytes sont susceptibles d'accumuler de nombreuses mutations (dont la délétion commune de 4 977 pb). Kitagawa a constaté que l'incidence des mutations de l'ADNmt dans

le tissu ovarien augmente après l'âge de 45 ans [106]. De plus, Keefe et al. ont montré que les ovocytes non fécondés de femmes de plus de 38 ans ont 3,3 fois plus de risque de présenter des mutations [107], mais ces résultats restent toutefois débattus [108, 109]. Des résultats récents ont montré que les cellules du cumulus seraient des sources potentielles de radicaux libres, puisque les cellules de cumulus de souris âgées peuvent induire l'apoptose ovocytaire [110].

#### *La protection anti-oxydante diminue avec le temps*

Ensuite, pour lutter contre les agressions dues au stress oxydatif, les ovocytes ainsi que les cellules folliculeuses sont pourvus d'antioxydants et d'enzymes détoxifiantes, dont la superoxide dismutase mitochondriale à manganèse MnSOD<sub>2</sub> et la catalase. La MnSOD<sub>2</sub> mitochondriale (à différencier de son isoforme cytosolique CuZnSOD) réduit l'anion superoxide en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. La catalase catalyse quant à elle la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau.

Les défenses anti-oxydantes diminueraient néanmoins avec l'âge. Certains auteurs ont mis en évidence une diminution des défenses anti-oxydantes des cellules folliculeuses avec l'âge. Les travaux de Tatone et al. ont montré que chez les femmes âgées ( $\geq 38$  ans), l'expression de la SOD<sub>2</sub> et de la catalase dans les cellules folliculeuses est significativement plus faible que chez les femmes jeunes ( $\leq 32$  ans) [111, 112]. Parallèlement à cette diminution du taux d'ARNm dans les cellules folliculeuses, les taux protéiques de ces deux enzymes sont également diminués.

#### *Pondération de la théorie MFRTA*

Cependant, la théorie des radicaux libres mitochondriaux sur le vieillissement a été récemment nuancée. Ahlqvist et al. ont montré que le phénotype de vieillissement prématuré des souris mutator ne serait pas dû à une surproduction de ROS, mais serait, au moins en partie, imputable à un dysfonctionnement des cellules souches somatiques dès le stade embryonnaire [113]. Par leur impact sur la capacité bioénergétique mitochondriale et l'état redox de la cellule, les mutations de l'ADNmt affecteraient la qualité et la quantité de cellules souches et diminueraient leur capacité d'auto-renouvellement. Les mutations de l'ADNmt pourraient ainsi provoquer un phénotype de vieillissement sans augmenter le stress oxydatif.

Un autre de type de modèle de souris transgénique remet également en cause cette théorie. Les souris mutées dans le gène de l'hélicase mitochondriale (Twinkle) présentent une accumulation de délétions et un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire, mais avec cependant une durée de vie normale [114]. Ainsi, l'accumulation de mutations et la dysfonction de la chaîne respiratoire pourraient ne pas suffire à expliquer le phénotype de vieillissement prématuré.

L'absence de corrélation claire entre le taux de production de ROS [115] ou l'efficacité des défenses anti-oxydantes [116] d'une part, et la durée de vie d'autre part, met également en doute le rôle des dommages oxydatifs dans le processus de vieillissement. Ainsi, un équilibre entre oxydants et antioxydants semble essentielle : les mitochondries pourraient faire face à des niveaux physiologiques de dommages oxydatifs, tandis qu'un excès d'apport de compléments alimentaires antioxydants pourrait être délétère.

#### *L'intervention de la mitochondrie dans le vieillissement se ferait par d'autres voies*

Les modifications liées à l'âge de la fonction mitochondriale pourraient aussi être secondaires à d'autres mécanismes, comme la fibrose, les modifications de vascularisation, la diminution de certains taux hormonaux (hormones thyroïdiennes, œstrogènes, glucocorticoïdes) [117, 118]. De nombreuses études relient la fonction mitochondriale aux voies de signalisation qui régulent la durée de vie et le processus de vieillissement, comme les voies de détection des nutriments insuline/IGF-1 et la voie mTOR [119, 120]. En accord avec cette hypothèse, l'activité physique et la restriction calorique pourraient réduire les dommages oxydatifs et améliorer la fonction mitochondriale [121, 122].

Une autre voie de régulation passe par un équilibre entre biogenèse mitochondriale et dégradation. Ainsi, la constitution et le maintien d'un pool sain mitochondrial dépend d'une balance entre biogenèse et dynamique mitochondriale (fusion et fission), équilibre rompu lors du vieillissement. La dérégulation de la dynamique mitochondriale pourrait ainsi être une des causes intrinsèques de la dysfonction mitochondriale, observée durant le processus de vieillissement [123]. En effet, il a été montré que l'expression de MFN2 diminue avec l'âge dans le muscle squelettique [124]. En outre, une perte excessive de mitochondries par mitophagie est reliée à une variété de maladies neurodégénératives, mais en revanche, une mitophagie inefficace peut conduire à l'accumulation d'organites endommagés, contribuant à une dysfonction métabolique globale.

La biogenèse mitochondriale est particulièrement importante pendant l'ovogenèse, permettant le maintien d'un pool d'ADNmt efficient pour le développement embryonnaire précoce. Le nombre de copies d'ADNmt, extrêmement variable selon le type cellulaire (entre  $10^1$  et  $10^5$  copies par cellule), est maximal dans l'ovocyte, puisque celui-ci contient 200 000 copies d'ADNmt en moyenne. Une corrélation directe entre le contenu en ADNmt et la qualité ovocytaire d'une part [125], et l'âge des patientes d'autres part [107, 126] a été mise en évidence, confortant le rôle de la biogenèse mitochondriale dans le vieillissement ovocytaire. De la même manière, la diminution de la réserve ovarienne (DOR) est associée à des taux diminués d'ADNmt, potentiel reflet d'une altération de la biogenèse mitochondriale durant la croissance folliculaire [126].



## **2/ Vieillesse ovarien et mitochondrie**

**Objectifs de ce travail**

La DOR, qui s'inscrit dans le cadre du vieillissement ovarien, s'accompagne d'une baisse de la qualité ovocytaire essentielle au développement embryonnaire précoce [2]. La mitochondrie, organe cytoplasmique ovocytaire quantitativement le plus important, pourrait intervenir à deux titres dans la pathogenèse de cette DOR. D'une part, elle a été clairement reliée à la qualité ovocytaire : le transfert de mitochondries d'un ovocyte jeune à un ovocyte âgé est capable de prévenir l'apoptose ovocytaire [127], et la masse mitochondriale est significativement moindre chez les patientes présentant une DOR [126]. D'autre part, la mitochondrie est directement impliquée dans les processus de vieillissement, et notamment de vieillissement ovarien et d'atrésie folliculaire en lien avec son rôle dans l'apoptose [128, 129].

Les ovocytes des follicules primordiaux, bloqués en prophase de première division méiotique depuis la vie embryonnaire, reprennent leur croissance après la puberté. Durant cette phase de la folliculogenèse, l'ovocyte va passer d'une taille de 30  $\mu\text{m}$  à 120  $\mu\text{m}$  avec une accumulation massive de protéines, d'ARNs messagers et d'organites cellulaires. La masse mitochondriale d'un ovocyte primaire d'un follicule primordial est estimée à 6 000 copies d'ADNmt [82], contre 200 000 copies pour un ovocyte ovulé [84]. La biogenèse mitochondriale, prépondérante au cours de cette période, pourrait être cruciale à l'acquisition de la compétence ovocytaire. Elle pourrait être altérée dans le processus de DOR et rendre compte alors de l'altération de la qualité ovocytaire en lien avec des anomalies mitochondriales.

Au sein du follicule ovarien, un système de signalisation bidirectionnelle entre l'ovocyte et les cellules folliculeuses qui l'entourent permet l'acquisition de la compétence ovocytaire [30]. Les cellules folliculeuses supportent la croissance et la maturation ovocytaire par le biais de l'apport de nutriments et de facteurs de croissance. Inversement l'ovocyte contrôle la différenciation, la prolifération et les fonctions des cellules folliculeuses via la sécrétion de facteurs paracrines appelés OSF (Oocyte-Secreted Factors) [130]. La qualité de l'ovocyte résulte de la coopération étroite entre ces deux types cellulaires. L'étude des cellules folliculeuses est considérée comme une des meilleures approches non invasive de la qualité ovocytaire et des processus dont elle découle. En particulier, l'expression de certains gènes serait liée à la qualité ovocytaire [40, 52], mais aussi au profil ovarien des patientes notamment celles présentant une DOR [45, 46]. Il est probable qu'une

altération de la biogenèse mitochondriale, ou des fonctions mitochondriales, si elle est en cause dans le processus de DOR ait une répercussion sur le fonctionnement des cellules folliculeuses. Certains auteurs ont d'ailleurs mis en évidence une diminution des défenses anti-oxydantes des cellules folliculeuses avec l'âge, notamment une altération de l'expression de MnSOD1 et 2 [111, 112]. Etudier l'expression par les cellules folliculeuses des gènes mitochondriaux pourrait permettre d'appréhender les rôles de la mitochondrie dans l'acquisition de la compétence ovocytaire au cours de la folliculogenèse.

Nous pensons que la biogenèse mitochondriale au cours de la folliculogenèse et/ou des fonctions mitochondriales ovocytaires seraient altérées dans la DOR et que les cellules folliculeuses pourraient en être le témoin.

### **OBJECTIFS**

Les travaux présentés ici, en s'intégrant dans la continuité des travaux effectués par l'équipe de recherche INSERM 1083, ont pour but d'étudier le rôle potentiel de la mitochondrie dans le vieillissement ovarien. Plus exactement, ils visent à évaluer l'implication de la biogenèse mitochondriale au cours de la folliculogenèse et des dysfonctions mitochondriales ovocytaires sur l'altération de la compétence ovocytaire observée chez les patientes présentant une diminution de la réserve ovarienne.

Dans ce travail, nous comparerons la masse mitochondriale et l'expression des gènes relatifs à la mitochondrie dans les cellules folliculeuses de patientes DOR (réserve ovarienne diminuée) versus NOR (réserve ovarienne normale). La masse mitochondriale sera évaluée par quantification de l'ADNmt, tandis que l'étude de l'expression génique concernera les gènes impliqués soit dans les fonctions mitochondriales - protection anti-oxydante (SOD<sub>2</sub>, catalase), apoptose (cytochrome c), homéostasie ferrique (ISCU) -, soit dans la biogenèse mitochondriale (POLG, TFAM, NRF1, PGC-1 $\alpha$  et  $\beta$ , SIRT1 et SIRT3) et sa maintenance (OPA1, MFN2, SAM50). Nous tenterons ensuite de corrélérer ces données à la quantité d'ADNmt dans l'ovocyte.

# **3/ Matériels et méthodes**

## **A. ENCADREMENT**

Il s'agit d'une recherche non interventionnelle, avec constitution d'une collection concernant les ovocytes immatures et les cellules folliculeuses. La constitution de cette collection intitulée "Fertilité et Qualité ovocytaire" a reçu l'aval du comité d'éthique du CHU d'Angers en Novembre 2010 (numéro CB 2010-06).

## **B. POPULATION ETUDIEE**

### **I. Description**

La population étudiée correspond aux patientes prises en charge dans le centre d'AMP du CHU d'Angers, et ayant signé un consentement de façon éclairée.

### **II. Modalités de recrutement et d'information**

L'information est donnée au cours de l'entretien biologique réalisé avant toute tentative d'AMP. Les patientes sont informées oralement et par écrit de la nature des échantillons prélevés, des analyses génétiques potentiellement réalisables, des bénéfices attendus, des contraintes et risques prévisibles, ainsi que du droit au patient de refuser de participer à cette collection ou de demander la destruction de ses échantillons biologiques à tout moment. A l'issue de l'entretien, les lettres d'information et de consentement sont remises aux patientes.

L'accord (ou le refus) de la patiente de participer à l'étude est connu le jour de la tentative, le consentement daté et signé étant rendu ce jour-là au laboratoire. Le consentement est remis au biologiste, qui en cas d'accord de la patiente, l'inclut ou non en fonction des critères de sélection. Si la patiente est sélectionnée, une copie du consentement lui est adressée.

Les données utilisées dans le cadre de cette étude sont recueillies dans les dossiers médicaux des patients suivis dans le service d'AMP du CHU d'Angers, dans le cadre de leur prise en charge de routine. Aucune procédure supplémentaire de traitement, de diagnostic ou de surveillance n'est proposée dans le cadre de cette étude.

### **III. Critères de sélection**

Pour être incluses les patientes doivent avoir signé le consentement de participation à l'étude et entrer dans l'une des deux catégories :

❖ Patientes avec un profil de diminution de la réserve ovarienne (DOR = Diminished Ovarian Reserve) avec au moins un des critères suivants :

- FSH > 8UI/L,

- CFA < 10 pour les deux ovaires,
  - AMH < 2µg/L,
  - Le tout corrélé à une mauvaise réponse à la stimulation ovarienne.
- ❖ Patientes contrôles avec un profil ovarien normal (NOR = Normal Ovarian Reserve), avec tous les critères suivants :
- FSH ≤ 8UI/L,
  - CFA ≥ 10,
  - AMH ≥ 2µg/L.

#### **IV. Nombre de patientes incluses**

Vingt-huit patientes, soit 14 patientes présentant une diminution de la réserve ovarienne (DOR) et 14 témoins avec une réserve ovarienne normale (NOR) sont incluses dans le protocole.

#### **C. ECHANTILLONS BIOLOGIQUES**

Les ovocytes utilisés pour cette étude sont recueillis au cours de cycles de fécondation in vitro réalisés au CHU d'Angers entre septembre 2012 et avril 2013.

La stimulation ovarienne nécessaire à ces cycles de fécondation in vitro utilise des gonadotrophines exogènes recombinantes (Purégon®, Organon, Gonal F®, Merck Serono, Pergoveris® Merck Serono) ou des gonadotrophines urinaires ménopausiques d'origine humaine (Ménopur®, Ferring). Le blocage de l'ovulation est assuré soit par un agoniste du GnRH (Décapeptyl®, Ipsen Biotech) débuté en milieu de phase lutéale, soit par des antagonistes du GnRH (Orgalutran®, Organon, Cétrotide®, Merck Sérono). Le déclenchement de l'ovulation par 6 500 unités d'hCG recombinante (Ovitrelle®, Merck Serono) est décidé sur les critères échographiques (≥ 5 follicules d'au moins 17 mm de diamètre) et biologiques (oestradiol plasmatique)

La ponction folliculaire est réalisée par voie transvaginale 36 heures après le déclenchement de l'ovulation. L'examen des liquides de ponctions folliculaires à la recherche des complexes cumulo-ovocytaires (CCO) est effectué à l'aide d'une loupe binoculaire munie d'une platine chauffante maintenue à 37°C. Les CCO recueillis sont ensuite placés à l'étuve à 37°C sous 5 % de CO<sub>2</sub> dans l'air, dans un milieu de culture approprié (Flushing Medium®, Origio, Malov, Danemark).

La décoronisation est réalisée ovocyte par ovocyte, par une exposition de 30 secondes environ à 50 µl de Hyaluronidase® (80 UI/mL, FertiPro, Beernem, Belgique) diluée au quart avec du Fercult®, puis par micro-pipetage à l'aide d'une pipette stripper calibrée à 125 µm (Origio, Malov, Danemark). Les cellules folliculeuses de chaque cumulus isolé sont reprises dans 500 µL de Fercult® et séparées en deux fractions équivalentes. Ces fractions sont ensuite lavées par centrifugation 10 min à 1 200 g, et les culots asséchés de cellules folliculeuses sont congelés immédiatement dans l'azote liquide.

Les ovocytes immatures sont habituellement jetés, n'étant pas aptes à être fécondés et à permettre un développement embryonnaire. Les 43 ovocytes immatures recueillis pour cette étude sont bloqués soit en prophase de première division méiotique (stade de vésicule germinative, n = 14), soit avant d'avoir atteint le stade de métaphase II (absence de globule polaire, n = 29). Chaque ovocyte immature est repris dans 3 µL de milieu de culture (Fercult®, FertiPro, Beernem, Belgique) et congelé dans un tube Eppendorf® par immersion directe dans l'azote liquide.

Les ovocytes et les cellules folliculeuses sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à extraction d'ADN ou d'ARN, réalisée de manière groupée après réception de l'ensemble des échantillons d'intérêt.

## **D. QUANTIFICATION DE L'ADN**

### **I. Extraction de l'ADN**

L'extraction de l'ADN de l'ensemble des échantillons est réalisée sur colonne avec membrane de silice avec le kit « Nucleospin® Tissue » de Macherey-Nagel, Düren, Allemagne (Figure 17). Dans un premier temps, la lyse cellulaire est obtenue par incubation, à 70°C pendant 10 min, de chaque échantillon avec 200 µL de tampon T1 de SDS (agent détergent), de 25 µL de protéinase K (protéase inactivant DNases et RNases) et de 200 µL de tampon B3 de chlorure de guanidine (agent chaotropique). L'ajout de 210 µL d'éthanol absolu permet d'ajuster les conditions de fixation de l'ADN, et celui-ci, chargé négativement, peut alors se fixer sur le filtre d'une colonne chargé positivement. Après une première centrifugation d'une minute à 11 000 g, un premier lavage par 500 µL de tampon BW (guanidine + isopropanol) est effectué, suivi d'une nouvelle centrifugation d'une minute à 11 000 g, puis un deuxième lavage par 600 µL de tampon B5, suivi à nouveau d'une centrifugation. Enfin l'ADN fixé sur la colonne est élué par 60 µL de tampon d'élution BE (5mM Tris/HCl, pH 8.5) préchauffé à 70°C. Le volume élué est repassé sur la colonne et centrifugé une nouvelle fois pour augmenter le rendement de l'extraction.











2	Pre-lyse sample		200 $\mu$ L T1 25 $\mu$ L Proteinase K
3	Lyse sample		200 $\mu$ L B3 70 °C, 10 min
4	Adjust DNA binding conditions		210 $\mu$ L 96–100% ethanol
5	Bind DNA	 	Load all  11,000 x g, 1 min
6	Wash silica membrane	 1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup> 	1 <sup>st</sup> wash 500 $\mu$ L BW 2 <sup>nd</sup> wash 600 $\mu$ L B5  11,000 x g, 1 min
7	Dry silica membrane		11,000 x g, 1 min
8	Elute highly pure DNA	 	60 $\mu$ L BE (70 °C) RT, 1 min  11,000 x g, 1 min

Figure 17 : Protocole d'extraction de l'ADN avec le kit NucleoSpin® Tissue de Macherey-Nagel

## **II. Optimisation des conditions de PCR**

### **1. Définition des amorces**

Le design des couples d'amorces, validé par des travaux antérieurs dans le laboratoire, a été élaboré grâce au logiciel « Beacon Designer », Applied Biosystems (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA), en choisissant de travailler sur des amplicons de petite taille (80 à 300 pb), à des températures d'hybridation proches (autour de 60°C), à une concentration de MgCl<sub>2</sub> définie. Le meilleur couple d'amorce est celui :

- Permettant une amplification pour les échantillons tests et une absence d'amplification (ou tardive) pour le témoin négatif,
- Présentant une bonne spécificité, caractérisée par la courbe de fusion. L'augmentation progressive de la température en fin de PCR permet de dissocier séquentiellement les ADN double brin en fonction de leur taille et de leur composition. La dénaturation a pour conséquence de libérer la molécule de SYBR Green® en solution et de provoquer une chute brutale de la



fluorescence. La dérivé de la courbe de dissociation fait apparaître un pic spécifique dont la position sur l'axe des températures est caractéristique de l'amplicon cible (courbe de fusion), sans pics parasites. Le cas échéant, les pics parasites (dimérisation d'amorces, formation de structures secondaires, cible non spécifique) consomment de la Taq polymérase, et de ce fait entraînent des biais dans les quantifications.

## **2. Choix des amorces**

La quantification de l'ADNmt dans l'ovocyte se faisant sur cellule unique, la quantité d'ADNmt obtenue dans le volume d'élution correspondra au nombre de copies présentes dans un ovocyte. En revanche, en ce qui concerne les cellules folliculeuses, la quantification de l'ADNmt doit être rapportée à la quantification d'un gène nucléaire, gène de ménage, témoin du nombre de cellules folliculeuses.

Pour quantifier l'ADN mitochondrial, nous avons testé les couples d'amorces F1R1, et mtLEU (gène tRNA-Leu). Pour quantifier l'ADN nucléaire, les couples d'amorces testés sont AIB F/R (gène NCoA3, Nuclear receptor CoActivator 3) et actine F/R. Nous avons également testé plusieurs températures d'hybridation (58°C, 60°C) et finalement retenu les amorces F1R1 et AIBF/R à 58°C (Tableau 3).

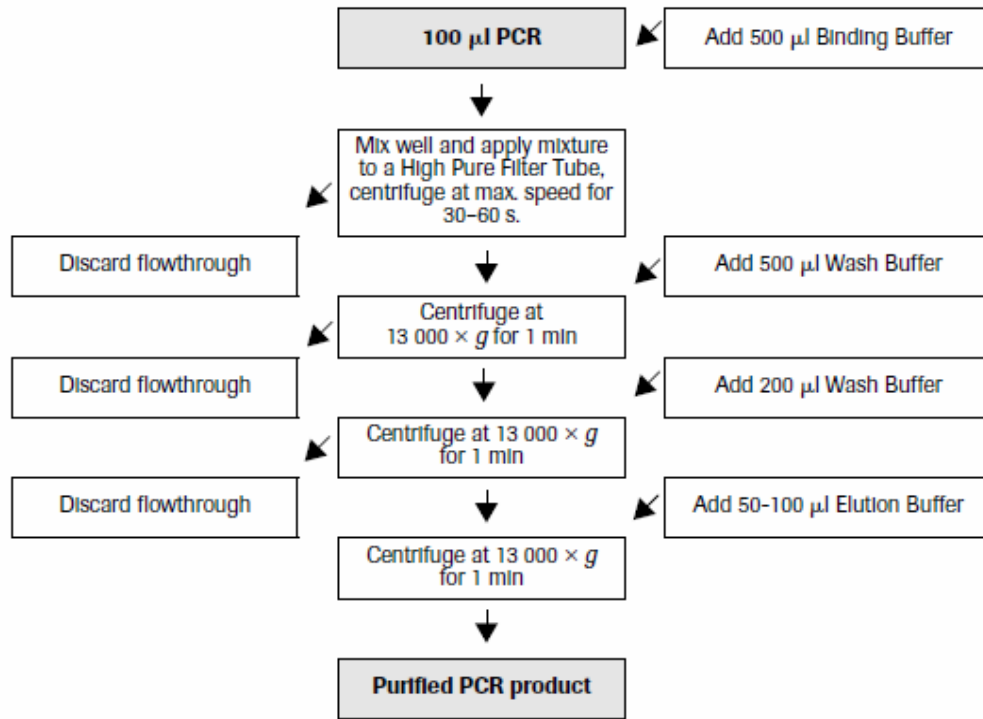
Gène amplifié	Amorces	Séquence des amorces	Taille de l'amplicon
F1R1	F1	<b>GAACCAACACCTCTTTAC</b>	217 pb
	R1	<b>GGCAATGAATGAAGCGAA</b>	
AIB1	AIB F	<b>GGAGTTTCCTGGACAAATGA</b>	108 pb
	AIB R	<b>AGGACTGGCGTTTATGTCTT</b>	

**Tableau 3** : Description des amorces utilisées pour la qPCR

## **3. Préparation des standards**

La préparation des standards externes est réalisée à partir d'ADN de fibroblastes humains. Des réactions de PCR sont effectuées pour chaque gène étudié à l'aide du thermocycler PTC 200 (MJ research, Ramsey, USA) et du kit de PCR Hot Gold Star d'Eurogentec, Seraing, Belgique. Le milieu réactionnel est constitué de 25 µL de Premix (Taq polymérase, dNTPs 200 µM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM et tampon), 1 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µL d'amorce sens 20 µM, 1 µL d'amorce antisens 20 µM, 20 µL d'eau, auxquels sont ajoutés 2 µL d'ADN. Des témoins négatifs sont également réalisés pour chaque fragment amplifié. Après activation de la Taq polymérase à 94°C pendant 10 min, trente cinq cycles sont effectués. Ils comprennent une étape de dénaturation de 45 secondes à 94°C, une étape d'hybridation de 45 secondes à 58°C et une étape d'élongation de

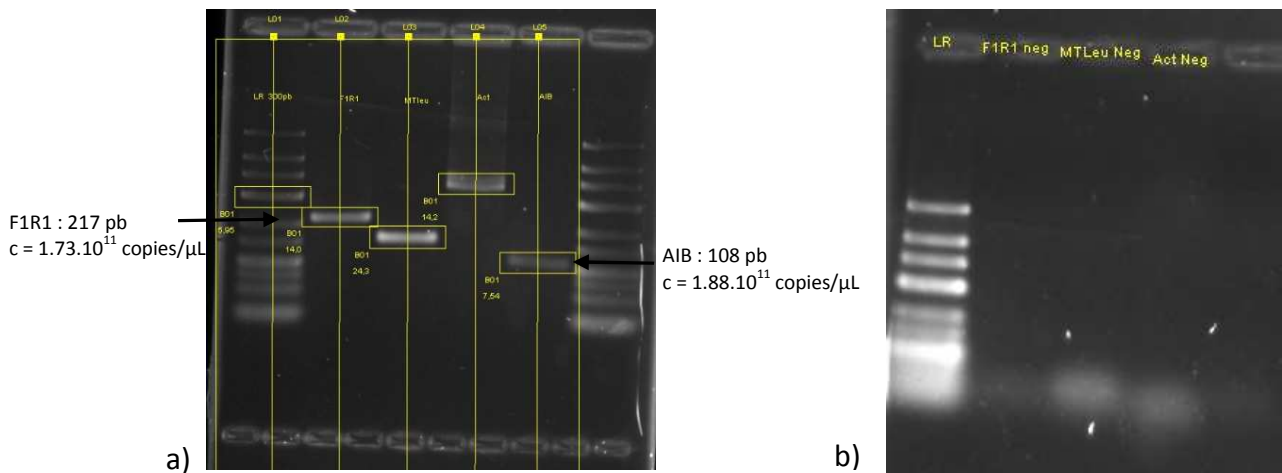
2 minutes à 72°C. Enfin, l'élongation finale est obtenue à 72°C pendant 3 minutes. Après amplification, les produits de PCR sont purifiés sur colonne en utilisant le « High Pure PCR Product Purification kit » (Roche Diagnostics, Basel, Suisse) selon les recommandations du fournisseur (Figure 18).



**Figure 18** : Protocole de purification des produits de PCR avec le kit « High Pure PCR Product Purification kit » de Roche Diagnostics

10 µl de chaque échantillon sont ensuite déposés sur gel d'agarose 1.5 %. La visualisation des bandes sous rayonnement UV après imprégnation au GelRed® (Interchim, Montluçon, France) permet de vérifier la bonne amplification des fragments sous forme d'une bande unique, ainsi que l'absence de bande dans le témoin négatif (absence de contamination) (Figure 19). Pour chaque standard, la concentration en ng/µL est calculée en comparant la résolution des bandes à celle du marqueur de taille GeneRulerLow Range DNA ladder de Thermo Scientific® (Waltham, USA), puis convertie en nombre de copies/µL, connaissant la taille de chaque fragment amplifié, pour une masse molaire d'ADN double brin de 650 g/mol. Une dilution des échantillons obtenus est alors réalisée pour obtenir une concentration de 10<sup>11</sup> copies/µl pour chacun des standards. Les standards sont préparés de manière à avoir des quantités d'ADN suffisantes pour toutes les manipulations, afin d'éviter le biais liés à des qPCR réalisées à des moments différents. Ils sont aliquotés en volume de 10 µL, stockés à -80°C et décongelés une seule fois, le jour de la

manipulation. La gamme de dilution des standards est choisie de telle façon qu'elle couvre les concentrations du même gène pour les échantillons patients.



**Figure 19** : a) Quantification des standards d'ADNmt par rapport au marqueur de taille « GeneRulerLow Range DNA ladder ». La taille des fragments en paire de base (pb) et leur concentration en nombre de copies/μL sont indiquées, b) Témoins négatifs

#### **4. PCR quantitative**

##### **a) Protocole opératoire**

L'ADN mitochondrial est quantifié en duplicate pour chaque échantillon, par qPCR sur le thermocycleur Chromo 4 de BIORAD® (Hercules, USA). Le SYBR®green supermix (BIORAD®) est utilisé dans un volume réactionnel final de 20 μl avec des amorces à 0,5 μM, et 3 μl d'ADN à quantifier, ou témoins ou points de gamme préalablement constitués. Les réactions se déroulent ainsi : une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 10 minutes, puis 50 cycles à 95°C pendant 45 secondes, 58°C pendant 1 minute, et 72°C pendant 45 secondes. La fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation. Une courbe de fusion est réalisée systématiquement en augmentant la température d'un degré par seconde de 55°C à 95°C avec une lecture continue de la fluorescence.

##### **b) Contrôles**

Dans chaque série sont inclus un contrôle négatif (H<sub>2</sub>O distillée à la place de l'ADN, témoin de non-contamination), et un contrôle positif (ADN de fibroblaste humain, témoin de bonne amplification), tous deux passés en duplicate.

##### **c) Gamme d'étalonnage**

Les standards sont dilués extemporanément avec de l'eau stérile afin d'obtenir quatre points de gamme  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  et  $10^5$  copies/ $\mu\text{L}$ .

#### d) Quantification

Le nombre de copies d'ADN contenu dans chaque échantillon est obtenu grâce aux valeurs des Ct ou "Cycle treshold", cycle pour lequel l'amplification de la cible est détectée pour la première fois (figure 14a). Le nombre de Ct est inversement proportionnel au logarithme du nombre de molécules d'ADN cibles initialement présentes dans l'échantillon. L'expression des Ct en fonction de la concentration initiale connue de chaque point de gamme permet la construction d'une droite d'étalonnage. Le nombre de copies d'ADNmt et d'ADN nucléaire pour chaque échantillon est alors déterminé en rapportant les Ct obtenus à cette gamme d'étalonnage.

### III. Validation des résultats

Pour chaque réaction, les coefficients de corrélation  $r$  des droites d'étalonnage, témoignant de la linéarité de la technique et de la répétabilité des points de gamme, sont supérieurs à 0,998 (Figure 20b).

La spécificité de la réaction est appréciée pour chaque PCR par l'analyse de la courbe de fusion des produits de PCR (Figure 20d).

Le seuil de sensibilité de la technique est estimé autour de 10 copies d'ADN.

La précision intra-essai de notre technique est vérifiée par comparaison des duplicats. Pour chacun d'entre eux, une moyenne est effectuée.

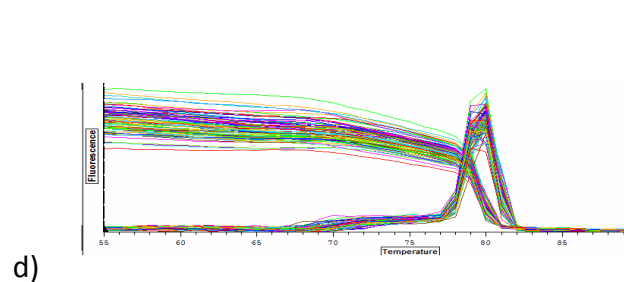
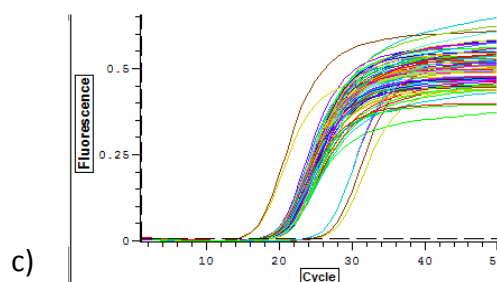
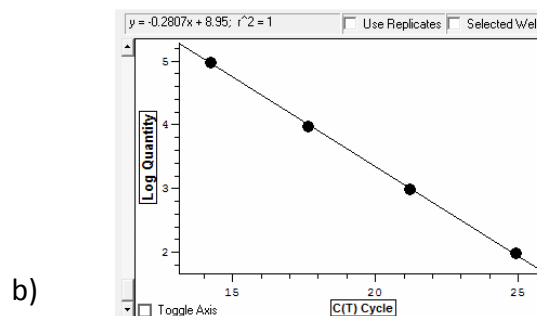
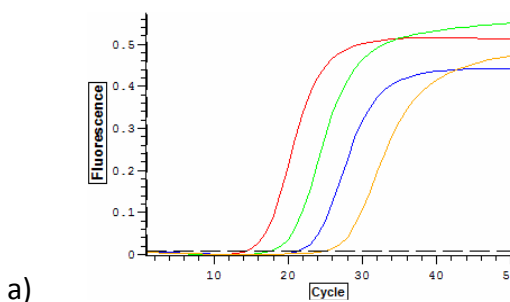


Figure 20: Plaque « F1r1 ovocyte » : Quantification de l'ADN mitochondrial dans les ovocytes. a) Courbe de fluorescence des standards en fonction du nombre de cycles, b) Gamme d'étalonnage des standards, c) Courbe de fluorescence des échantillons en fonction du nombre de cycles, d) Courbe de fusion des échantillons.

## **E. QUANTIFICATION DES TRANSCRITS**

### **I. Extraction de l'ARN**

L'extraction de l'ARN est réalisée sur colonne avec membrane de silice grâce au kit « Nucleospin® RNA XS » de Macherey-Nagel, Düren, Allemagne (Figure 21). Dans un premier temps, la lyse cellulaire est obtenue par ajout de 100 µL de tampon RA1 de thiocyanate de guanidine 30-60 % (agent chaotropique, inactivateur de RNases) et de 2 µL d'agent réducteur TCEP Tris(2-carboxyethyl)phosphine. 5 µL de Carrier RNA (sel de potassium poly(-A) RNA: poly (A)) est ajouté pour améliorer le rendement de fixation de l'ARN, puis le mélange est filtré et centrifugé à 11 000 g pendant 30 secondes. L'ajout de 100 µL d'éthanol à 70 % permet d'ajuster les conditions de fixation de l'ARN, et celui-ci, chargé négativement, peut alors se fixer sur le filtre d'une colonne chargé positivement. Après une centrifugation de 30 secondes à 11 000 g, un premier lavage par 100 µL de tampon MDB (thiocyanate de guanidine 1-15 % et éthanol 5-20 %) est effectué, suivi d'une nouvelle centrifugation de 30 secondes à 11 000 g, puis d'une digestion de l'ADN pendant 15 min à température ambiante par 25 µL de rDNase. Trois lavages successifs sont effectués, respectivement par 100 µL de tampon RA2 (thiocyanate de guanidine 30-60 % et éthanol 20-35 %) pendant 2 min à température ambiante, 400 µL de tampon RA3, et 200 µL de tampon RA3, chacun étant suivi d'une centrifugation à 11 000 g. Enfin l'ARN fixé sur la colonne est élué par 10 µL d'eau RNase-free, par centrifugation 30 secondes à 11 000 g. L'ARN obtenu est quantifié (Nanodrop ND-1000) et qualifié (Bioanalyzer 2100 et RNA6000 Pico kit-Agilent, Etats-Unis), pour confirmer l'absence d'ADN contaminant et conservé à -20°C jusqu'à rétrotranscription.














1	Supply sample		Use up to 10 <sup>6</sup> cultured cells or 5 mg tissue samples
2	Lyse and homogenize cells		100 µL RA1 2 µL TCEP Mix
3	Add Carrier RNA		5 µL Carrier RNA working solution Mix
4	Filtrate lysate ( <i>optional</i> )	 	11,000 x g, 30 s
5	Adjust RNA binding condition		100 µL 70 % ethanol Mix
6	Bind RNA	 	Load lysate 11,000 x g, 30 s
7	Desalt silica membrane	 	100 µL MDB 11,000 x g, 30 s
8	Digest DNA		25 µL DNase reaction mixture RT, 15 min
9	Wash and dry silica membrane	 	1 <sup>st</sup> wash 100 µL RA2 RT, 2 min 11,000 x g, 30 s 2 <sup>nd</sup> wash 400 µL RA3 11,000 x g, 30 s 3 <sup>rd</sup> wash 200 µL RA3 11,000 x g, 2 min
10	Elute highly pure RNA	 	10 µL RNase-free H <sub>2</sub> O 11,000 x g, 30 s

Figure 21 : Protocole d'extraction de l'ARN avec le kit NucleoSpin® RNA XS de Macherey-Nagel

## II. Reverse Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

La rétrotranscription de l'ARN de chaque échantillon est réalisée à l'aide du kit Super Script Vilo (Invitrogen SARL, France). 10 µL d'ARN de chaque échantillon sont mélangés à 2µL d'enzyme SuperScript® 10X (SuperScript® III RT, et RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor), 4 µL de Mix Reaction 5X Vilo® (MgCl<sub>2</sub>, primers et dNTPs) pour un volume final de 20 µL. Le mélange préparé dans la glace est incubé 10 minutes à 25°C, puis 1 heure à 42°C pour permettre la rétrotranscription de l'ARN, et finalement chauffé à 85°C pendant 5 minutes pour dénaturer la rétrotranscriptase. L'ADNc obtenu est ensuite conservé à -20°C puis les échantillons sont transmis à

IntegraGen® (Evry, France). La PCR quantitative est réalisée en sixtuplate pour chaque échantillon par méthode micro-fluidique sur le système Biomark (Fluidigm Europe B.V.). Les 14 transcrits sélectionnés sont amplifiés grâce aux amorces décrites dans le Tableau 4.

Transcrit amplifié	Amorces	Séquence des amorces	Taille de l'amplicon (pb)
POLG	F	CAAGGAGCCTTTGGTGAGTTCAA	82
	R	CATGGATTGTAAAACCCCTTCCA	
TFAM	F	GCTGAAGACTGTAAAGGAAAAGTGGGA	120
	R	GATCCTTTCGTCCAACCTCAATCA	
NRF1	F	GTCCAAGATGCTAATGGCCTGGT	54
	R	CACAGTCTGGTACATGCTCACAGG	
PGC-1 $\alpha$	F	TCATCTGAGTTTGAATCTAGGTCTGC	66
	R	GTACTTTTGTGGACGCAAGCAAT	
PGC-1 $\beta$	F	GCCCAGATACTACTGACTACGATTCC	78
	R	TCCATGGCTTCATACTTGCTTTTC	
SIRT1	F	GTAGGCGGCTTGATGGTAATCAG	75
	R	AATATACCTCAGCGCCATGGAAA	
SIRT3	F	TTTGTCTGGTCCATCAAGCTTCC	70
	R	TCTGGGCTGGACAGAAGAGATG	
OPA1	F	CATGCTTGCTATCACCGCAAATA	83
	R	CACCATCTTCAGCAAATCTTCCA	
MFN2	F	GCAAAGCTGCTCAGGAATAAAGC	73
	R	GCTGCAGGTAAGTGTGTGAAC	
CAT	F	CAATGCTGAGAAGCCTAAGAATGC	53
	R	GAGATCCGGACTGCACAAAGG	
SOD2	F	GCAAGTGAATAAAGCCTGTTGTT	76
	R	GAACGGGGACACTTACAAATTGC	
CYCS	F	TGCCTTCTCAACATCACCCATA	104
	R	GGCGTGTCTTGGACTTAGAGAG	
ISCU	F	CTCTGCCTTCCCTCCCGTGAAAC	57
	R	CTTGATTGCATCTTCAGCCAGCA	
SAM50	F	GCAACATCGCTCGGTTGGA	46
	R	CTCCAAACTGGACGCCATCAC	

Tableau 4 : Description des amorces utilisées pour la RT-qPCR

## **F. ANALYSES STATISTIQUES**

Les calculs statistiques sont réalisés avec le logiciel SPSS (SPSS Inc, Chicago). Pour la comparaison des variables quantitatives, nous avons utilisé un test non paramétrique de Mann-Whitney et le test Khi-deux de Pearson pour les variables qualitatives. Les données sont considérées comme statistiquement significativement différentes si  $p < 0.05$ . En ce qui concerne

l'expression relative des gènes, les valeurs des Ct obtenues à l'issue de la qPCR sont analysées par la méthode des delta-delta de Ct.



# 4/ Résultats

## A. POPULATION

Nous avons recueilli 43 ovocytes au cours de cycles de stimulation de 28 patientes, répartis entre le groupe DOR (n=23), et le groupe NOR (n=20).

Les deux groupes de patientes sont comparables pour l'IMC, la consommation de tabac, et la durée d'infertilité (Tableau 5). En revanche, la moyenne d'âge est significativement plus élevée dans le groupe DOR, illustrant le phénomène de diminution de la réserve ovarienne liée à l'âge [12]. Le bilan hormonal (FSH, E2, AMH), et échographique (CFA) ayant permis de définir les deux entités de patientes, ces critères diffèrent donc significativement entre les deux groupes. D'autre part, les patientes DOR présentent classiquement un tableau de "mauvaise réponse à la stimulation ovarienne". Dans ce groupe, la dose initiale et totale de gonadotrophines (FSH) utilisées au cours de la stimulation sont significativement supérieures. De la même manière, le nombre d'ovocytes recueillis par ponction est significativement plus faible. A noter que le type de protocole et le type de FSH utilisés ne diffèrent pas significativement entre les deux groupes. De même, il n'est pas observé de différence significative dans le contenu en ADNmt entre les ovocytes bloqués en prophase I (VG) et ceux bloqués entre la prophase I et la métaphase II (GP<sup>-</sup>), ce qui nous permet de comparer les différents groupes sans tenir compte du type d'immaturité nucléaire.

	Population	DOR	NOR	Significativité
Nombre de patientes	28	14	14	
Age moyen (ans)	32.3	35	29.8	p<0.0001
IMC	23.5	23.7	23.4	p = 0.961
Tabac (% de fumeuses)	14.8	15	14	p = 0.28
Durée d'infertilité (années)	3.8	4.1	3.6	p = 0.193
FSH (UI/L)	7.7	9.4	5.9	p<0.0001
AMH (µg/L)	3.1	1.5	4.6	p<0.0001
CFA	16	10	22	p<0.0001
LH suppression				p = 0.062
-Ganirélix	n = 7	n = 2	n = 5	
-Cétrorélix	n = 18	n = 11	n = 7	
-Triptoréline	n = 3	n = 1	n = 2	
Type de FSH				p = 0.058
rFSH	n = 22	n = 10	n = 12	
uFSH + uLH	n = 6	n = 4	n = 2	
Dose initiale de FSH (UI)	263	184	342	p<0.0001
Dose totale de FSH (UI)	2684	3629	1739	p<0.0001
Nombre d'ovocytes recueillis	6.9	5.8	8.1	p = 0.002
Proportion de VG/GP-	67%	78%	55%	p = 0.097
La différence entre les 2 groupes est significative si p<0.05				

Tableau 5 : Caractéristiques des deux types de population "DOR" et "NOR"

## **B. QUANTIFICATION DE L'ADN MITOCHONDRIAL**

### **I. Quantification de l'ADNmt ovocytaire**

Un taux moyen de 122 000 copies par ovocyte est retrouvé dans le groupe DOR, tandis qu'il s'élève à 140 000 copies pour le groupe NOR (Figure 22). Cette différence abonde dans le sens de publications antérieures [126]. Néanmoins, cette tendance n'est pas significative ( $p = 0.2$ ).

### **II. Quantification de l'ADNmt dans les cellules folliculeuses**

Nous retrouvons un taux d'ADN mitochondrial situé entre 400 et 600 copies par cellule. Toutefois, nous ne dégageons pas de différence selon le profil ovarien ( $p = 0.4$ ), puisqu'on retrouve une moyenne de 533 copies dans les cellules folliculeuses du groupe DOR, contre 556 copies pour le groupe NOR (Figure 23).

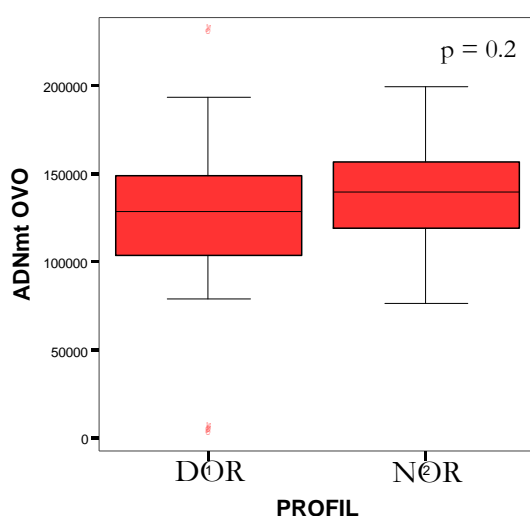


Figure 22 : Comparaison du taux d'ADNmt ovocytaire selon le profil DOR ou NOR

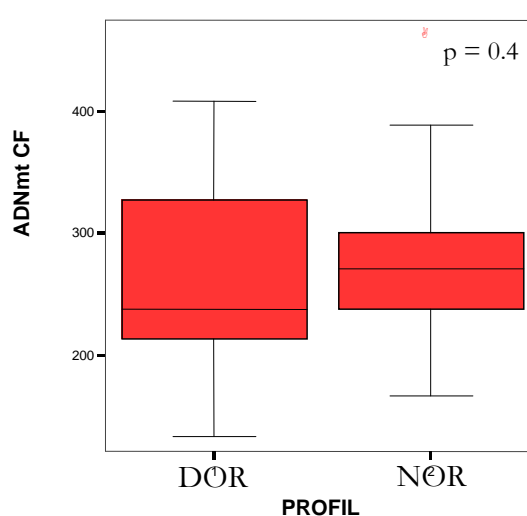


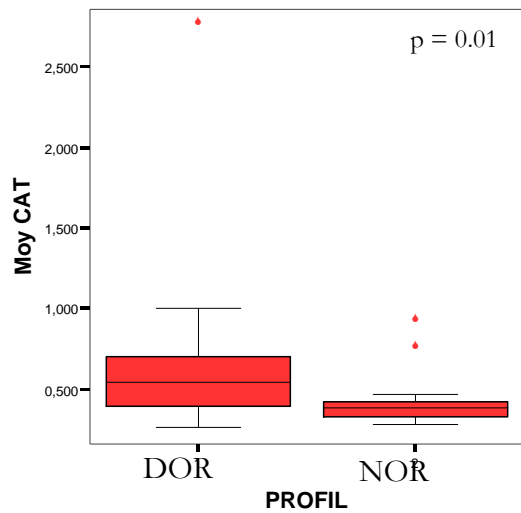
Figure 23 : Comparaison du taux d'ADNmt dans les cellules folliculeuses selon le profil DOR ou NOR

### **III. Corrélation ADNmt folliculaire / ADNmt ovocytaire**

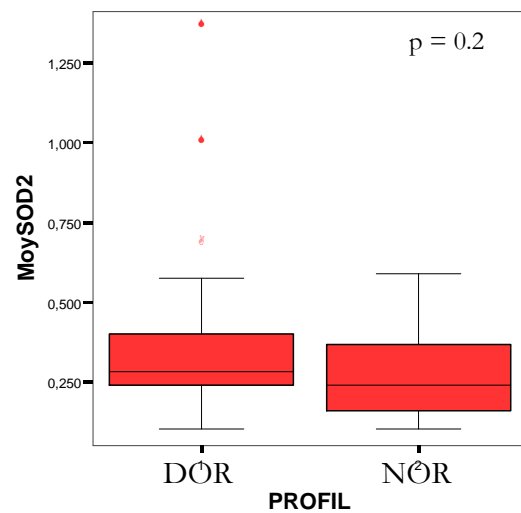
Aucune corrélation n'est mise en évidence entre la quantité d'ADN mitochondrial dans les ovocytes et celle retrouvée dans les cellules folliculeuses (corrélation de Pearson,  $p=0.6$ ).

## **C. EXPRESSION GENIQUE DANS LES CELLULES FOLLICULEUSES**

Concernant les gènes impliqués dans les fonctions mitochondriales (défense contre le stress oxydant, apoptose, et homéostasie du fer), nous avons mis en évidence une augmentation significative de l'expression de la catalase dans le groupe DOR ( $p=0.01$ ) (Figure 24). En revanche, aucune différence significative n'a été démontrée en ce qui concerne l'expression de SOD2 ( $p=0.2$ ) (Figure 25), du cytochrome c ( $p=0.5$ ) et d'ISCU ( $p = 0.6$ ).

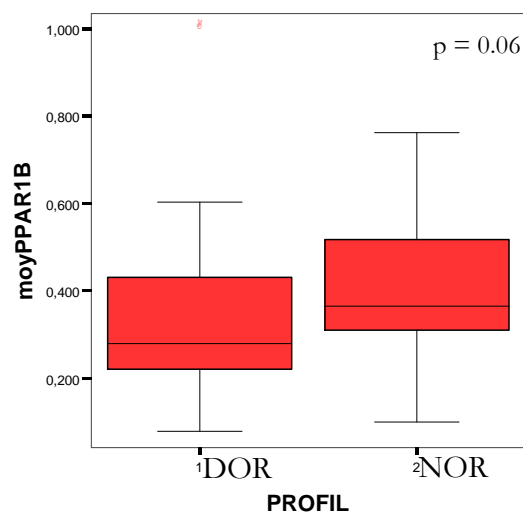


**Figure 24** : Comparaison de l'expression de la catalase selon le profil DOR ou NOR



**Figure 25** : Comparaison de l'expression de la SOD<sub>2</sub> selon le profil DOR ou NOR

Au sujet des gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale et dans sa maintenance, aucune différence significative n'est retrouvée pour POLG ( $p = 0.8$ ), TFAM ( $p = 0.5$ ), NRF1 ( $p = 0.8$ ), PGC-1 $\alpha$  ( $p = 0.3$ ), OPA1 ( $p = 0.7$ ), MFN2 ( $p = 0.3$ ) et SAM50 ( $p = 0.8$ ). Une diminution de l'expression de PGC1- $\beta$  ( $p = 0.06$ ) (Figure 26), et une augmentation de l'expression de SIRT1 ( $p = 0.1$ ) (Figure 27), et SIRT3 ( $p = 0.2$ ) (Figure 28), se dégage pour le groupe DOR, sans toutefois de significativité au seuil 0.05.



**Figure 26** : Comparaison de l'expression de PGC-1 $\beta$  selon le profil DOR ou NOR

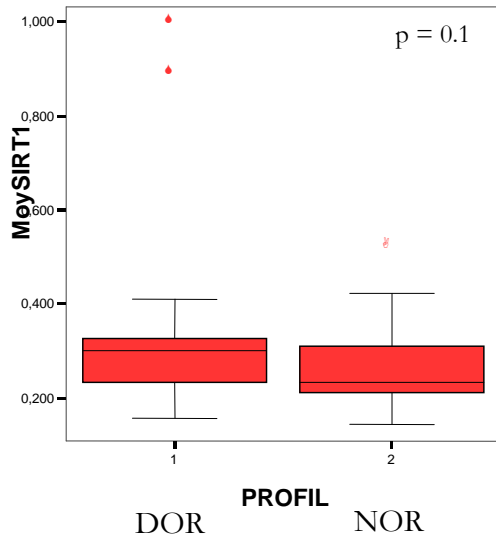


Figure 27 : Comparaison de l'expression de SIRT1 selon le profil DOR ou NOR

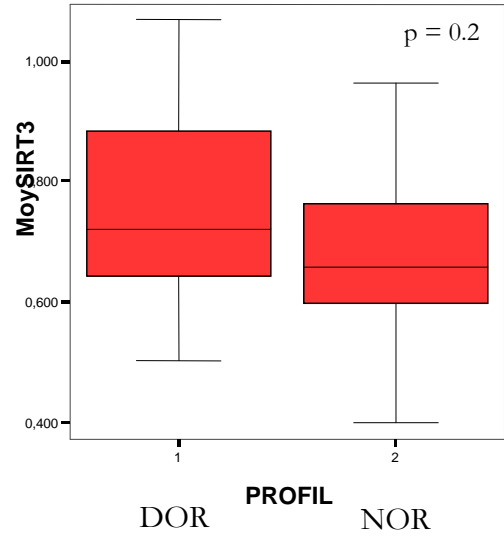


Figure 28 : Comparaison de l'expression de SIRT3 selon le profil DOR ou NOR

# **5/ Conclusion - Perspectives**

Par sa prévalence, l'infertilité constitue de nos jours un véritable problème de santé publique. On estime en effet qu'un couple sur six est amené à consulter au moins une fois pour cette problématique. Le bilan diagnostique permettra le plus souvent de rapporter une étiologie précise de l'infertilité (20 % masculine, 33 % féminine, 39 % mixte). Dans un certain nombre de ces situations, l'Assistance Médicale à la Procréation fournira une solution thérapeutique adéquate et efficace ; comme l'ICSI peut permettre de remédier à une oligo-astheno-tératospermie, même sévère. Cependant, pour une part non négligeable de cas (environ 10 %), l'infertilité reste idiopathique. Le vieillissement ovarien, problématique récente à laquelle nous sommes de plus en plus confrontés dans les consultations d'infertilité, sous-tend certainement un bon nombre des infertilités, restées jusque-là mal étiquetées. L'évolution de notre société a nettement fait reculer l'âge de la première grossesse, et de plus en plus de femmes présentent une diminution accélérée de leur réserve ovarienne, de façon non corrélée à leur âge. De nombreux facteurs environnementaux (tabac, mode de vie, environnement intra-utérin) et génétiques ont été incriminés dans ce phénomène, sans pour autant l'expliquer complètement. La diminution de la réserve ovarienne (DOR), se révélant lors d'un désir de grossesse du couple, peut être mis en évidence par les marqueurs quantitatifs de la réserve ovarienne (CFA, AMH, FSH et E2, réponse à la stimulation ovarienne). Cette DOR, qui s'inscrit dans le cadre du vieillissement ovarien, s'accompagne d'une baisse de la qualité ovocytaire essentielle au développement embryonnaire précoce [2], mais dont l'évaluation reste à ce jour inaccessible en pratique.

La pratique de l'AMP restant essentiellement palliative, et les taux de succès relativement faibles, particulièrement chez les femmes avec un capital ovarien diminué, il semble capital de s'intéresser aux mécanismes impliqués dans le vieillissement ovarien afin d'améliorer la prise en charge de l'infertilité. Diverses équipes s'attachent actuellement à définir de nouveaux marqueurs non invasifs prédictifs de la qualité ovocytaire et de l'évolutivité embryonnaire, au niveau des cellules du cumulus ou du liquide folliculaire.

Les mitochondries constituent des organites clés du métabolisme énergétique cellulaire, en fournissant l'essentiel de l'énergie sous forme d'ATP par l'intermédiaire des oxydations phosphorylantes. L'ovocyte constituant la cellule la plus riche en mitochondries, avec un pool mitochondrial transmis à l'embryon sans amplification jusqu'à l'implantation

[93, 131], on conçoit dès lors que des anomalies mitochondriales sont susceptibles d'entraîner des troubles de la qualité gamétique et du développement embryonnaire. La mitochondrie étant en outre impliquée dans l'atrésie folliculaire par le biais de son rôle dans l'apoptose et dans le vieillissement en général, il est logique de penser que le vieillissement ovarien puisse passer par une dérégulation des fonctions mitochondriales.

L'objectif initial de cette étude était de procéder à une évaluation quantitative et qualitative des altérations mitochondriales impliquées dans le vieillissement. Cette démarche s'inscrit dans la continuité des études entreprises dans notre laboratoire, mais en nous focalisant cette fois-ci sur l'étude des cellules folliculeuses. Le premier volet de ce travail a consisté à évaluer la masse mitochondriale dans les ovocytes et les cellules folliculeuses. Si la mitochondrie est directement colorable par différentes méthodes (vert janus ou fluorochrome MitoTracker®), la quantification du pool mitochondrial est difficilement accessible par ces méthodes, en raison de la grande plasticité de ces organites. Nous avons donc choisi d'évaluer le pool mitochondrial indirectement par quantification du taux d'ADN mitochondrial.

- 1) Le taux d'ADN mitochondrial ovocytaire est connu pour être lié à la qualité ovocytaire [84, 125] et a été montré diminué dans les ovocytes de patients DOR [126]. Dans notre étude, nous avons observé un taux moyen d'ADNmt effectivement inférieur dans le groupe DOR, mais sans significativité, probablement en raison de notre effectif.
- 2) Devant l'importance des cellules folliculeuses dans l'acquisition de la compétence ovocytaire, nous avons voulu évaluer la masse mitochondriale de ces cellules. Cette dernière, reflet du potentiel énergétique des cellules folliculeuses, nous semblait pouvoir être modifiée dans les processus de vieillissement. Le vieillissement ovarien est en effet responsable d'une baisse de la qualité ovocytaire possiblement en lien avec une modification de l'expression des cellules folliculeuses, en particulier des gènes de la phosphorylation oxydative [132]. Nous avons estimé le nombre de copies d'ADNmt autour de 400 à 600 copies par cellule folliculeuse, sensiblement équivalent aux résultats des travaux de Tsai et al. [133], mais sans mettre en évidence de différence significative entre les deux statuts de patientes DOR versus NOR.



Le deuxième volet de ce projet a consisté à étudier les cellules folliculeuses comme témoins d'un dysfonctionnement mitochondrial au cours de la pathogenèse de la DOR, pouvant indirectement impacter la qualité ovocytaire. Pour ce faire, nous avons évalué, dans les cellules folliculeuses, l'expression de certains gènes clés, impliqués soit dans les fonctions mitochondriales (défense anti-oxydante, apoptose, homéostasie du fer), soit dans la biogenèse mitochondriale.

- 1) En ce qui concerne l'expression des gènes liés aux défenses anti-oxydantes, nous avons mis en évidence une surexpression de la catalase chez les insuffisantes ovariennes. Ces résultats vont à l'encontre des travaux de Tatone [111, 112], qui font ressortir une diminution des défenses anti-oxydantes des cellules folliculeuses avec l'âge, par le biais d'une altération de l'expression de MnSOD<sub>1</sub>, MnSOD<sub>2</sub> et de la catalase. Cependant, son étude se base également sur de faibles effectifs, puisque seulement dix patientes ont été incluses dans chaque groupe. Nous postulons en revanche que la surproduction d'enzymes anti-oxydantes que nous avons mise en évidence dans notre étude pourrait représenter une réponse à une surproduction de ROS. Ces résultats reposent sur l'implication des radicaux libres générés lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire, dans l'accumulation de mutations de l'ADNmt durant la vie, à l'origine des processus de vieillissement humain et des maladies dégénératives [134-136]. L'intensification des processus de défense anti-oxydante constituerait alors un mécanisme compensateur pour pallier à cette agression.
- 2) La mitochondrie constituant une figure majeure de l'apoptose, le phénomène de DOR pourrait être lié à une dérégulation des phénomènes apoptotiques impliquant les mitochondries [137]. Nous n'avons cependant pas mis en exergue de différence d'expression du cytochrome c selon le profil DOR ou NOR des patientes.
- 3) La mitochondrie joue également un rôle dans l'homéostasie du fer, mais nous n'avons cependant pas mis en évidence de différence d'expression du gène ISCU entre les deux groupes.
- 4) Concernant la biogenèse et la dynamique mitochondriales, nous pensons qu'elle pourrait être altérée au cours de la folliculogenèse chez les patientes DOR, rendant compte de la chute du contenu en ADNmt des ovocytes de ces femmes. L'étude des

gènes impliqués dans la réplication de l'ADNmt et sa maintenance n'a pas montré de différence d'expression entre les DOR et les NOR pour les gènes POLG, TFAM, NRF1, PGC-1 $\alpha$ , OPA1, MFN2 et SAM50 tandis qu'il existe une différence à la limite de la significativité pour l'expression de PGC-1 $\beta$ , SIRT1 et SIRT3 chez les DOR.

Les résultats présentés ici sont encourageants. L'étude de l'expression génique mitochondriale dans les cellules folliculeuses semble particulièrement intéressante en ce qui concerne les gènes impliqués dans la défense contre le stress oxydant. Afin de comprendre ces mécanismes plus en profondeur, il paraît nécessaire d'élargir notre cohorte. La difficulté de recrutement des patientes nous a en effet contraints à étudier une population limitée de patientes. Néanmoins, nous avons déjà recueilli un nombre conséquent d'échantillons supplémentaires, pour lesquels nous envisageons de continuer ces recherches. D'autre part, en raison de l'importance des événements post-transcriptionnels, il pourrait être intéressant d'étudier les taux protéiques de ces enzymes dans les cellules folliculeuses des patientes DOR.

D'importants progrès ont été réalisés au cours des dernières années concernant la compréhension des mécanismes impliqués dans la qualité ovocytaire et le vieillissement ovarien. Le développement de certaines techniques, comme le procédé éthiquement controversé du transfert d'ooplasme, constituent des avancées encourageantes pour remédier à cette problématique de qualité ovocytaire. Cette technique, ayant permis l'obtention d'une trentaine d'enfants dans le monde, a cependant été interdite en raison de l'hétéroplasmie mitochondriale induite chez les enfants en étant issus. Le transfert de mitochondries purifiées appuie l'hypothèse de l'implication de la mitochondrie, puisque l'injection intracytoplasmique de mitochondries normales peut permettre de surmonter une dysfonction mitochondriale [138], de prévenir l'apoptose ovocytaire [127], et d'augmenter les taux de fécondation [139]. Du fait de l'existence de cellules souches ovocytaires (Oogonial Stem Cells OSC) dans les ovaires de souris adultes [140, 141], la technique AUGMENT (Autologous Germline Mitochondrial Energy Transfer) pourrait permettre de fournir une source d'extrait cytoplasmique ou de mitochondries purifiées à partir de ces cellules autologues. Etant donné leur relative quiescence, ces cellules souches seraient plus susceptibles d'être à l'abri des dommages mutationnels cumulatifs par rapport aux cellules somatiques.

Une autre approche enfin pour surmonter les déficits énergétiques dans l'ovocyte serait d'identifier de nouvelles entités biologiques et chimiques qui permettraient d'augmenter le nombre de mitochondries ou l'efficacité de production d'ATP dans les ovocytes. Les résultats en AMP pourraient ainsi bénéficier de l'utilisation de ces activateurs mitochondriaux [142].

Parmi les facteurs impliqués dans le vieillissement ovarien, notamment prématuré, nous pensons que la mitochondrie pourrait occuper une place centrale. L'étude de ce rôle est le défi que nous souhaitons relever.

## **6/ Annexes**

**ANNEXE 1 : Différents stades de l'ovogenèse**

*Différents stades de l'ovogenèse observés en microscopie optique*



Ovocyte en prophase I : 1. Noyau sous forme de vésicule germinative, 2. Zone pellucide, 3. Corona radiata

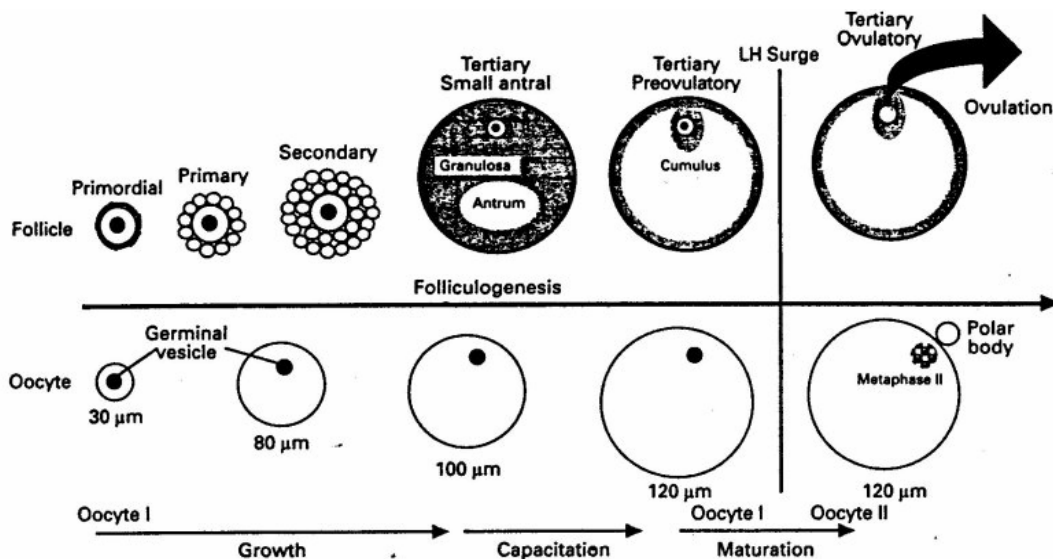


Ovocyte II : Présence du 1<sup>er</sup> globule polaire dans l'espace périvitellin



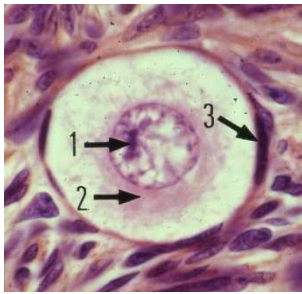
Ovocyte fécondé : 1. Présence des deux globules polaires dans l'espace périvitellin, 2. Pronoyaux mâle et femelle

*Représentation schématique de la croissance ovocytaire en fonction du stade de la folliculogénèse*

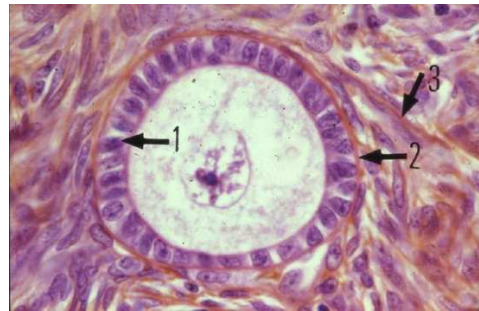


## **ANNEXE 2 : Différents stades de la folliculogénèse**

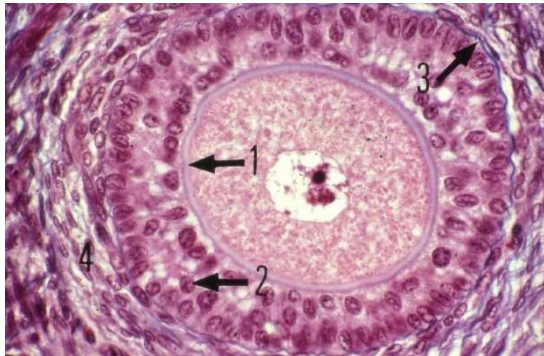
*Coupes histologiques d'ovaire de lapine, microscopie photonique, coloration HES (Rose)*



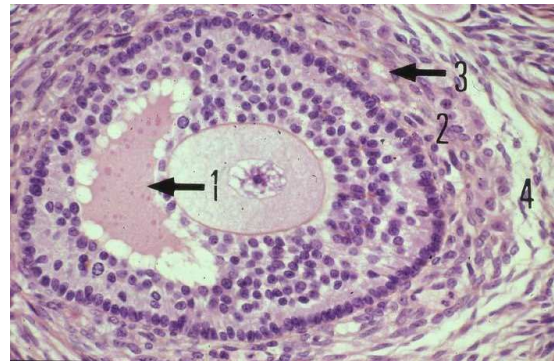
**Follicule primordial** : 1. Noyau d'un ovocyte d'ordre I (nucléole proéminent et fins amas chromatinien), 2. Cytoplasme, 3. Assise unique de cellules folliculeuses pavimenteuses



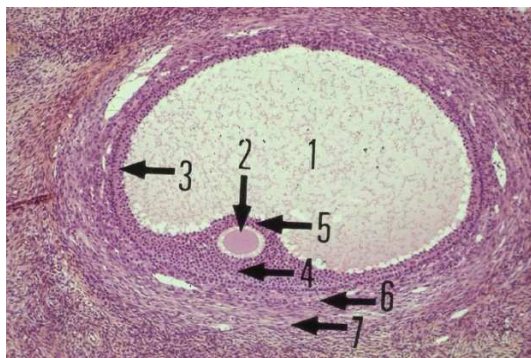
**Follicule primaire** : 1. Assise simple de cellules cubiques, 2. Membrane basale de Slavjanski, 3. Stroma ovarien



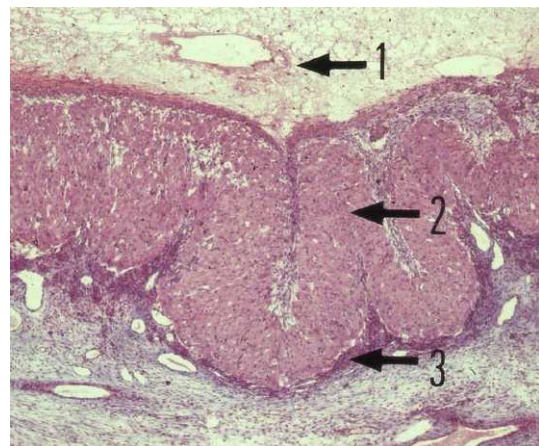
**Follicule secondaire** : 1. Zone pellucide, 2. Cellules folliculeuses formant deux à trois assises cellulaires, 3. Membrane de Slavia'sky, 4. Ebauche de la thèque interne



**Follicule cavitaire** : 1. Antrum, 2. Thèque interne, 3. Vaisseaux sanguins, 4. Thèque externe



**Follicule mûr de De Graaf** : 1. Antrum, 2. Ovocyte, 3. Granulosa, 4. Cumulus oophorus, 5. Corona radiata, 6. Thèque interne, 7. Thèque externe



**Corps jaune** : 1. Exsudat fibrineux coagulé, 2. Cellules endocrines lutéales, 3. Cellules paraluteales

# **7/ Bibliographie**

1. te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 141-154.
2. Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. 10.1210/er.2009-0006. *Endocr Rev* 2009; 30: 465-493.
3. Bancsi LF, Broekmans FJ, Eijkemans MJ, de Jong FH, Habbema JD, te Velde ER. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2002; 77: 328-336.
4. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste JM, Spira A. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod* 1991; 6: 811-816.
5. Schwartz D. [Epidemiology of human fertility]. *Rev Epidemiol Sante Publique* 1980; 28: 7-12.
6. Leridon H. Can assisted reproduction technology compensate for the natural decline in fertility with age? A model assessment. 10.1093/humrep/deh304. *Hum Reprod* 2004; 19: 1548-1553.
7. Navot D, Bergh PA, Williams M, Garrisi GJ, Guzman I, Sandler B, Fox J, Schreiner-Engel P, Hofmann GE, Grunfeld L. An insight into early reproductive processes through the in vivo model of ovum donation. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 408-414.
8. Gynecologists CoGPoACoOa, Medicine PCoASfR. Age-related fertility decline: a committee opinion. 10.1016/j.fertnstert.2008.08.130. *Fertil Steril* 2008; 90: S154-155.
9. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod* 1992; 7: 1342-1346.
10. Faddy MJ, Gosden RG. A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women. *Hum Reprod* 1996; 11: 1484-1486.
11. Wallace WH, Kelsey TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause. 10.1371/journal.pone.0008772. *PLoS One* 2010; 5: e8772.
12. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. 10.1146/annurev.genet.39.110304.095751. *Annu Rev Genet* 2005; 39: 359-407.
13. Goswami D, Conway GS. Premature ovarian failure. 10.1159/000102537. *Horm Res* 2007; 68: 196-202.
14. May-Panloup P, Chrétien MF, Malthiery Y, Reynier P. [Mitochondria and reproduction]. 10.1051/medsci/2004208-9779. *Med Sci (Paris)* 2004; 20: 779-783.
15. Miao YL, Kikuchi K, Sun QY, Schatten H. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. 10.1093/humupd/dmp014. *Hum Reprod Update* 2009; 15: 573-585.
16. Grondahl ML, Yding Andersen C, Bogstad J, Nielsen FC, Meinertz H, Borup R. Gene expression profiles of single human mature oocytes in relation to age. 10.1093/humrep/deq014. *Hum Reprod* 2010; 25: 957-968.



17. Hamatani T, Falco G, Carter MG, Akutsu H, Stagg CA, Sharov AA, Dudekula DB, VanBuren V, Ko MS. Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. 10.1093/hmg/ddh241. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 2263-2278.
18. Felici MD, Carlo AD, Pesce M, Iona S, Farrace MG, Piacentini M. Bcl-2 and Bax regulation of apoptosis in germ cells during prenatal oogenesis in the mouse embryo. *Cell Death Differ* 1999; 6: 908-915.
19. Dharma SJ, Kelkar RL, Nandedkar TD. Fas and Fas ligand protein and mRNA in normal and atretic mouse ovarian follicles. *Reproduction* 2003; 126: 783-789.
20. Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrindt R, Smits J. Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Rev Reprod* 2000; 5: 143-152.
21. Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier AC, Treier M. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. 10.1242/dev.00969. *Development* 2004; 131: 933-942.
22. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. 10.1126/science.296.5573.1655. *Science* 2002; 296: 1655-1657.
23. Depalo R, Nappi L, Loverro G, Bettocchi S, Caruso ML, Valentini AM, Selvaggi L. Evidence of apoptosis in human primordial and primary follicles. *Hum Reprod* 2003; 18: 2678-2682.
24. de Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Anti-Müllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 2002; 77: 357-362.
25. Broer SL, Mol BW, Hendriks D, Broekmans FJ. The role of antimüllerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. 10.1016/j.fertnstert.2007.12.013. *Fertil Steril* 2009; 91: 705-714.
26. Lie Fong S, Baart EB, Martini E, Schipper I, Visser JA, Themmen AP, de Jong FH, Fauser BJ, Laven JS. Anti-Müllerian hormone: a marker for oocyte quantity, oocyte quality and embryo quality? *Reprod Biomed Online* 2008; 16: 664-670.
27. Thibault Charles Levasseur M-C. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Edition Quae ed: Ellipses; Paris, 2001: 928.
28. Parinaud Jean, Bujan Louis. Formation des ovocytes et ovulation. [en ligne]. <http://www.chu-toulouse.fr/formation-des-ovocytes-et>, consulté le 19 mars 2013
29. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod* 1986; 1: 81-87.
30. Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. 10.1016/j.anireprosci.2004.05.017. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83: 431-446.
31. Diaz FJ, Wigglesworth K, Eppig JJ. Oocytes are required for the preantral granulosa cell to cumulus cell transition in mice. 10.1016/j.ydbio.2007.02.019. *Dev Biol* 2007; 305: 300-311.
32. Anderson E, Albertini DF. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J Cell Biol* 1976; 71: 680-686.
33. Unger VM, Kumar NM, Gilula NB, Yeager M. Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science* 1999; 283: 1176-1180.
34. Larsen WJ, Wert SE. Roles of cell junctions in gametogenesis and in early embryonic development. *Tissue Cell* 1988; 20: 809-848.

35. Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod* 1990; 43: 543-547.
36. Feldmann G, Benifla JL, Madelenat P. [Apoptosis of granulosa cells as a predictive marker of in vitro fertilization success?]. 10.1016/j.gyobfe.2006.04.012. *Gynecol Obstet Fertil* 2006; 34: 574-582.
37. Perreault SD, Barbee RR, Slott VL. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol* 1988; 125: 181-186.
38. Schabo Virginie, Assou Said, Anahory Tal, VOS John D, Dechaud Hervé, Hamamah Samir. Evaluation non invasive du potentiel embryonnaire par étude du profil d'expression génique des cellules du cumulus: nouveau regard sur le dialogue ovocyte-cumulus. Montrouge, FRANCE John Libbey Eurotext; 2009.
39. Feuerstein P, Cadoret V, Dalbies-Tran R, Guérif F, Royère D. [Oocyte-cumulus dialog]. 10.1016/j.gyobfe.2006.07.023. *Gynecol Obstet Fertil* 2006; 34: 793-800.
40. Feuerstein P, Puard V, Chevalier C, Teusan R, Cadoret V, Guerif F, Houlgatte R, Royere D. Genomic assessment of human cumulus cell marker genes as predictors of oocyte developmental competence: impact of various experimental factors. 10.1371/journal.pone.0040449. *PLoS One* 2012; 7: e40449.
41. Hutt KJ, McLaughlin EA, Holland MK. Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. 10.1093/molehr/gal010. *Mol Hum Reprod* 2006; 12: 61-69.
42. Soyal SM, Amleh A, Dean J. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development* 2000; 127: 4645-4654.
43. Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. 10.1086/422103. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 106-111.
44. Hussein TS, Froiland DA, Amato F, Thompson JG, Gilchrist RB. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. 10.1242/jcs.02644. *J Cell Sci* 2005; 118: 5257-5268.
45. Skiadas CC, Duan S, Correll M, Rubio R, Karaca N, Ginsburg ES, Quackenbush J, Racowsky C. Ovarian reserve status in young women is associated with altered gene expression in membrana granulosa cells. 10.1093/molehr/gas008. *Mol Hum Reprod* 2012; 18: 362-371.
46. May-Panloup P, Ferré-L'Hôtellier V, Morinière C, Marcaillou C, Lemerle S, Coutolleau A, Reynier P, Descamps P, Guardiola P. [Molecular characterization of corona radiata cells from patients with diminished ovarian reserve]. 10.1016/j.gyobfe.2012.07.018. *Gynecol Obstet Fertil* 2012; 40: 500-506.
47. Assou S, Anahory T, Pantesco V, Le Carrour T, Pellestor F, Klein B, Reyftmann L, Dechaud H, De Vos J, Hamamah S. The human cumulus--oocyte complex gene-expression profile. 10.1093/humrep/del065. *Hum Reprod* 2006; 21: 1705-1719.
48. Cillo F, Brevini TA, Antonini S, Paffoni A, Ragni G, Gandolfi F. Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. 10.1530/REP-07-0182. *Reproduction* 2007; 134: 645-650.

49. McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, Kovanci E, Cisneros P, Buster JE, Amato P, Matzuk MM. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. 10.1093/humrep/deh535. *Hum Reprod* 2004; 19: 2869-2874.
50. Adriaenssens T, Wathlet S, Segers I, Verheyen G, De Vos A, Van der Elst J, Coucke W, Devroey P, Smits J. Cumulus cell gene expression is associated with oocyte developmental quality and influenced by patient and treatment characteristics. *Hum Reprod*; 25: 1259-1270.
51. Wathlet S, Adriaenssens T, Segers I, Verheyen G, Van de Velde H, Coucke W, Ron El R, Devroey P, Smits J. Cumulus cell gene expression predicts better cleavage-stage embryo or blastocyst development and pregnancy for ICSI patients. 10.1093/humrep/der036. *Hum Reprod* 2011; 26: 1035-1051.
52. Assou S, Haouzi D, Mahmoud K, Aouacheria A, Guillemin Y, Pantesco V, R me T, Dechaud H, De Vos J, Hamamah S. A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study. 10.1093/molehr/gan067. *Mol Hum Reprod* 2008; 14: 711-719.
53. Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH, Kim WW. Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18: 490-498.
54. Seli E, Vergouw CG, Morita H, Botros L, Roos P, Lambalk CB, Yamashita N, Kato O, Sakkas D. Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. 10.1016/j.fertnstert.2009.03.078. *Fertil Steril* 2010; 94: 535-542.
55. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril* 2001; 76: 1175-1180.
56. Katz-Jaffe MG, Schoolcraft WB, Gardner DK. Analysis of protein expression (secretome) by human and mouse preimplantation embryos. 10.1016/j.fertnstert.2006.05.022. *Fertil Steril* 2006; 86: 678-685.
57. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 1961; 191: 144-148.
58. Johnson DC, Dean DR, Smith AD, Johnson MK. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133518. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 247-281.
59. Tong WH, Rouault TA. Functions of mitochondrial ISCU and cytosolic ISCU in mammalian iron-sulfur cluster biogenesis and iron homeostasis. 10.1016/j.cmet.2006.02.003. *Cell Metab* 2006; 3: 199-210.
60. Ernster L, Schatz G. Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol* 1981; 91: 227s-255s.
61. Jakobs S. High resolution imaging of live mitochondria. 10.1016/j.bbamcr.2006.04.004. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1763: 561-575.
62. Liesa M, Palac n M, Zorzano A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. 10.1152/physrev.00030.2008. *Physiol Rev* 2009; 89: 799-845.

63. Abcam. Mitochondrial dynamics, mitophagy and autophagy [en ligne]. <http://docs.abcam.com/pdf/metabolism/Mitochondrial-dynamics-Mitophagy-and-Autophagy.pdf>, consulté le 7 septembre 2013.
64. Chen H, Chomyn A, Chan DC. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. 10.1074/jbc.M503062200. *J Biol Chem* 2005; 280: 26185-26192.
65. Elachouri G, Vidoni S, Zanna C, Pattyn A, Boukhaddaoui H, Gaget K, Yu-Wai-Man P, Gasparre G, Sarzi E, Delettre C, Olichon A, Loiseau D, Reynier P, Chinnery PF, Rotig A, Carelli V, Hamel CP, Rugolo M, Lenaers G. OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution. 10.1101/gr.108696.110. *Genome Res* 2011; 21: 12-20.
66. Bohnert M, Pfanner N, van der Laan M. A dynamic machinery for import of mitochondrial precursor proteins. 10.1016/j.febslet.2007.03.004. *FEBS Lett* 2007; 581: 2802-2810.
67. Ott C, Ross K, Straub S, Thiede B, Gäßler M, Goosmann C, Krischke M, Mueller MJ, Krohne G, Rudel T, Kozjak-Pavlovic V. Sam50 functions in mitochondrial intermembrane space bridging and biogenesis of respiratory complexes. 10.1128/MCB.06388-11. *Mol Cell Biol* 2012; 32: 1173-1188.
68. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290: 457-465.
69. Clayton D. DNA Replication in Eukaryotic cells. Cold Spring Harbor Laboratory Press; New York. 1996. Chap 39. Mitochondrial DNA Replication. p 1015-1027.
70. Campbell CT, Kolesar JE, Kaufman BA. Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number. 10.1016/j.bbtagrm.2012.03.002. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1819: 921-929.
71. Lescuyer P. Etude de l'expression des gènes nucléaires codant pour les sous-unités du complexe 1 mitochondrial humain. 25 octobre 2002. 159 pages. Thèse de doctorat : Science. Université Joseph Fourier, Grenoble n°00175098.
72. Cummins J. Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. *Rev Reprod* 1998; 3: 172-182.
73. Le Penne S. Voies de régulation de la fonction mitochondriale dans les modèles de tumeurs thyroïdiennes. 15 juin 2010. 265 pages. Thèse de doctorat : sciences. Université d'Angers, n°1046.
74. Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev* 2004; 18: 357-368.
75. Huo L, Scarpulla RC. Mitochondrial DNA instability and peri-implantation lethality associated with targeted disruption of nuclear respiratory factor 1 in mice. 10.1128/MCB.21.2.644-654.2001. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 644-654.
76. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 1999; 98: 115-124.
77. Lin J, Puigserver P, Donovan J, Tarr P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem* 2002; 277: 1645-1648.

78. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. 10.1016/j.cell.2006.09.024. *Cell* 2006; 127: 397-408.
79. Kawamura Y, Uchijima Y, Horike N, Tonami K, Nishiyama K, Amano T, Asano T, Kurihara Y, Kurihara H. Sirt3 protects in vitro-fertilized mouse preimplantation embryos against oxidative stress-induced p53-mediated developmental arrest. 10.1172/JCI42020. *J Clin Invest* 2010; 120: 2817-2828.
80. Lombès A. Mitochondries : Physiologie, méthodes d'études, exemples d'altérations génétiques impliquant le foie. [en ligne].  
<http://www.afef.asso.fr/Data/upload/files/Cours/Mitochondries.pdf>, consulté le 25 avril 2013.
81. Poulton J, Macaulay V, Marchington DR. Mitochondrial genetics. Is the bottleneck cracked? *Am J Hum Genet* 1998; 62: 752-757.
82. Jansen RP, de Boer K. The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 145: 81-88.
83. Wai T, Teoli D, Shoubridge EA. The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. 10.1038/ng.258. *Nat Genet* 2008; 40: 1484-1488.
84. Reynier P, May-Panloup P, Chrétien MF, Morgan CJ, Jean M, Savagner F, Barrière P, Malthiéry Y. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 425-429.
85. Motta PM, Nottola SA, Makabe S, Heyn R. Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Hum Reprod* 2000; 15 Suppl 2: 129-147.
86. Van Blerkom J, Davis P. Mitochondrial signaling and fertilization. 10.1093/molehr/gam068. *Mol Hum Reprod* 2007; 13: 759-770.
87. Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonsalves PB, Wolf E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod* 2001; 64: 904-909.
88. Van Blerkom J, Davis PW, Lee J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 1995; 10: 415-424.
89. Thompson WE, Ramalho-Santos J, Sutovsky P. Ubiquitination of prohibitin in mammalian sperm mitochondria: possible roles in the regulation of mitochondrial inheritance and sperm quality control. 10.1095/biolreprod.102.010975. *Biol Reprod* 2003; 69: 254-260.
90. Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7: 659-668.
91. Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, Obinu D, Savontaus ML, Wallace DC. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* 1996; 144: 1835-1850.
92. Piko L, Taylor KD. Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. *Dev Biol* 1987; 123: 364-374.

93. Ebert KM, Liem H, Hecht NB. Mitochondrial DNA in the mouse preimplantation embryo. *J Reprod Fertil* 1988; 82: 145-149.
94. Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, Clayton DA. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. 10.1038/ng0398-231. *Nat Genet* 1998; 18: 231-236.
95. Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. 10.1093/humupd/dmi001. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 162-177.
96. Ratts VS, Flaws JA, Kolp R, Sorenson CM, Tilly JL. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology* 1995; 136: 3665-3668.
97. Hsu SY, Lai RJ, Finegold M, Hsueh AJ. Targeted overexpression of Bcl-2 in ovaries of transgenic mice leads to decreased follicle apoptosis, enhanced folliculogenesis, and increased germ cell tumorigenesis. *Endocrinology* 1996; 137: 4837-4843.
98. Perez GI, Robles R, Knudson CM, Flaws JA, Korsmeyer SJ, Tilly JL. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. 10.1038/5985. *Nat Genet* 1999; 21: 200-203.
99. Kugu K, Ratts VS, Piquette GN, Tilly KI, Tao XJ, Martimbeau S, Aberdeen GW, Krajewski S, Reed JC, Pepe GJ, Albrecht ED, Tilly JL. Analysis of apoptosis and expression of bcl-2 gene family members in the human and baboon ovary. 10.1038/sj.cdd.4400316. *Cell Death Differ* 1998; 5: 67-76.
100. Stocco DM, Hutson JC. Quantitation of mitochondrial DNA and protein in the liver of Fischer 344 rats during aging. *J Gerontol* 1978; 33: 802-809.
101. Short KR, Bigelow ML, Kahl J, Singh R, Coenen-Schimke J, Raghavakaimal S, Nair KS. Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 5618-5623.
102. Van Blerkom J, Sinclair J, Davis P. Mitochondrial transfer between oocytes: potential applications of mitochondrial donation and the issue of heteroplasmy. *Hum Reprod* 1998; 13: 2857-2868.
103. Müller-Hocker J, Schafer S, Weis S, Manscher C, Strowitzki T. Morphological-cytochemical and molecular genetic analyses of mitochondria in isolated human oocytes in the reproductive age. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 951-958.
104. Letellier T, Heinrich R, Malgat M, Mazat JP. The kinetic basis of threshold effects observed in mitochondrial diseases: a systemic approach. *Biochem J* 1994; 302 ( Pt 1): 171-174.
105. Lee HC, Wei YH. Mitochondrial alterations, cellular response to oxidative stress and defective degradation of proteins in aging. *Biogerontology* 2001; 2: 231-244.
106. Kitagawa T, Sukanuma N, Nawa A, Kikkawa F, Tanaka M, Ozawa T, Tomoda Y. Rapid accumulation of deleted mitochondrial deoxyribonucleic acid in postmenopausal ovaries. *Biol Reprod* 1993; 49: 730-736.
107. Keefe DL, Niven-Fairchild T, Powell S, Buradagunta S. Mitochondrial deoxyribonucleic acid deletions in oocytes and reproductive aging in women. *Fertil Steril* 1995; 64: 577-583.
108. Brenner CA, Wolny YM, Barritt JA, Matt DW, Munné S, Cohen J. Mitochondrial DNA deletion in human oocytes and embryos. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 887-892.

109. Hsieh RH, Tsai NM, Au HK, Chang SJ, Wei YH, Tzeng CR. Multiple rearrangements of mitochondrial DNA in unfertilized human oocytes. *Fertil Steril* 2002; 77: 1012-1017.
110. Perez GI, Tilly JL. Cumulus cells are required for the increased apoptotic potential in oocytes of aged mice. *Hum Reprod* 1997; 12: 2781-2783.
111. Tatone C, Carbone MC, Falone S, Aimola P, Giardinelli A, Caserta D, Marci R, Pandolfi A, Ragnelli AM, Amicarelli F. Age-dependent changes in the expression of superoxide dismutases and catalase are associated with ultrastructural modifications in human granulosa cells. 10.1093/molehr/gal080. *Mol Hum Reprod* 2006; 12: 655-660.
112. Matos L, Stevenson D, Gomes F, Silva-Carvalho JL, Almeida H. Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells. 10.1093/molehr/gap034. *Mol Hum Reprod* 2009; 15: 411-419.
113. Ahlqvist KJ, Hamalainen RH, Yatsuga S, Uutela M, Terzioglu M, Gotz A, Forsstrom S, Salven P, Angers-Loustau A, Kopra OH, Tyynismaa H, Larsson NG, Wartiovaara K, Prolla T, Trifunovic A, Suomalainen A. Somatic progenitor cell vulnerability to mitochondrial DNA mutagenesis underlies progeroid phenotypes in Polg mutator mice. 10.1016/j.cmet.2011.11.012. *Cell Metab* 2012; 15: 100-109.
114. Tyynismaa H, Mjosund KP, Wanrooij S, Lappalainen I, Ylikallio E, Jalanko A, Spelbrink JN, Paetau A, Suomalainen A. Mutant mitochondrial helicase Twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice. 10.1073/pnas.0505551102. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 17687-17692.
115. Andziak B, O'Connor TP, Qi W, DeWaal EM, Pierce A, Chaudhuri AR, Van Remmen H, Buffenstein R. High oxidative damage levels in the longest-living rodent, the naked mole-rat. 10.1111/j.1474-9726.2006.00237.x. *Aging Cell* 2006; 5: 463-471.
116. Mockett RJ, Radyuk SN, Benes JJ, Orr WC, Sohal RS. Phenotypic effects of familial amyotrophic lateral sclerosis mutant Sod alleles in transgenic *Drosophila*. 10.1073/pnas.0136976100. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 301-306.
117. Weitzel JM, Iwen KA, Seitz HJ. Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Exp Physiol* 2003; 88: 121-128.
118. Chen JQ, Cammarata PR, Baines CP, Yager JD. Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793: 1540-1570.
119. Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Géloën A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. 10.1038/nature01298. *Nature* 2003; 421: 182-187.
120. Bonawitz ND, Chatenay-Lapointe M, Pan Y, Shadel GS. Reduced TOR signaling extends chronological life span via increased respiration and upregulation of mitochondrial gene expression. 10.1016/j.cmet.2007.02.009. *Cell Metab* 2007; 5: 265-277.
121. Radak Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H, Atalay M. Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. 10.1089/ars.2011.4498. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18: 1208-1246.
122. Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. 10.1126/science.1117728. *Science* 2005; 310: 314-317.

123. Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R, Sinclair DA. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. 10.1126/science.1099196. *Science* 2004; 305: 390-392.
124. Crane JD, Devries MC, Safdar A, Hamadeh MJ, Tarnopolsky MA. The effect of aging on human skeletal muscle mitochondrial and intramyocellular lipid ultrastructure. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*; 65: 119-128.
125. Santos TA, El Shourbagy S, St John JC. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. 10.1016/j.fertnstert.2005.09.017. *Fertil Steril* 2006; 85: 584-591.
126. May-Panloup P, Chrétien MF, Jacques C, Vasseur C, Malthiery Y, Reynier P. Low oocyte mitochondrial DNA content in ovarian insufficiency. 10.1093/humrep/deh667. *Hum Reprod* 2005; 20: 593-597.
127. Perez GI, Trbovich AM, Gosden RG, Tilly JL. Mitochondria and the death of oocytes. 10.1038/35000651. *Nature* 2000; 403: 500-501.
128. Tilly JL. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. 10.1038/35099086. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 838-848.
129. Tingen C, Kim A, Woodruff TK. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. 10.1093/molehr/gap073. *Mol Hum Reprod* 2009; 15: 795-803.
130. Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. 10.1093/humupd/dmm040. *Hum Reprod Update* 2008; 14: 159-177.
131. Piko L., Taylor KD. Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. Kidlington, ROYAUME-UNI Elsevier; 1987.
132. McReynolds S, Dzieciatkowska M, McCallie BR, Mitchell SD, Stevens J, Hansen K, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Impact of maternal aging on the molecular signature of human cumulus cells. *Fertil Steril*; 98: 1574-1580 e1575.
133. Tsai HD, Hsieh YY, Hsieh JN, Chang CC, Yang CY, Yang JG, Cheng WL, Tsai FJ, Liu CS. Mitochondria DNA deletion and copy numbers of cumulus cells associated with in vitro fertilization outcomes. *J Reprod Med* 2010; 55: 491-497.
134. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 11: 298-300.
135. Harman D. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc* 1972; 20: 145-147.
136. Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet* 1989; 1: 642-645.
137. Cummins JM. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 115 Suppl 1: S23-29.
138. Nagai S, Mabuchi T, Hirata S, Shoda T, Kasai T, Yokota S, Shitara H, Yonekawa H, Hoshi K. Oocyte mitochondria: strategies to improve embryogenesis. *Hum Cell* 2004; 17: 195-201.
139. El Shourbagy SH, Spikings EC, Freitas M, St John JC. Mitochondria directly influence fertilisation outcome in the pig. 10.1530/rep.1.00551. *Reproduction* 2006; 131: 233-245.
140. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. 10.1038/nature02316. *Nature* 2004; 428: 145-150.



141. White YA, Woods DC, Takai Y, Ishihara O, Seki H, Tilly JL. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. 10.1038/nm.2669. *Nat Med* 2012; 18: 413-421.
142. Bentov Y, Esfandiari N, Burstein E, Casper RF. The use of mitochondrial nutrients to improve the outcome of infertility treatment in older patients. *Fertil Steril*; 93: 272-275.