



HAL
open science

Génomique fonctionnelle de cellules ovariennes chez les vertébrés

Svetlana Uzbekova

► **To cite this version:**

Svetlana Uzbekova. Génomique fonctionnelle de cellules ovariennes chez les vertébrés. Biologie de la reproduction. Université de Tours (UT), Tours, FRA, 2009. tel-03362805

HAL Id: tel-03362805

<https://hal.inrae.fr/tel-03362805>

Submitted on 2 Oct 2021

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

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

HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Discipline : Sciences de la Vie
Présentée et soutenue publiquement par :

Svetlana UZBEKOVA

Le 4 Juin 2009

Génomique fonctionnelle de cellules ovariennes chez les vertébrés

JURY :

ROYERE Dominique
DONNAY Isabelle
HUMBLOT Patrice
CHESNEL Franck
FOSTIER Alexis
MERMILLOD Pascal

Professeur à l'Université de Tours
Professeur à l'Université de Louvain, Belgique
Directeur de Recherche UNCEIA, Paris
Chargé de Recherche 1 (HDR) CNRS, Rennes
Directeur de Recherche, INRA, Rennes
Ingénieur de Recherche (HDR), INRA, Tours

REMERCIEMENTS

Si je peux soutenir aujourd'hui en vue d'obtenir mon premier diplôme français et m'épanouir dans le métier de la Recherche en science de la Vie, c'est grâce à de nombreuses personnes qui m'ont appris à naviguer dans ce monde. Je remercie tous ceux, qui m'ont fait confiance et accueilli dans leurs équipes, avec qui j'ai partagé la paillasse et les idées, qui m'ont transmis le meilleur de leurs savoirs faire et aussi l'idée qu'il vaut mieux collaborer que concurrencer. Issue des laboratoires universitaires et académiques de Saint-Petersbourg et de Moscou, j'ai évolué dans un esprit de libres échanges des idées, de l'entraide et de l'amitié dans les projets communs. J'étais heureuse de retrouver en France cette ambiance dans le travail comme dans la vie en dehors du laboratoire.

Merci à Monsieur Bernard Breton, qui m'a fait venir en France et qui m'a confié le projet passionnant et fait découvrir le globe via les nombreux congrès internationaux. Merci à Patrick Prunet, qui m'as également donné entière confiance et intégrée au réseau de chercheurs qui me sert toujours. Merci à tous les gens que j'ai rencontré au SCRIBE et à l'Université de Rennes durant presque 7 années passées dans ce joli labo-aquarium, qui m'ont appris à parler français, à aimer les vins et les poissons (comme modèle expérimental également) et qui m'ont beaucoup aidé d'une façon ou d'une autre, aussi bien dans mes recherches que dans la vie quotidienne car tout était à découvrir. Merci mes amis !

Enrichie par cette expérience et par le changement des modèles biologiques, de la langue et du mode de travail, mon arrivée à Nouzilly pour travailler sur les vaches et les porcs s'est fait tout naturellement, car "les gènes sont toujours les gènes, peu importe les espèces" (B.Breton) et je rajouterai "les gens sont toujours les gens peu importe où ils sont". Je remercie alors tous ceux qui m'ont fait découvrir le nouveau monde – une Station au milieu des champs et l'ovocyte de mammifère comme modèle, ma passion d'aujourd'hui.

Merci à Pascal Mermillod d'abord, un chef d'équipe enthousiaste et gentil, qui m'a toujours accordé sa confiance en me faisant participer dans ces projets de recherches, dans l'enseignement à l'université, dans les projets de recherches transversales, dans les comités de toutes sortes. Merci Christine, j'ai énormément appris de tes mains; ton aide et ta gentillesse est tellement précieuse. Merci Danielle Monniaux pour tes précieux conseils et ta disponibilité. Merci Gaël, Thierry et Pascal pour le courage avec lequel vous partez chaque semaine en route pour nos expériences, et particulier à Pascal Papillier qui assure en grande partie mes expériences en biomol. Merci Rozenn Dalbies-Tran et Philippe Monget pour que vous acceptiez mon travail dans vos projets, pour les discussions, correction de mes articles et vos critiques sans quoi les recherches n'avanceraient pas. Joëlle, merci pour ton enthousiasme, ton investissement et ta confiance dans nos projets communs.

Mes remerciements particuliers à Valérie Labas et Jean-Louis Dacheux, qui m'ont fait découvrir le royaume passionnant de la protéomique. Merci, Valérie, pour ton enthousiasme de tenter les choses nouvelles et pour ton efficacité ; par ta bonne humeur tu me fais oublier les heures qu'on passe aux manipes et aux traitements des données pour voir les résultats inédits ! Ton aide à la rédaction de ce manuscrit m'a été très précieuse.

Merci à tant d'autres gens de la PRC que j'apprécie. Merci à tous les étudiants et post-docs que je considère toujours comme des collaborateurs, qui m'ont apporté beaucoup et qui m'ont été reconnaissant pour peu de choses même. J'espère que ce que je leur ai transmis leur sera utile.

Merci à Isabelle Donnay, Patrice Humblot, Franck Chesnel, Alex Fostier et Dominique Royère pour avoir accepté de faire partie du jury.

Ce chapitre des remerciements ne serait pas complet si je ne remerciais pas mon mari Rustem et mes filles, qui m'ont toujours soutenu dans les moments difficiles et m'ont toujours aidé. J'espère qu'ils seront aussi fiers de moi que je le suis d'eux.

MERCI ! СПАСИБО ВСЕМ !

SOMMAIRE

Liste de abréviations	4
Curriculum vitae	5
Liste des activités d'encadrement.....	7
Participation à des contrats de recherche.....	8
Liste des productions scientifiques.....	9
Présentation de l'activité scientifique	13
Avant-propos	
A. Contexte et problématique scientifique	15
Introduction.	
1. Régulation centrale de l'ovogenèse.....	15
2. Maturation ovocytaire et acquisition de la compétence au développement.....	16
2.1. Maturation méiotique et différenciation de cellules de cumulus au cours de ce processus.....	18
2.2. Maturation cytoplasmiques de l'ovocyte.....	22
2.2.1 Régulation de la polyadénylation et de la traduction pendant la maturation de l'ovocyte.....	23
2.2.2. Modifications du contenu protéique de l'ovocyte pendant la maturation	25
B. Bilan d'activité de recherches	27
<i>TRAVAUX ANTERIEURS</i>	
1. Caractérisation des lignées de poissons transgéniques exprimant l'ARN GnRH-antisens ..	27
2. Expression des gènes codant pour les peptides apparentés au GnRH et leur récepteurs dans les gonades de truite arc-en ciel.	29
<i>PROJETS DE RECHERCHE ACTUELS.</i>	
1. Dialogue ovocyte cumulus	30
1.1. Compétence au développement in vitro de COC vs DO	
1.2. Comparaison COC et DO par les approches de génomique fonctionnelle.	
1.3. Analyse de l'expression génique dans les cellules de cumulus au cours de la maturation : modèles in vitro et in vivo.....	34
2. Régulation méiotique de l'ovocyte	35
2.1. Etude de gènes - candidats préférentiellement exprimés dans l'ovocyte.	
2.2. Protéines et voies de signalisations impliquées dans la maturation ovocytaire	
2.2.1. Aurora kinases chez le bovin (article 5).....	37
2.2.2. Expression de régulateurs de la méiose (CPEB, CCNB1, MOS, CDK1) dans l'ovocyte bovin au cours de la MIV.	
2.2.3. GSK3 et son rôle dans la maturation ovocytaire.....	42
2.2.4. AMP-activated Protein Kinase dans la maturation ovocytaire	
3. Régulation post-transcriptionnelle : approches protéomiques appliqués à cellules folliculaires	
3.1. Protéome de l'ovocyte.....	47
3.2. Approche protéomique sur des cellules entières (ovocyte et cellules de cumulus)	49
3.3. ICM-MS de cellules de cumulus.....	52
3.3 Identification des biomarqueurs.....	53
C. Perspectives	56
Recherches cognitives : qualité de l'ovocyte	56
1. Dialogue ovocyte - cumulus.	
2. Régulation méiotique de l'ovocyte	
3. Fonction ovarienne et métabolisme énergétique	
Recherches appliquées – identification de biomarqueurs de la qualité de l'ovocyte	60
Références citées	66
Annexes (articles)	

Liste de abréviations

Symbole	Description
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 alis PKB
AMH	anti-Mullerian hormone
AMP	adenosine monophosphate
AMPc	adenosine monophosphate cyclique
AMPK	5'-AMP activated protéine kinase
AURKA	Aurora-A, alias Serine-threonine kinase 6
BAX	BCL2-associated X protein
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
BMP15	bone morphogenetic protein 15
CCNB1	cyclin B1
CDC2	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M, alias CDK1
CDK1	cyclin dependent kinase 1 alis CDC2
COC	cumulus-oocyte complex
COX2	cyclooxygenase-II
CPE	cytoplasmic polyadenylation element
CPEB	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1
CSF	cytostatic factor
DO	ovocytes dénudés
EDEN	embryo deadenylation element
EGF	epidermal growth factor
ERK1/2	extra-cellular regulated kinase 1/2 alias MAPK3/1
FGF	fibroblast growth factor
FSH	follicle stimulating hormone
GDF9	growth differentiation factor 9
GLUT1/GLUT4	glucose transporter -1, -4
GnRH	gonadotropin-releasing hormone alias LHRH
GP	globule polaire
GSH	glutathion
GSI	index somato-gonadique (poids de gonages/poids du corps)
GSK3	glycogen synthase kinase 3
GVBD	germinal vesicle break down
ICM-MS	Intact cell MALDI-TOF mass spectrometry
IGF-1	insulin-like growth factor 1
KISS1	KISS-1 metastasis-suppressor
LH	luteinizing hormone
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
MAPK1/3	mitogen-activated protein kinase -1, -3 alias ERK2, 1
MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14 alias P38
MAS	meiosis activation sterol
MATER	maternal antigen that embryo required
MEM	Muscle-Embryon-Mammary gland ADNc macroarray
MIV	maturation in vitro
MOS	moloney sarcoma oncogen alias <i>cmos</i>
MTOC	microtubule organising center
mTOR	mammalian target of rapamycin
OOSP1	oocyte-secreted protein
OPU	ovum pick up
PI3K	phosphatidyl inositol 3' kinase
PKA/PKB/PKC	protéine kinase -A, -B, C
PP1/PP2A	protéine phosphatase -1, -2A
RPS6	protéine ribosomale S6
RT-PCR	reverse transcription - polymerase chain reaction
STAR	steroidogenic acute regulatory protein
TGFB	transforming growth factor, beta
VG	vesicule germinale
ZAR1	zygote arrest 1
ZP	zona pellucida

Curriculum vitae

UZBEKOVA (née Opalikhina) **Svetlana**

Née le 13 Décembre 1964 à Tcheliabinsk (Russie)

9 rue Jean Moulin

37540 Saint-Cyr-sur Loire

Chargé de Recherche 1ère classe INRA
Unité de Physiologie de la
Reproduction et des Comportements,
UMR6175 INRA-CNRS-Université de Tours
37380 Nouzilly
Tel: 02 47 42 79 51 Fax: 02 47 42 77 43
e-mail Svetlana.Uzbekova@tours.inra.fr

Formation et diplômes acquis

1982-1987 Faculté de Biologie à l'Université de Saint-Petersbourg (alias Leningrad), Russie

Diplôme d'étude de l'Université d'état de St.Petersbourg (L.G.U.)

Spécialité: *Génétique des microorganismes*

Obtenu le 02 Juillet 1987 à Leningrad avec la mention *Très bien*

Titre du mémoire: "Effets biologiques de l'irradiation par UV-B chez *Chlamydomonas reinhardtii*".

Directeur: Dr. Chunaev A.

1989-1992 Stage de thèse à l'Institut National de Recherche Scientifique en Biotechnologie

Agricole de l'Académie des Sciences Agronomiques de Russie (Moscou, Russie)

Doctorat de l'Institut National de Recherche Scientifique en Biotechnologie

Agricole

Spécialité: *Biologie Moléculaire*

Soutenu devant le Conseil Scientifique de l'Institut National de Recherche Scientifique en Biotechnologie Agricole le 23 Mars 1994 à Moscou, Russie

Titre de thèse: "Obtention et analyse des plantes transgéniques exprimant des protéines - insecticides". Directeur: Prof. Shemiakin M.

Expérience professionnelle

1993-1994 Chercheur au laboratoire de génie génétique à l'Institut Nationale de Recherche Scientifique en Biotechnologie Agricole (Moscou, Russie)

1995-1996 Post-doctorante au laboratoire de Physiologie des Poissons (INRA) à Rennes, France
Equipe "Sexualité et Reproduction des Poissons".

Sujet: "Analyse fonctionnelle de séquences promotrices de poissons par transgénèse chez la truite arc-en-ciel" (projet Européen, Responsable scientifique : B.Breton)

1997- Avril 1998 Chercheur au laboratoire de génie génétique à l'Institut National de Recherche Scientifique en Biotechnologie Agricole (Moscou, Russie)

1998-2002 Chercheur contractuel au S.C.R.I.B.E. INRA à Rennes, France

Sujets: (jusqu'à Nov. 2001): "Mise au point d'un modèle de poisson stérile par transgénèse" (projet Européen) et "Expression de GnRH dans les gonades de truite". (Responsable scientifique : B.Breton)

(2001-2002) Sujet: Identification des gènes impliqués dans la réponse au stress et études de la génomique fonctionnelle du stress chez la truite (Contrat Européen "Stressgenes", coordinateur du projet - P.Prunet)

Décembre 2002 - Chargé de Recherches 2^{ème} classe INRA (PRC-Nouzilly).

Responsables P. Mermillod et P. Monget. Profile du recrutement : « Etude de la fonction physiologique des gènes ovocytaires par une approche de génomique fonctionnelle et par transgénèse chez les animaux domestiques »

Depuis 2006 - Chargé de Recherches 1^{ère} classe INRA, Equipe "Follicule, Ovocyte et Développement"

Formations complémentaires :

- Stage - atelier "Initiation à la technologie des puces à ADN", INSERM, Nantes 23-25 Octobre 2001
- Stage école - chercheur "Cultures cellulaires" ENSA / INRA Rennes, Janvier 2002
- Formations SIGENAE, Mars 2003, Novembre 2003, 2007
- Traitement statistique des petits échantillons 6-8 Octobre 2004
- Expérimentation Animale niveaux 1, Tours 28/03 -8 /04 2005
- Statistique des données transcriptomique "R" 2008
- Ecole – chercheurs "Protéomique: stratégie et aspects pratiques de la préparation à l'identification des protéines" Bois d'Amont 19-23 Mars 2007
- "Protéomique: stratégie et aspects pratiques de la préparation à l'identification des protéines" - Cours et ateliers pratiques. Nantes, 24-28 novembre 2008

Production scientifique (liste complète – page 8)

- 33 articles scientifiques dans les revues à comité de lecture
- plus de 25 communications dans les congrès et colloques (orales et par affiche)
- plusieurs documents d'animation, d'évaluation et d'encadrement de la recherche

Participation à la vie collective :

- Membre du Comité thématique porc AGENAE
- Membre du groupe "Communication" de la Station PRC
- Membre du Comité de thèse de Sophie Penner, Aurore Thélie, Barbara Schmaltz-Panneau, Maya Hajhassan
- Encadrement et formation de stagiaires et techniciens
- Expertise pour plusieurs revues scientifiques internationales (Reproduction, Fertility and Sterility, BMC Developmental Biology, FEBS, Animal Reproduction Science, Theriogenology)
- Membre de "Editorial Advisory Board" de revue scientifique "Animal Reproduction Science"

Participation à l'enseignement :

2005-2007 Cours « Transgénèse animale et clonage » dans le cadre de Master Sciences de la Vie et de la Santé spécialité « Biologie de la reproduction » à l'Université de Tours (4h).

Liste des activités d'encadrement

Etudiants en thèse:

- Mohamad Salhab (2007-...) – encadrement (Université François Rabelais de Tours, directeur de thèse - P.Mermillod). *Effet du micro-environnement somatique de l'ovocyte en fin de différenciation folliculaire sur sa compétence au développement. Apports du modèle vaches laitières.* Publications communs: (ref. 1, 34 dans la liste de publications)
- Barbara Schmaltz-Panneau (2006-...) –formation et co-encadrement (Université François Rabelais de Tours, directeur de thèse - P.Mermillod). *Reproduction assistée chez les Cervidés: rôle de l'environnement maternel dans le développement embryonnaire précoce* Publications communs: ref. 35 + papier soumis
- Aurore Thélie (soutenue Dec 2008, Université François Rabelais de Tours, responsable scientifique – R.Dalbies-Tran) - formation et collaboration. Sujet : "Gènes exprimés préférentiellement dans l'ovocyte bovin: expression et fonction". Publications communs: ref. 2, 4, 5, 6, 9, 10, 35, 37, 38, 39, 40, 42 dans la liste de publications
- Lucie Tosca (soutenue 2007, Université François Rabelais de Tours, directeur de thèse – J. Dupont) – formation et collaboration. Titre de la thèse: *Rôle de la 5'AMP-activated protein kinase (AMPK) dans le fonctionnement ovarien chez différentes espèces.* Publications communs: ref. 7, 8, 41
- Sophie Pennetier (soutenue 2005, Université François Rabelais de Tours, responsable scientifique – R.Dalbies-Tran) – formation et collaboration. Titre de la thèse: *Identification et caractérisation de gènes préférentiellement exprimés dans l'ovocyte bovin.* Publications communs: ref. 5, 6, 9, 10, 11, 38, 40, 42, 43
- Céline Vigneron (soutenue 2003, Université François Rabelais de Tours, directeur de thèse - P.Mermillod) - collaboration et formation. Titre de la thèse: *Rôle des inhibiteurs de cdk dans la différenciation conjointe de l'ovocyte et des cellules du cumulus chez le bovin.* Publications communs: ref. 16, 17 dans la liste de publications
- Claire Amoros (soutenue 1998, Université Rennes-I, directeur de thèse - P. Prunet) – collaboration et co-encadrement. Titre de la thèse: *Production et analyse de lignées stables de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) transgénique : expression de gènes rapporteurs sous contrôle du promoteur du gène de la prolactine de saumon)* Publications communs: ref. 18, 26, 53, 58 dans la liste de publications

Stagiaires :

- Noemie Michel 2007 – stage de Master I Science de la Vie et de la Santé, spécialité Biologie de la Reproduction de l'Université François Rabelais de Tours – **encadrement.** Sujet: *Caractérisation de l'expression de la protéine CPEB chez le bovin (*Bos taurus*)*
- Marie Bernard 2006 - stage fin d'étude, IUT d'Auvergne, spécialité Bioinformatique - **encadrement.** Sujet: *Recherche et validation de gènes différentiellement exprimés dans l'ovocyte bovin au cours de la maturation in vitro*
- Maxime Tourette 2007 - stage fin d'étude, IUT d'Auvergne, spécialité Bioinformatique - **encadrement.** Sujet: *Annotation de macroarray d'ADNc bovin pour l'étude de l'expression du génome dans l'ovocyte et les cellules du cumulus bovins au cours de la maturation in vitro*
- Juan Traverso 2006-2007 – post-doc, **collaboration et aide dans la formation.** Publications communs : ref. 4, 37, 39 dans la liste de publications
- Monica Roy-Sabau 2004 – Stage apres DEA, 4 mois - **encadrement.** Sujet: *Etude de gène ZAR1 chez porcine.* Publications communs: ref. 9 dans la liste de publications.
- Sandrine Bicep 2004 – Maîtrise de Biologie des Populations et des Ecosystèmes, Université François Rabelais Tours, responsable Y. Cogné) - **aide dans la formation.** Sujet: *Fécondation in vitro et transgenèse chez la chèvre.*
- Francois Ferrier 1998-2000 – post-doc, **collaboration et aide dans la formation.** Sujet: *Etude des isoformes des gènes de sGnRH chez la truite.* Publications communs: 21, 22, 23, 24, 54, 55, 56, 52

Participation à des contrats de recherche

- Contrat européen "Biological containments of transgenic fish and risk assessment of interspecies gene transfer" (1995-1996 et 1998-2000, responsable scientifique - B.Breton) – **postdoc** de partenaire INRA SCRIBE: *production et analyse des poisson transgeniques*
- Contrat européen STRESSGENES "Study of genes implicated in stress by genomic approach in trout" (2001-2002, coordinateur P. Prunet) - **chercheur contractuel** de partenaire INRA SCRIBE: *création des banques ADNc soustraites, production et analyse des macroarrays ADNc*.
- Programme ANR OVOGENAE-I "Génomique expressionnelle de l'ovocyte dans des situations physiopathologiques de reproduction bovine" (2003-2006, coordinateur R. Dalbies-Tran) – chercheur impliqués dans les taches de partenaire INRA PRC – *production et analyse des macroarrays, etude des gènes ovocyttaire*
- **2007-2010** OVOGENAE-2, ANR "Genanimal" : Regulation of oocyte gene expression: a key for cattle breeding strategies – participation à la construction du projet, je suis **responsable** de taches "*Proteome de l'ovocyte*" et "*Interaction ovocyte-cumulus*" du partenaire 1, PRC INRA. (Porteur du projet – R. Dalbies-Tran) 511 k€ pour trois ans, dont 158 k€ pour l'équipe.
- **2009 – 2012** OSCILE, ANR "Genanimal" *Oocyte-somatic cells interactions, lessons from evolution* – participation à la construction et écriture du projet, je suis **responsable du partenariat** PRC INRA (Porteur du projet – Julien Bob, INRA SCRIBE); 330 k€ pour quatre ans, dont 93 k€ pour l'équipe.
- **2008-2009** Crédits incitatifs du département PHASE : *Recherche de biomarqueurs de la maturation ovocyttaire par spectrométrie de masse sur cellules folliculaires entières de vache, jument et femme* - construction, écriture et je suis **porteur du projet**. 5000 € pour un an.
- **2009** - Projet déposé à la Région Centre - PHARAHOMIC : "*Caractérisation de biomarqueurs liés aux Pathologies Humaines et A la Reproduction Animale ou Humaine par protéomique et spectrométrie de masse Haute Résolution*". participation à la construction et écriture du projet, **responsable** du partenariat PRC INRA, responsable de la tache 2 "*Identification des marqueurs de maturation des gamètes femelles*" et 3 "*Identification des marqueurs liés au développement embryonnaire*". Aide demandé - 681000 € pour l'équipement (spectromètre de masse à haute résolution LTQ-ETD-Orbitrap XL)

Liste des productions scientifiques

Articles soumis :

Schmaltz-Panneau B, Locatelli Y, **Uzbekova S**, Perreau C and Mermillod P (2009) Expression of marker genes and embryo development support activity of cultured bovine oviduct epithelial cells. *Molecular Reproduction and Development*

Articles scientifiques (revues avec comité de lecture)

1. **Uzbekova, S.**, M. Salhab, C. Perreau, P. Mermillod and J. Dupont (2009) Glycogen Synthase Kinase 3B in bovine oocytes and granulosa cells: possible involvement in meiosis during in vitro maturation. *Reproduction* (in press)
2. Thélie A, Papillier P, Pennetier S, Perreau C, Hennequet-Antier C, **Uzbekova S**, Dalbiès-Tran R. (2009) Regulation of bovine oocyte-specific transcripts during in vitro oocyte maturation and after maternal-embryonic transition analysed using a transcriptome approach. *Mol Reprod Dev*, Apr 2
3. D. Monniaux, A. Caraty, F. Clément, R. Dalbiès-Tran, J. Dupont, S. Fabre, N. Gérard, P. Mermillod, P. Monget, **S. Uzbekova** (2009) Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. *INRA Productions Animales* (in press)
4. Mermillod P, Dalbiès-Tran R, **Uzbekova S**, Thélie A, Traverso JM, Perreau C, Papillier P, Monget P. 2008 Factors affecting oocyte quality: who is driving the follicle? *Reprod Domest Anim*. Jul;43 Suppl 2:393-400. Review.
5. **Uzbekova S**, Arlot-Bonnemains Y, Dupont J, Dalbiès-Tran R, Papillier P, Pennetier S, Thélie A, Perreau C, Mermillod P, Prigent C, Uzbekov R. **2008** Spatio-temporal expression patterns of aurora kinases A, B, and C and cytoplasmic polyadenylation-element-binding protein in bovine oocytes during meiotic maturation. *Biol Reprod*. 2008 Feb;78(2):218-33. Epub 2007 Aug 8.
6. Thélie A, Papillier P, Pennetier S, Perreau C, Traverso JM, **Uzbekova S**, Mermillod P, Joly C, Humblot P, Dalbiès-Tran R. **2007** Differential regulation of abundance and deadenylation of maternal transcripts during bovine oocyte maturation in vitro and in vivo. *BMC Dev Biol*. 2007 Nov 7;7:125.
7. Tosca* L / **Uzbekova S***, Chabrolle C, Dupont J. 2007 Possible role of 5'AMP-activated protein kinase in the metformin-mediated arrest of bovine oocytes at the germinal vesicle stage during in vitro maturation. *Biol Reprod*. Sep;77(3):452-65. Epub 2007 Jun 13.
8. Tosca L, Chabrolle C, **Uzbekova S**, Dupont J. 2007 Effects of metformin on bovine granulosa cells steroidogenesis: possible involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (AMPK). *Biol Reprod*. Mar;76(3):368-78. Epub 2006 Nov 22.
9. **Uzbekova S**, Roy-Sabau M, Dalbiès-Tran R, Perreau C, Papillier P, Mompert F, Thélie A, Pennetier S, Cognie J, Cadoret V, Royere D, Monget P, Mermillod P. 2006. Zygote arrest 1 gene in pig, cattle and human: evidence of different transcript variants in male and female germ cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2006, 4: 12.
10. Pennetier S, Perreau C, **Uzbekova S**, Thélie A, Delaleu B, Mermillod P, Dalbiès-Tran R. **2006** MATER protein expression and intracellular localization throughout bovine folliculogenesis and preimplantation embryo development. *BMC Dev Biol* 2006; 6: 26.
11. Pennetier S, **Uzbekova S**, Guyader-Joly C, Humblot P, Mermillod P, Dalbiès-Tran R. 2005 Genes expressed in bovine oocytes revealed by subtractive and suppressive hybridization. *Biol Reprod*, 73: 713-20
12. Bernard C., Degrelle S., Ollier S., Champion E., Cassar-Malek I., Chardon P., Charpigny G., Ducroix-Crepy C., Hue I., Hocquette J.F., Le Provost F., Leroux C., Petit E., Piumi F., Pollet S., Roland G., Sudre K., **Uzbekova S.**, Zalachas E., Martin P. 2005 A cDNA macro-array resource for gene expression profiling in bovine tissues involved in reproduction and production (milk and beef) traits. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 56 Suppl 3: 215-24.
13. Martin C. , Plat M, Daguin V, Coulon F, **Uzbekova S**, Venturi E, Condé F, Hermel JM, Hantraye P, Tesson L, Anegon I, Melchior B, Peschanski M, Le Mauff B, Boeffard F,

- Sergent-Tanguy S, Neveu I, Naveilhan P, Soulillou JP, Terqui M, Brachet P, Vanhove B. 2005 Transgenic expression of CTLA4-Ig by fetal pig neurons for xenotransplantation. *Transgenic Research*, 14: 373-84.
14. Dalbies-Tran R., Papillier P., Pennetier S., **Uzbekova S.**, Monget P., 2005 Bovine Mater-like NALP9 is an oocyte marker gene. *Molecular Reproduction and Development* , 71:414-21
 15. Pennetier S., **Uzbekova S.**, Perreau C., Papillier P., Mermillod P., Dalbies-Tran R., 2004 Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes MATER, ZAR1, GDF9, BMP15, and VASA in adult bovine tissues, oocytes, and preimplantation embryos. *Biology of Reproduction* 71, 1359-1366
 16. Vigneron C., Perreau C., Dalbies-Tran R., Joly C., Humblot P., **Uzbekova S.**, Mermillod P., 2004 Protein synthesis and mRNA storage in cattle oocytes maintained under meiotic block by roscovitine inhibition of MPF activity. *Molecular Reproduction and Development* 69, 457-465
 17. Vigneron C., Perreau C., Dupont J., **Uzbekova S.**, Prigent C., Mermillod P., 2004 Several signaling pathways are involved in the control of cattle oocyte maturation. *Molecular Reproduction and Development* 69, 466-474
 18. **Uzbekova S**; Amoros C; Cauty C; Mambrini M; Perrot E; Hew C; Chourrout D; Prunet P. **2003** Analysis of Cell-Specificity and Variegation of Transgene Expression Driven by Salmon Prolactin Promoter in Stable Lines of Transgenic Rainbow Trout *.Transgenic Research* 12(2): 213-227.
 19. Madigou T, **Uzbekova S**, Lareyre JJ, Kah O. **2002** Two messenger RNA isoforms of the gonadotrophin-releasing hormone receptor, generated by alternative splicing and/or promoter usage, are differentially expressed in rainbow trout gonads during gametogenesis. *Molecular Reproduction and Development* 63(2):151-60
 20. **Uzbekova S.**, Lareyre J-J, Madigou T., Davail B., Jalabert B. and Breton B. 2002 Expression of prepro-GnRH and GnRH receptor messengers in rainbow trout ovary depends on the stage of ovarian follicular development. *Molecular Reproduction and Development* 62(1):47-56
 21. Ferriere F, **Uzbekova S**, Breton B, Jego P, Bailhache T. **2001** Two different messenger RNAs for salmon gonadotropin-releasing hormone are expressed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) brain. *Gen Comp Endocrinol.* 2001 Dec;124(3):321-32.
 22. **Uzbekova S**, Lareyre J, Guiguen Y, Ferrière F, Bailhache T, Breton B. Expression of sGnRH mRNA in gonads during rainbow trout gametogenesis. **2001** *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2001 Jun;129(2-3):457-65.
 23. **Uzbekova S**, Ferrière F, Guiguen Y, Bailhache T, Breton B, Lareyre JJ. **2001** Stage-dependent and alternative splicing of sGnRH messengers in rainbow trout testis during spermatogenesis. *Mol Reprod Dev.* 2001;59(1):1-10.
 24. **Uzbekova S**, Chyb J, Ferrière F, Bailhache T, Prunet P, Alestrom P, Breton B. **(2000)** Transgenic rainbow trout expressed sGnRH-antisense RNA under the control of sGnRH promoter of Atlantic salmon. *J Mol Endocrinol.* 2000 Dec;25(3):337-50.
 25. B. Breton and S. **Uzbekova** **2000** Evaluation of the biological risks associated with the dissemination of transgenic fish in the environment (Evaluation des risques biologiques liés à la dissemination de poissons génétiquement modifiés dans les milieux naturels). *Compte-Rendus de l'Académie d'Agriculture de France* 86(6) : 67-76
 26. Amoros C., **Uzbekova, S.**, Chourrout D., Hew C., Prunet P. **1998**, Analysis of a salmon prolactin promoter in transgenic rainbow trout. In: *Annals of the New York Academy of Science*, 839:463-465
 27. Hanley S, Smith TJ, Muller F, Maclean N, **Uzbekova S**, Prunet P, Breton B. **1998** Isolation and functional analysis of the histone H3 promoter from atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1998 Sep;7(3):165-72.
 28. Komarova YuA, Ryabov EV, Alieva IB, Uzbekov RE, **Uzbekova SV**, Vorobjev LA. **1997** Polyclonal antibodies against human gamma-tubulin stain centrioles in mammalian cells from different tissues. *Membr Cell Biol.* 1997; 10(5):503-13.
 29. Generozov EV, Riabov EB, Konareva TN, Arshava NV, **Uzbekova SV**, Zavriev SK. **1996** [Preparation of recombinant envelope proteins from spherical phytoviruses and study of prospects for using them for immunoenzyme diagnosis] *Mol Biol (Mosk).*30(2):461-9.

30. Shadenkov AA, Kovaleva MV, Kuz'min EV, **Uzbekova SV**, Shemiakin MF. **1996** [VirD2-independent, but MobA-dependent transfer of plasmid DNA from a broad circle of hosts from agrobacterium into the plant cell nucleus] *Mol Biol (Mosk)*. 30(2):454-60.
31. Shadenkov AA, **Uzbekova SV**, Kadyrov RM, Kuz'min EV, Osterman AL, Chestukhina GG, Shemiakin MF. **1993** [Creation of a hybrid protein gene based on *Bacillus thuringiensis* delta endotoxins CryIIIa and CrIA(a) and expression of its derivatives in *Escherichia coli*] *Mol Biol (Mosk)*. 27(4):952-9.
32. Shadenkov A.A. and **Uzbekova S.V.**, Kuzmin EV, Zolotova T.B., Eisner G.I, Shemyakin M.F. **1992** Expression of a hybrid gene for bifunctional «insectotoxin-GUS» protein in transgenic tobacco. *Dokl. Acad. Nauk*, 325(1):183-186.
33. Kuzmin EV, Shadenkov A.A., **Uzbekova S.V.**, Shemyakin M.F. **1991** Construction of a bifunctional derivatives of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insectotoxin gene for expression in transgenic plants. *Dokl. Acad. Nauk*, 321(2):412-415

Communications dans des congrès et les actes de colloques (liste non-exhaustive)

34. Salhab M, Perreau C, Mermillod P and **Uzbekova S** **2008** Changes in mRNA level of several factors involved in steroidogenesis, metabolism and apoptosis in cumulus cells during in vitro maturation of bovine oocytes. *First Cost Action - Gemini General Conference "Maternal Interaction with Gametes and Embryos"* 9-11 October 2008, Volos, Greece abstract, poster presentation
35. Debey P., Locatelli Y., **Uzbekova S.**, Perreau C. and Mermillod P. **2008** Embryo-Maternal communication in bovine oviduct: A transcriptomic approach. *First Cost Action - Gemini General Conference "Maternal Interaction with Gametes and Embryos"* 9-11 October 2008, Volos, Greece abstract, poster presentation
36. Uzbekova, S. and Labas V. **2008** Mammalian Single Cell Analysis: Intact Oocyte MALDI-TOF Mass Spectrometry to display biomarkers. *25eme congress de la Société Française d'Electroforese et d'Analyse Proteomique* 6-8 octobre, Tours, France abstract, poster presentation
37. **Uzbekova S**, Traverso J, Thélie A, Perreau C, Papillier P, Dupont J, Mermillod P. and Dalbès-Tran R. **2008** Cytoplasmic Polyadenylation-Element-Binding protein (CPEB) is an important factor of meiosis in bovine oocytes. *16 International Congress on Animal Reproduction*, 13-14 July 2008, Budapest, Hungary – abstract, poster presentation
38. **Uzbekova S**, Dalbès-Tran R, Mermillod P, Prigent C, Uzbekov R. **2007** Expression des oncomarqueurs dans les cellules germinales et l'embryons précoces bovins: aurora kinases. *Actes du 20^{eme} colloque BIOTECHNOCENTRE*, 25-26 octobre 2007, p.30.
39. **Uzbekova S**, Labas V, Traverso J, Papillier P, Thélie A, Tosca L, Tsikis G, Dupont J, Dalbès-Tran R. Effect of surrounding cumulus cells onto meiotic maturation of bovine oocytes: differences at mRNA and protein level between cumulus-enclosed and denuded oocytes during IVM. *2nd International Meeting on Mammalian Embryogenomics*, 17-20 Octobre 2007, Paris, France, p.152.
40. Dalbès-Tran R., Thélie A., Pennetier S., Papillier P., **Uzbekova S.** **2007** Oocyte-specific genes and post-translational regulation: their impact in the field of expression genomics. *2nd International Meeting on Mammalian Embryogenomics*, 17-20 Octobre 2007, Paris, France, p.18 – oral communication.
41. **Uzbekova S**, Arlot-Bonnemains Y, Thélie A, Papillier P, Dalbès-Tran R, Mermillod P, Prigent C, Uzbekov R. **2007** Expression of oncomarkers in bovine germ cells and early embryo: aurora kinases and their possible involvement in oocyte maturation. *International Conference on Farm Animal Reproduction: From Egg to Embryo*. Rolduc, Netherland 27-30 May, 2007. p.100.
42. Thélie A, Pennetier S., Papillier P, **Uzbekova S**, Mermillod P, and Dalbès-Tran R. Three novel bovine genes preferentially expressed in oocyte: BCAR4, RNF18 and MELK. *International Conference on Farm Animal Reproduction: From Egg to Embryo*. Rolduc, Netherland 27-30 May, 2007. p.99.
43. Tosca L., Chabrolle C., Ferre P., Fougelle F., **Uzbekova S.**, Dupont J. **2006** Effets de la metformine sur la stéroïdogenèse des cellules de la granulosa de vache : implication de

- l'AMP-activated protein kinase (AMPK)? *Congrès Annuel de la SFBBM. 7-8 septembre 2006, Clermont Ferrand. Communication Orale*
44. **Uzbekova S**, Roy-Sabau M, Thélie A, Pennetier S, Cadoret V, Dalbiès-Tran R and Mermillod P. **2006** Alternatively spliced mRNA variants of maternal Zygote arrest 1 gene expressed in pig, cattle and human. 5th meeting of FNRS contact group “*Compétence au Développement de l’Ovocyte Mammifère et Qualité Embryonnaire*”, 10 juin 2006, Louvain-la-Neuve (Belgique) – **oral communication**, p. 10.
 45. Pennetier S, **Uzbekova S**, Mermillod P. and Dalbiès-Tran R. 2005 A bovine orthologue of the maternal effect gene Stella/PGC7 identified by subtractive and suppressive hybridization. *38th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction*, July 2427, 2005, Quebec City, Quebec, Canada
 46. Bernard C., Degrelle S., Ollier S., Campion E., Cassar-Malek I., Chardon P., Charpigny G., Ducroix-Crepy C., Hue I., Hocquette J.F., Le Provost F., Leroux C., Petit E., Piumi F., Pollet S., Roland G., Sudre K., **Uzbekova S.**, Zalachas E., Martin P. 2004. A cDNA macroarray resource for gene expression profiling in bovine tissues involved in reproduction and production (milk and beef) traits. *5th Polish-French Symposium "Animal Growth and Development: regulatory mechanisms"*. 22-23 septembre 2004, Paris , **Abstract S4**
 47. Monget P, Dadé S, Pennetier S, **Uzbekova S**, Mermillod P. and Dalbies-Tran R. 2004. In silico identification and characterization of new genes specifically expressed in oocytes in the mouse. *3^{ème} réunion du groupe de contact FNRS “Compétence au Développement de l’Ovocyte Mammifère et Qualité Embryonnaire”*, Mons (Belgique)
 48. S. Kalujnaia, L. Dengreville, L. Zheleznyakova, **S. Uzbekova**, C. Valotaire, C. Sevellec, J. Mosser, T. Pottinger, P. Prunet and B. Auperin. 2004. Transcriptional response of rainbow trout head kidney to confinement. *SEB Annual Main Meeting, Heriot-Watt University, UK*, Abstract A14.9
 49. S. Kalujnaia, **S. Uzbekova**, L. Dengreville, L. Zheleznyakova, C. Valotaire, C. Sevellec, J. Mosser, , B. Auperin and P. Prunet. **2004**. Salinity stress and gene expression profiling in rainbow trout. *SEB Annual Main Meeting, Heriot-Watt University, UK*, Abstract A14.15
 50. Pennetier, S., Guyader-Joly, C., **Uzbekova, S.**, Humblot, P., Mermillod, P., & Dalbiès-Tran, R. **2003** Characterization of bovine oocyte-specific genes. *2^{ème} réunion du groupe de contact FNRS “Compétence au Développement de l’Ovocyte Mammifère et Qualité Embryonnaire”*, Mons (Belgique), 19 Septembre 2003.
 51. **S. Uzbekova**, J-J.Lareyre, T. Madigou, B. Jalabert, and B. Breton Cycle-dependent expression of GnRH and GnRH-R genes in rainbow trout ovary. **2001** *2nd International Symposium on the Comparative biology of GnRH: molecular forms and receptors*. June 2-4, 2001 Penang, Malaysia, p.48 , **oral communication**
 52. **Uzbekova, S.**, Hanley S., Cauty C., Smith T. and B. Breton. Functional study of salmon histone H3 promoter in transgenic rainbow trout: constitutive expression of sGnRH antisense mRNA could lead to a reversible sterility. **2001** *3rd IUBS Symposium on Molecular Aspects of Fish Genomes and Development*. February 18-21, 2001, Singapore, S22, p. 68, **oral communication**
 53. **Uzbekova S.**, Amoros C., Chourrou D., Cauty C., Hew CL, and Prunet. Variagation of specific LacZ expression driven by salmon prolactin promoter in transgenic rainbow trout lines. *3rd IUBS Symposium on Molecular Aspects of Fish Genomes and Development*. February 18-21, **2001**, Singapore, P45, p.86
 54. **Uzbekova, S.**, J.J. Lareyre, Y. Guiguen, F. Ferriere and B. Breton. Stage-dependent expression and alternative splicing of sGnRH messengers in gonads during rainbow trout gametogenesis. *4th international Symposium on Fish Endocrinology*. July 31-Aug 3, **2000** Seattle, Washington USA, p. 35, **oral communication**
 55. **Uzbekova S.**, Alestrom P., Ferriere F., Baihache T. , Prunet P., and Breton B. Expression of recombinant sGnRH-antisense RNA under the control of either specific or constitutive promoters in transgenic rainbow trout. *4th international Symposium on Fish Endocrinology*. July 31-Aug 3, **2000** Seattle, Washington USA, p. 71
 56. **Uzbekova, S.**, Ferriere F., Lareyre JJ, Jego P., Breton B., Bailhache T. Stage-dependent expression and alternative splicing of sGnRH-II messengers during rainbow trout spermatogenesis . *XIth European Workshop on Molecular and cellular Endocrinology of the testis*. - Saint-Malo (France) May 13-17, **2000**. **oral communication**

57. **Uzbekova, S.**, Chyb, J., Alestrom, P. Prunet, P., Breton B. Transgenic rainbow trout expressing sGnRH antisense mRNA under the control of sGnRH Pab promoter of Atlantic salmon. - *Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of fish*, July **1999**, Bergen (Norway), p. 68
58. Amoros C., **Uzbekova S.**, Chourrout D., Hew C., Prunet P. Transgenic rainbow trout as a model to study cell-specific gene expression driven by a salmon Prolactin promoter. *Proceedings of the XIIIth International Congress of Comparative Endocrinology*; 17-21 November **1997**; Yokohama (Japan).
59. **Uzbekova S.V.**, Shadenkov A.A., Kuzmin E.V., Shemyakin M.F. Construction of hybrid genes for antilepidopteran or anticoleopteran fusion proteins «B.t. toxin-enzymatic marker» and their expression in transgenic plants, 1994. *Proceedings of International Symposium "Plant Biotechnology and Genetic Engineering"*, Kiev, (Ukraine), p.68 **oral communication**.
60. **Uzbekova S.V.**, Shadenkov A.A., Kovaleva M.V, Kuzmin E.V. Bifunctional "insectotoxin-NPT" proteins in transgenic tobacco plants. 1993. *Proceedings of Second all-Russia Symposium "New methods in Plant Biotechnology"*. Puschino. p.54

Documents d'animation, d'évaluation et d'encadrement de la recherche (liste non-exhaustive)

61. **Uzbekova S.**, Tosca L., Dupont J., Mermillod P. CPEB et les sérine/thréonine kinase Aurora-A, AMPK et ERK1/2: implication dans la maturation de l'ovocyte chez le bovin? **2007 2emes Journées d'Animation Scientifique du Département de Physiologie Animale et Systèmes d'Elevages**. 22-24 octobre, Tours, p. 68, **Oral communication O38**
62. Salhab M., Mermillod P. et **Uzbekova S**. Cinétique d'expression dans les cellules du cumulus des gènes impliqués dans la maturation ovocytaire in vitro chez la vache. *12ème Journée "Thésards"*, 25-26 Juin 2007, Centre INRA de Tours
63. Leguen I, Odjo N, **Uzbekova S**, Kalujnaia, S, Luthringer B, Baron D, Monod J, Prunet P. 2005. Effet d'un stress de salinité sur l'expression des cytochromes P450 1A dans les branchies de truite. *1ères Journées d'Animation Scientifique du Département de Physiologie Animale et Systèmes d'Elevages*. 15-16 Mars 2005, Tours, p. 32
64. Mativet S, Leborne G, Dengreville L, Kalujnaia, S, **Uzbekova S**, Valotaire C, Mosser J, Pottinger T, Prunet P, Auperin B. 2005. Réponse transcriptionnelle du rein antérieur de truite arc-en-ciel à un confinement. *1ères Journées d'Animation Scientifique du Département de Physiologie Animale et Systèmes d'Elevages*. 15-16 Mars, Tours, p. 47
65. Pennetier S, **Uzbekova S**, Guyader-Joly C, Humblot P, Mermillod P, Dalbies-Tran R. 2005. Mise en évidence de gènes ovocytaires bovines. *1ères Journées d'Animation Scientifique du Département de Physiologie Animale et Systèmes d'Elevages*. 15-16 Mars 2005, Tours, p. 58
66. Monget P, Dadé S, Pennetier S, Paillisson A, Thélie A, **Uzbekova S**, Mermillod P, Batellier F, Elis S, Govoroun M, Bobe J, Bonnet E, Chastant S, Reynaud K, Klopp K, Duranthon V, and Dalbies-Tran R. 2005. Identification in silico de gènes spécifiquement exprimés par l'ovocyte chez la souris, la vache, la poule et la truite : analyse fonctionnelle comparée. *1ères Journées d'Animation Scientifique du Département de Physiologie Animale et Systèmes d'Elevages*. 15-16 Mars 2005, Tours, p. 99
67. Plat M, Terqui M, Mermillod P, Houdebin LM, Venturi E, Martin C, Menoret S, Vanhove B, Anegon I, Brachet P, Soullilou JP, Peschansky M, Hantraye P, Uzbekova S. 2005. Transgénèse chez le porc : création, caractérisation et conservation des lignées pour l'étude de la xenotransplantation. *1ères Journées d'Animation Scientifique du Département de Physiologie Animale et Systèmes d'Elevages*. 15-16 Mars 2005, Tours, p. 104
68. Bernard C., Degrelle S., Ollier S., Champion E., Cassar-Malek I., Chardon P., Charpigny G., Ducroix-Crepy C., Hue I., Hocquette J.F., Le Provost F., Leroux C., Petit E., Piumi F., Pollet S., Roland G., Sudre K., **Uzbekova S.**, Zalachas E., Martin P. 2005. Une collection d'ADNc pour l'étude du profil d'expression de gènes des tissus bovins impliqués dans les caractéristiques de reproduction et de production (lait et viande). *1ères Journées d'Animation Scientifique du Département de Physiologie Animale et Systèmes d'Elevages*. 15-16 Mars 2005, Tours, p. 165

Présentation de l'activité scientifique (1988-2008)

Avant -propos

Depuis mon diplôme d'études supérieures de biologiste – généticien en 1987 à la faculté de Biologie de l'Université d'Etat de Saint-Petersbourg (Russie), je travaille dans les domaines de la biologie moléculaire, des biotechnologies et plus récemment dans la physiologie moléculaire de la reproduction et du développement. Au cours de ces 20 années passées dans ce métier passionnant, j'ai eu la chance de travailler sur de nombreux sujets utilisant des modèles biologiques très différents et éloignés du point de vue évolutif : microorganismes, plantes, poissons, ruminants et homme. Cependant, mes travaux de recherche peuvent être divisés en trois parties.

La première partie, correspondant à mes travaux de thèse, a porté sur la **biotechnologie des plantes** : construction de vecteurs pour la transgénèse végétale, la production et l'analyse de plantes résistantes aux insectes. Ces travaux ont été réalisés au laboratoire de génie génétique à l'Institut de Biotechnologie Agricole à Moscou (Russie). Au cours de ces années en Russie, je me suis formée en tant que chercheur et j'ai acquis la grande partie des techniques de biologie moléculaire et de biochimie que j'utilise aujourd'hui.

La seconde partie a été consacrée à la **transgénèse animale**. Au sein du laboratoire de physiologie des poissons INRA à Rennes (SCRIBE), j'ai générée des lignées transgéniques de truite arc-en-ciel pour étudier les profils d'expression du transgène sous contrôle des séquences promotrices différentes, tels que les gènes du GnRH, histone H3 ou de la prolactine. Après mon recrutement à l'Unité de Physiologie de la Reproduction et du Comportement du Centre de recherches INRA de Tours, je me suis investie dans la transgénèse porcine, en caractérisant des lignées transgéniques dont certaines sont utilisées dans le cadre du projet de l'INSERM sur la xénogreffe des neurones.

La troisième partie qui constitue mes principales recherches actuelles se situe dans le domaine de la **physiologie moléculaire de la reproduction animale**. C'est principalement sur cette partie que cette synthèse est articulée. Des poissons transgéniques exprimant les ARN antisens du gène de la GnRH se sont avérés avoir une gamétogenèse perturbée. Certains ont révélé des cas de stérilité, ce qui a suscité mon intérêt et mon désir d'aller plus loin dans l'étude de la physiologie de la reproduction au niveau gonadique. Je me suis particulièrement intéressée à l'effet paracrine sur la gamétogenèse des neuropeptides apparentés au GnRH dont j'ai étudié l'expression dans les ovaires et testicules chez la truite. Enfin, depuis mon recrutement à la PRC INRA à Nouzilly mes travaux scientifiques sont menés autour de **cellules germinales femelles** des gros mammifères supérieurs, essentiellement bovins. Mon objectif est de comprendre les mécanismes impliqués dans le processus de la **maturation finale de l'ovocyte**, une étape principale de l'acquisition de sa **compétence au développement** et donc de la **qualité** de l'ovocyte. Plus particulièrement, je m'intéresse aux **interactions** entre l'ovocyte et les cellules du cumulus qui l'entourent, au cours de la maturation et aux **voies de signalisation** utilisées dans ce processus.

Mes derniers travaux portent sur quelques acteurs du métabolisme intra-folliculaire tels que les protéines kinases AMPK, Aurora, GSK3 ou MAP kinases, impliquées dans les cascades de signalisation qui permettent à l'ovocyte d'avancer dans la méiose et d'aboutir à sa maturation. De plus, la recherche de **biomarqueurs de la qualité ovocytaire** dans l'ovocyte ainsi que dans les cellules folliculaires respectives, à l'aide des nouvelles approches protéomiques, fait partie de mes projets de recherche actuels. Dans mes recherches j'utilise autant les approches globales sans a priori telles que les analyses **transcriptomique** et **protéomique**, que les approches **ciblées** telles que les analyses d'expression de gènes candidats dans des cellules ovariennes aux niveaux des transcrits et des protéines.

A. Contexte et problématique scientifique.

Introduction.

La formation de gamètes femelles fécondables, ou ovogenèse, est inscrite au cœur d'un processus long et complexe : la folliculogenèse, résultat de l'activité ovarienne. Le follicule apporte à l'ovocyte qu'il renferme l'environnement nécessaire à sa croissance et à l'acquisition de sa compétence à la fécondation et au développement embryonnaire. L'ovocyte lui-même régule de nombreux paramètres permettant le bon déroulement du développement folliculaire (Matzuk et al., 2002, Mermillod et al. 2008 - **article 4**). Différents aspect de la **régulation méiotique** et de l'interaction entre l'ovocyte et cellules folliculaires dans la période finale de l'ovogenèse, particulièrement au cours de la **maturation ovocytaire**, font l'objet de mes recherches depuis ces **six dernières** années.

1. Régulation centrale de l'ovogenèse.

Chez les vertébrés la croissance et la différenciation ovocytaires ont lieu dans les follicules ovariens en croissance, sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Les cellules folliculaires (thèque et granulosa) ont une activité proliférative importante durant toute la période initiale de la folliculogenèse (folliculogenèse basale), elles apportent à l'ovocyte l'environnement nécessaire à sa croissance et à l'acquisition de sa compétence à la fécondation et au développement embryonnaire. Les cellules de granulosa synthétisent de nombreux facteurs de croissance (EGF, FGF, AMH,...) et des cytokines, ainsi que les récepteurs à FSH et l'aromatase, permettant la synthèse des œstrogènes. Les cellules de thèque interne expriment également des facteurs de croissance, des récepteurs à LH, ainsi que des enzymes clé de la stéroïdogenèse permettant la synthèse de progestagènes et d'androgènes (pour revue, voir : Monniaux et al, 2009 - **article 3**).

La folliculogenèse est contrôlée en grande partie par les gonadotropines hypophysaires FSH et LH, mais aussi par de nombreux autres facteurs tels que les facteurs de croissance, la matrice extracellulaire, les protéases, les stéroïdes et autres molécules d'origine endocrine ou locale, agissant en synergie avec les gonadotropines (McGee, Hsueh, 2000). La **croissance folliculaire** se déroule en deux périodes : une phase de croissance continue, dite croissance **basale - non gonado-dépendante**, qui est suivie d'une phase de croissance cyclique, dite croissance **terminale** - dépendante de la variation des concentrations en gonadotropines. Outre les gonadotropines, les principaux régulateurs de la croissance folliculaire terminale sont l'IGF1 et l'insuline, qui sensibilisent les follicules à la FSH. En particulier, l'action synergique de la FSH et de l'IGF1 joue un rôle déterminant dans le début de la phase terminale de croissance, permettant l'émergence du futur follicule préovulatoire. Ensuite, la dominance du follicule préovulatoire est assurée par la LH, hormone à laquelle ce follicule est progressivement devenu hypersensible et qui prend le relais de la FSH.

Les gonadotropines FSH et LH sont secrétées par l'hypophyse sous le contrôle du GnRH (hormone de libération des gonadotropines). Le GnRH est produit par les neurones de l'hypothalamus médio-basal et de l'aire préoptique, et ensuite l'hormone est directement secrétée sous une forme de décapeptides dans les capillaires sanguins de la tige pituitaire chez les mammifères. Chez les poissons, les projections de neurones à GnRH hypothalamiques apportent cette hormone vers les cellules gonadotropes. Dans tous les cas, le GnRH stimule la synthèse et la sécrétion de LH et de FSH en se fixant à des récepteurs situés à la surface des cellules gonadotropes. Une délétion dans le gène du GnRH a donné une lignée de souris hypogonadiques stériles dont la fertilité peut être restaurée par l'administration de GnRH (Mason et al. 1986).

Les stéroïdes, en particulier l'œstradiol produit par les cellules de la granulosa à partir des androgènes d'origine thécale, inhibent la sécrétion de GnRH par un rétrocontrôle négatif régulé par le kisspeptide (Caraty, Franceschini, 2008). L'expression des gènes de stéroïdogénèse tels que *CYP11A1*, *STAR*, *HSD3B2*, et surtout *CYP19A1* (aromatase), qui assurent la synthèse de l'œstradiol par cellules de granulosa, est fortement augmentée en fin de croissance folliculaire. Les cellules de granulosa deviennent sensibles à la LH par apparition et augmentation brutale des récepteurs de LH. Cependant, chez les mammifères en fin de croissance folliculaire terminale, et au-delà d'une concentration – seuil spécifique à l'espèce, l'œstradiol exerce une action positive sur le système hypothalamo-hypophysaire. Il provoque alors une augmentation de la fréquence des pulses de GnRH suivie par sa libération massive et par une augmentation importante de la sensibilité hypophysaire. L'association de ces deux effets conduit à une décharge massive de LH qui déclenchera l'ovulation des follicules préovulatoires (pour revue - Monniaux et al., 2009, article 3). Au moment de l'ovulation, le follicule expulse l'ovocyte mature, prêt à être fécondé.

2. Maturation ovocytaire et acquisition de la compétence au développement.

La compétence au développement, c'est-à-dire la capacité d'être fécondé et de se développer en un embryon viable, est acquise progressivement par l'ovocyte qui se différencie de façon progressive au cours de la folliculogénèse (Mermillod et al. 1999, 2008 – article 4). La croissance du follicule et celle de l'ovocyte évoluent parallèlement dans les follicules primaires et secondaires. Quand l'antrum apparaît, l'ovocyte a atteint 80 % de sa taille définitive et sa croissance ralentit tandis que celle du follicule se poursuit jusqu'à l'ovulation. L'ovocyte va d'abord acquérir la **compétence méiotique** (aptitude à reprendre la méiose). Les petits follicules antraux (< 5 mm chez le bovin) sont incapables de répondre à la décharge hormonale ovulante (faute de récepteur LH) mais contiennent un ovocyte potentiellement capable de reprendre sa méiose (pour revue : Mermillod 2001). A partir du stade antral, la différenciation ovocytaire est moins spectaculaire (croissance ralentie, diminution importante de l'activité transcriptionnelle) mais reste fonctionnellement importante puisque c'est au cours de ces phases tardives de différenciation que l'ovocyte devient progressivement apte à être fécondé après maturation et à se développer normalement ensuite, i.e. devient **compétant au développement**.

Pendant toute sa différenciation intra-folliculaire, l'ovocyte reste bloqué au stade diplotène de la prophase méiotique (encore appelé stade de vésicule germinale). Ce n'est que lorsque le follicule reçoit la décharge ovulatoire de LH que l'ovocyte reprend sa méiose et accomplit sa maturation, phase ultime de sa différenciation, jusqu'au stade de métaphase II auquel a lieu la fécondation. A ce moment l'ovocyte atteint un diamètre de 100 à 120 μm chez la vache. Si l'ovocyte est retiré du contexte inhibiteur de méiose produit par le follicule antral, il reprend spontanément sa méiose (cas de la maturation in vitro, **MIV**), même si le follicule est encore loin de l'ovulation et que l'ovocyte n'a pas terminé sa différenciation.

Pendant la croissance folliculaire l'**activité transcriptionnelle** de l'ovocyte est très intense (Fair et al. 1997). Une partie des ARN est stockée sous une forme stable et déadénylé au sein des particules ribonucléoprotéiques, tandis qu'une autre partie supporte la synthèse protéique pour assurer le métabolisme de l'ovocyte. Certains gènes exprimés sont préférentiellement par l'ovocyte (gènes ovocyte – spécifiques), comme ceux codant pour les facteurs de croissance BMP15 et GDF9 (Wu, Matzuk, 2002), les composants de la zone pellucide protéines ZP1-ZP4, ou d'autres facteurs dont le rôle au niveau cellulaire reste à élucider tels que MATER et ZAR1 (Zheng, Dean, 2007; Wu et al. 2003a). Parmi ces gènes, on trouve des gènes dits « à effet maternel », dont l'expression dans l'ovocyte en croissance est nécessaire au développement précoce de l'embryon, pendant sa phase de silence transcriptionnel (DPPA3, MATER, ZAR1...). L'activité transcriptionnelle diminue fortement dans l'ovocyte dès la fin de sa croissance et devient quasiment indétectable en début de maturation.

La **maturation ovocytaire** recouvre l'ensemble des changements nucléaires et cytoplasmiques qui interviennent dans l'ovocyte à l'intérieur du follicule suite à la décharge préovulatoire de LH et/ou levée de l'inhibition folliculaire. La reprise de la méiose et sa poursuite jusqu'au stade de métaphase-II (**maturation nucléaire**) s'accompagnent de modifications structurales et biochimiques au sein du cytoplasme (**maturation cytoplasmique**). Ces changements au sein de l'ovocyte sont associés à une **différenciation** des cellules du cumulus (**CC**, cellules de granulosa entourant l'ovocyte et communiquant avec lui via des jonctions perméables, "gap-junctions").

Un déroulement coordonné de l'ensemble de ces événements détermine non seulement le succès de la maturation ovocytaire elle-même, mais aussi le succès ultérieur de la fécondation et de l'initiation du développement embryonnaire.

Plusieurs facteurs paracrines et endocrines sont impliqués dans la régulation de la maturation ovocytaire. Parmi les plus importants sont :

a) Les petits messagers cycliques, essentiellement AMPc synthétisés à partir de l'ATP et dont la concentration intracellulaire est maintenue en équilibre dynamique par l'adénylate cyclase (synthèse) et les phosphodiésterases (dégradation). L'AMPc est régulé différemment dans l'ovocyte et le cumulus. Il contrôle une importante voie de signalisation impliquant la protéine kinase AMPc dépendante (PKA) qui joue un rôle clé dans la régulation méiotique. La baisse du niveau d'AMPc intra-ovocytaire induit la reprise de la méiose;

- b) Les actions coordonnées de différentes protéines kinases (PKA, PKC, CDKs, MAP kinases ERK, MAPK p38, PI3K, Aurora...) et phosphatases (PP1 et PP2, CDC25...) dans l'ovocyte et CC;
- c) Les gonadotropines FSH et LH, qui stimulent la maturation via la voie de l'AMPc ou la voie du calcium ou via la synthèse de facteurs de croissance (famille EGF) par les cellules de granulosa (Park et al., 2004) ;
- d) Les stéroïdes, progestérone et oestradiol ainsi que l'activine et l'inhibine (Driancourt, Thuel, 1998) ;
- e) Les facteurs de croissance, tels que l'IGF-1, l'IGF-2 et famille EGF (Sirotkin et al. 2000).

Grâce à la reprise de méiose spontanée des ovocytes de follicules antraux, la technique de maturation in vitro (MIV) a été développée dans plusieurs espèces domestiques (bovins, ovins, caprins, porc, cheval, etc...). Grâce à cette technique, il est possible d'obtenir des ovocytes au stade de métaphase II, prêts à être fécondés au départ de complexes ovocytes – cumulus (**COC**) provenant de follicules encore loin de l'ovulation.

Chez la vache, des ovocytes extraits de follicules de plus de 2 mm sont capables de reprendre la méiose in vitro, puis d'être fécondés et de se développer jusqu'au stade blastocyste (Sirard et al. 1988). Les ovocytes bovins en culture in vitro atteignent la métaphase - II même sans gonadotropines (Suss et al. 1988). La MIV dans un milieu synthétique adapté, supplémenté par des hormones et des facteurs de croissance (Donnay et al. 2004) permet d'obtenir plus de 90% des ovocytes en métaphase II, aptes à la fécondation in vitro (FIV) et présentant un taux de développement in vitro (DIV) jusqu'au stade de blastocyste supérieur à 40% chez la vache. Les embryons obtenus peuvent être transférés dans des femelles receveuses et produire des naissances. Cependant, le succès de cette technique est nettement plus élevés lorsque les ovocytes sont prélevés dans des follicules proches de l'ovulation, voire ovulés, i.e. **maturés in vivo** (Lonergan et al. 1999; Humblot et al. 2005). Une des cause de la compétence au développement relativement faible des ovocytes de primates maturés in vitro est un retard de l'activation du génome embryonnaire, qui peut être un partie due à la maturation cytoplasmique incomplète (Schramm et al. 2003)

Il semble donc que les **conditions des étapes finales de la différenciation de l'ovocyte et de sa maturation soient cruciales pour sa qualité**, exprimée par son aptitude à se développer après fécondation.

2.1. Maturation méiotique et différenciation de cellules de cumulus au cours de ce processus.

Le maintien du blocage de l'ovocyte au stade de vésicule germinale (**VG**, prophase méiotique) est nécessaire au succès de sa différenciation intrafolliculaire. En effet, la reprise de méiose induite rapidement l'arrêt des transcriptions suite à la condensation des chromosomes et le remaniement des néosynthèses protéiques, sortant l'ovocyte de son programme de différenciation. Dans le follicule, le blocage de l'ovocyte au stade de vésicule germinale est du essentiellement au maintien d'un niveau

élevé d'AMPc intra-ovocytaire via la stimulation de la Gs G-protéine par le récepteur GPR3 (revue par Mehlmann, 2005). Dans le follicule, l'AMPc transite des cellules de granulosa murales au cumulus et à l'ovocyte par des jonctions communicantes. Ces jonctions sont constituées principalement par une protéine appelée connexine 43. Les cellules du cumulus majoritairement dépourvues des récepteurs de LH jouent un rôle essentiel dans le maintien du blocage méiotique avant le pic de LH et dans la maturation cytoplasmique au cours de la reprise de la méiose.

Les cellules du cumulus constituent un soutien indispensable du métabolisme ovocytaire. Elles fournissent par exemple des métabolites (pyruvate, glutamine,...) à l'ovocyte et participent au stockage de glutathion réduit dans son cytoplasme. Ce glutathion (GSH) est un facteur indispensable de résistance au stress oxydatif et il intervient également dans la décondensation de la chromatine du spermatozoïde lors de la formation du pronoyau mâle. Mais la GSH n'est pas synthétisée par l'ovocyte, d'où l'importance des interactions étroites entre l'ovocyte et les cellules de cumulus qui l'entourent.

Le pic préovulatoire de LH induit l'expansion du cumulus autour de l'ovocyte. Cette expansion résulte de la sécrétion d'une matrice extracellulaire riche en acide hyaluronique, elle est également stimulée par la FSH et certains facteurs de croissance tels que EGF et IGF-1. Des facteurs ovocytaires interviennent également dans ce phénomène. Par exemple, la protéine ovocyte-spécifique GDF9 est sécrétée par l'ovocyte et induit l'expressions de certains gènes dans le cumulus, parmi lesquels COX2 qui intervient dans la synthèse de prostaglandines, nécessaires pour l'ovulation, et la hyaluronane synthase HAS2, qui est impliquée dans la synthèse d'acide hyaluronique nécessaire à l'expansion. Le cumulus expansé constitue un micro-environnement protecteur pour l'ovocyte et assure la captation du complexe par le pavillon de la trompe suite à l'ovulation, ainsi que la capacitation des spermatozoïdes avant la fécondation (Tanghe et al 2002). Le pic préovulatoire de LH induit également la phosphorylation de la connexine 43 par MAPK (mitogen activated protein kinases), bloquant ainsi les jonctions perméables et donc le passage d'AMPc entre les cellules folliculaires et l'ovocyte.

La reprise de la méiose est associée à l'activation du M-phase Promoting Factor ou MPF, un hétérodimère composé d'une sous-unité catalytique, CDK1 (cyclin dependent kinase 1, encore appelée CDC2), et d'une sous-unité régulatrice, la cycline CCNB1. L'activation du MPF repose sur la formation de l'hétérodimère inactif, le pré-MPF puis sa conversion en MPF actif, suite à la déphosphorylation activatrice de CDK1 par la phosphatase CDC25B, et à l'inhibition de MYT1, une kinase de la famille Wee1. Le MPF peut être inhibé soit par la PKC, ou par la PKA cAMP-dépendent via CDC25B et Wee1B (**Figure 1**).

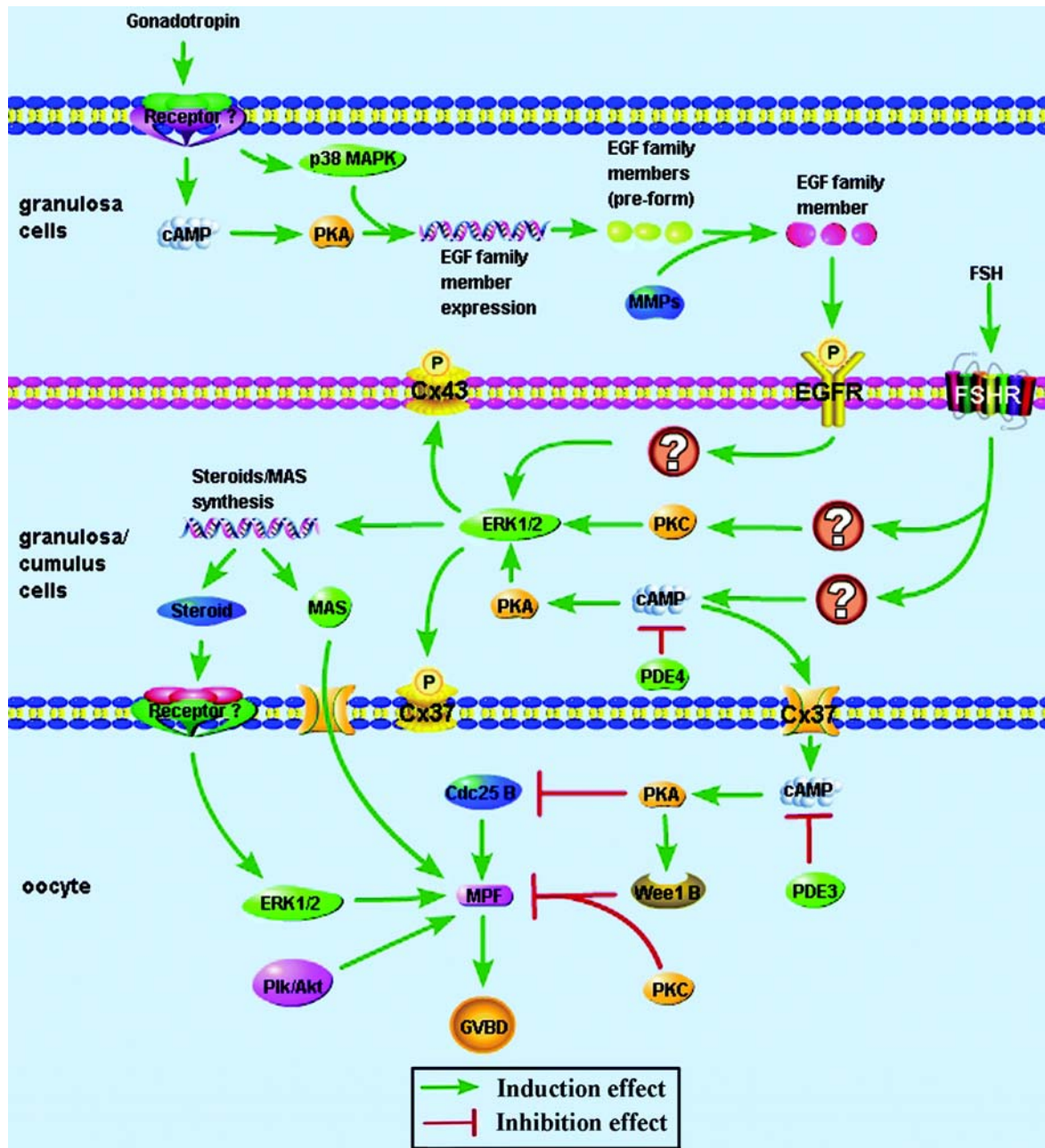


Figure 1. Schéma des voies de signalisation des MAP kinases (ERK et p38) impliquées dans la reprise de la méiose de l'ovocyte de mammifères (Liang et al., 2007). L'activation de récepteur de la protéine G GPR dans les cellules de granulosa conduit à l'activation de MAPK p38 et PKA, ce qui favorise l'expression des précurseurs de membres de la famille EGF. Après la transformation de ces précurseurs par des métalloprotéines (MMPs) en EGF mature, celui-ci induit l'activation du récepteur EGF dans les cellules du cumulus. Celui-ci active les ERK MAPK par l'intermédiaire d'une voie encore non identifiée. La FSH active son récepteur sur la membrane des cellules du cumulus, puis elle active les ERK MAPK via les voies PKC et PKA. L'autre rôle présumé des ERK MAPK dans les CC est de stimuler la synthèse de stéroïdes, qui se lie avec les récepteurs situés sur l'ovocyte et provoquer l'activation des MAPK ovocytaires. Les ERK MAPK dans les cellules de la granulosa / cumulus peuvent également provoquer l'inactivation des Cx37 et Cx43 dans les cellules somatiques et l'ovocyte, respectivement, et ainsi terminer le transfert de l'AMPc entre les CC et l'ovocyte. La dégradation de l'AMPc est catalysée par des phosphodiesterases (PDE), dont différentes isoformes sont présentes dans l'ovocyte et les cellules du cumulus.

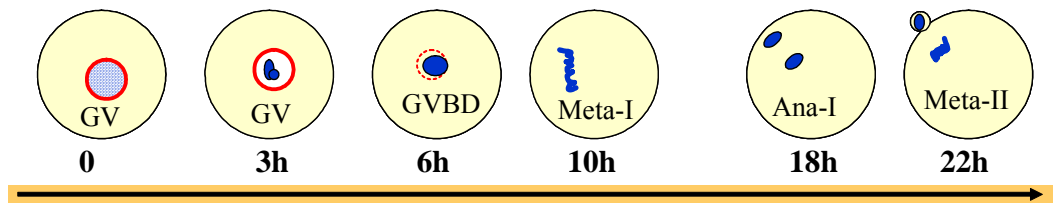
Des nombreuses protéines kinases sont impliquées dans les cascades de phosphorylations qui régulent les différentes transitions de la maturation nucléaire. Parmi les plus importantes les MAP kinases, sérine-thréonine kinases MAPK1 et MAPK3 (encore appelées ERK2 et ERK1 respectivement) sont présentes dans l'ovocyte bovin et sont activées à peu près en même temps que le MPF (Wehrend, Meinecke, 2001). La voie de signalisation des MAP kinases ERK joue un rôle central dans tout le déroulement de la méiose chez les vertébrés. Cette voie est impliquée dans l'organisation des microtubules, l'assemblage et la migration du fuseau méiotique, et joue un rôle dans l'absence de réplication de l'ADN entre les deux divisions méiotiques. Elles interviennent également dans le blocage de l'ovocyte en métaphase II à l'issue de la maturation et en attente de fécondation.. Dans l'ovocyte de xénope, les MAP kinases ERK sont activées au moins en partie par phosphorylation par la kinase MOS. L'inactivation de MOS dans les ovocytes porcins et bovins a permis de montrer que la voie des MAPK ERK n'est pas indispensable à l'activation du MPF (Takakura et al. 2005 ; Nganvongpanit et al. 2006) mais le MPF est indispensable à l'activation des MAPK (Josefsberg et al. 2003). L'activation artificielle des MAPK ERK dans les ovocytes est capable d'induire l'activation du MPF et conduire ainsi à la reprise de la méiose. Au contraire, l'activation des MAPK ERK dans les cellules folliculaires somatiques est nécessaire pour la reprise méiotique induite par les gonadotropines.

Dans l'ovocyte mammalien, l'activation du MPF joue un rôle clé dans les événements de la rupture de la vésicule germinale (Germinal Vesicle BreakDown ou GVBD: plissement et dégradation de l'enveloppe nucléaire). La diversité des cibles du MPF (lames B, histone H1 et certaines protéines associées aux microfilaments) peut expliquer le fait que ce complexe coordonne les différents événements nécessaires à la reprise de méiose et au bon déroulement de la maturation.

La GVBD est le premier signe visible de la maturation nucléaire. Elle se produit dans les heures qui suivent le pic préovulatoire de LH ou après 6 heures de culture in vitro. Les chromosomes se condensent durant et après la GVBD. Le fuseau se forme depuis les MTOCs ("microtubule organising center", structure équivalente au centrosome, celui-ci étant absent dans l'ovocyte) et les tubules s'ancrent sur les chromosomes qui se distribuent sur la plaque métaphasique de la première division méiotique (métaphase I). L'anaphase et la télophase sont rapides, les chromosomes homologues se séparent et migrent aux pôles du fuseau, dont l'un provoque une boursouffure de la membrane qui deviendra le premier globule polaire. Après la télophase, les chromosomes de l'ovocyte se répartissent rapidement sur une nouvelle plaque métaphasique alors que se forme le second fuseau méiotique (métaphase II). Le globule polaire contenant la moitié du complément chromatinien est expulsé dans l'espace périvitellin. C'est à ce stade qu'intervient l'ovulation chez la plupart des mammifères (à l'exception des canidés). L'ovocyte reste bloqué à ce stade de métaphase II par un facteur cytotatique (CSF) jusqu'à sa fécondation.

L'enchaînement des modifications de protéines impliquées dans différentes voies de signalisation par phosphorylation/déphosphorylation fait partie de la **maturation cytoplasmique** de l'ovocyte.

Cinétique de la maturation nucléaire de l'ovocyte bovin *in vitro*



2.2. Maturation cytoplasmiques de l'ovocyte.

En parallèle avec la maturation nucléaire, une réorganisation des composants cytoplasmiques de l'ovocyte a lieu (Mermillod, Marchal, 1999; Ferreira et al. 2009). L'ensemble des événements incluant la réorganisation des organelles, le stockage des ARNm, la synthèse, la dégradation ou la modification des protéines et des facteurs de transcription font partie de la maturation cytoplasmique de l'ovocyte. Le succès de cet aspect de la maturation dépend du stade de différenciation de l'ovocyte au moment de la reprise de méiose et il conditionne le succès ultérieur de la fécondation et du développement précoce. Au cours de la maturation, les granules corticaux, dérivés du complexe du Golgi, qui avaient une localisation cytoplasmique diffuse dans l'ovocyte, migrent vers la zone corticale en s'associant aux filaments d'actine du cytosquelette. Le réticulum endoplasmique (ER) également distribué de façon homogène dans le cytoplasme de l'ovocyte immature se concentre en clusters dans la zone corticale pendant la maturation. Les mitochondries très abondamment présentes (plus de 100 000 dans l'ovocyte mature (Shoubridge, Wai, 2007) forment des agrégats avec le ER dans la région périnucléaire en se déplaçant grâce aux microtubules. La réserve de l'ovocyte en lipides et la concentration en glutathion augmentent, reflétant les changements métaboliques profonds de l'ovocyte au cours de cette période. La reprise de la méiose est corrélée à une augmentation de la concentration de calcium dans le cytosol. Le calcium est relargué des stocks intracellulaires mais pourrait aussi pénétrer par les canaux ioniques de la membrane plasmique. Le potentiel calcique diminue pendant la VG – métaphase - I et remonte dès que l'ovocyte passe en métaphase - II (Tosti et al. 2000).

L'activité transcriptionnelle, fortement diminuée dans l'ovocyte dès la fin de sa croissance, devient totalement indétectable suite à la condensation des chromosomes en début de maturation. Pendant la maturation, les modifications post-transcriptionnelles des ARN messagers accumulés dans le cytoplasme sont la base de la régulation de l'expression génique dans l'ovocyte. Ces modifications incluent la déadénylation et la dégradation modérée des ARNm ainsi que la polyadénylation de certains transcrits maternels. Chez le bovin, tout un répertoire de transcrits maternels se sont avérés être déadénylés plutôt que dégradés après la maturation *in vitro* (Thelie et al. 2007, article 2). D'autre part, une polyadénylation des transcrits maternels a lieu au cours de la maturation à partir de la GVBD (vers 6-10 heures après le début de maturation) et elle est accompagnée par une augmentation significative de la synthèse des protéines qui se produit à la même période, puis décline pour atteindre le niveau de base au stade métaphase-II (Tomek et al. 2002). Chez le bovin la polyadénylation des transcrits et la néo-synthèse des protéines sont absolument nécessaires pour le déclenchement de la reprise de la méiose contrairement aux rongeurs. Un certain nombre de protéines sont synthétisées de

novo dans les ovocytes bovins pendant la MIV (Vigneron et al. 2004b), parmi eux CCNB1 (Levesque, Sirard, 1996) et MOS (Wu et al. 1997).

2.2.1 Régulation de la polyadénylation et de la traduction pendant la maturation de l'ovocyte.

Les mécanismes de la régulation post-transcriptionnelle dans l'ovocyte ont été en grande majorité découverts et étudiés chez le xénope (Osborne, Richter, 1997) et chez la souris (Kashiwabara et al. 2008) (de Moor, Richter, 2001; Racki, Richter, 2006). La régulation négative des transcrits se passe généralement via l'interaction des ARN-"binding" protéines avec des séquences plus ou moins spécifiques dans la partie 3' non codante des ARNm et/ou par des actions de micro-ARN et de petits ARN qui interfèrent ou qui participent à la dégradation de transcrits maternels (Bettegowda, Smith, 2007). Certains messagers, comportant dans leur région 3'-UTR des signaux spécifiques type CPE ("cytoplasmic polyadenylation element", il en existe plusieurs types), subissent une polyadénylation cytoplasmique et sont ensuite traduits au cours de la maturation ou plus tard après la fécondation. La CPE-binding protein (CPEB) régule la polyadénylation et la traduction de certains transcrits maternels portant la séquence CPE (par exemple le proto-oncogène MOS, la cycline CCNB1, le tissu type plasminogen activator TPA, les synaptonemal complex proteins 1 et 3 SCP1/SCP3,... (Racki, Richter, 2006). Chez le xénope, la polyadénylation cytoplasmique est contrôlée par plusieurs facteurs clés: CPEB, CPSF (cleavage and polyadenylation specific factor) et Maskin (Cao, Richter, 2002), capables de se lier à la fois à la séquence CPE, au site de polyadénylation nucléaire AAUAAA, et à la cap-(m7GpppN)-binding protein, eIF4E, tout en bloquant la polyadénylation (**Figure 2**). Dès que la CPEB est phosphorylée, elle stabilise l'interaction entre l'élément AAUAAA et le CPSF, ce qui conduit à un recrutement de poly(A)-polymérase (PAP) en 3' de l'ARNm (Mendez, Richter, 2001). En plus de ces facteurs de base, deux nouvelles protéines essentielles pour la polyadénylation cytoplasmique ont été récemment identifiées: la symplekin - protéine de liaison au CPEB et CPSF, et poly(A)-polymérase cytoplasmique GLD-2 (Barnard et al. 2004) qui régulent la répression et l'activation de la traduction des transcrits maternels (Rouhana, Wickens, 2007). Les homologues de toutes ces protéines existent dans d'autres espèces, néanmoins on sait peu de choses sur les mécanismes de régulation de la traduction chez les mammifères, en particulier chez les animaux domestiques ou chez l'homme. Chez le xénope, la CPEB est phosphorylée, au moins en partie, par Aurora-A (AURKA) (Andresson, Ruderman, 1998) – une protéine de la famille de sérine-thréonine kinases Aurora, qui sont des régulateurs clés de la mitose et sont impliquées dans la ségrégation correcte des chromosomes et la cytokinèse (Crane et al. 2004). Dans l'ovocyte de souris, AURKA est co-localisée avec CPEB, CPSF, PAP (polyA polymérase) et Maskin – tous étant des facteurs de contrôle de la polyadénylation et de la traduction. En plus, AURKA est impliquée dans la phosphorylation de CPEB au stade de métaphase - I (Hodgman et al. 2001). Toutefois, il n'est pas clairement établi que l'activation du CPEB par AURKA déclenche la cascade de phosphorylations des MAP kinases pour aboutir finalement à l'activation du MPF et à la maturation nucléaire, ou si AURKA lui-même a besoin du MPF pour être

phosphorylée et activée, alors que ces événements sont indépendants de la voie de MOS / MAPK (Maton et al. 2003). Néanmoins, dans l'ovocyte bovin, l'activation de AURKA semble indépendante de l'activité kinase du MPF (Vigneron et al., 2004 - article 17, Uzbekova et al. 2008 – article 5).

Polyadénylation cytoplasmique des transcrits dans l'ovocyte

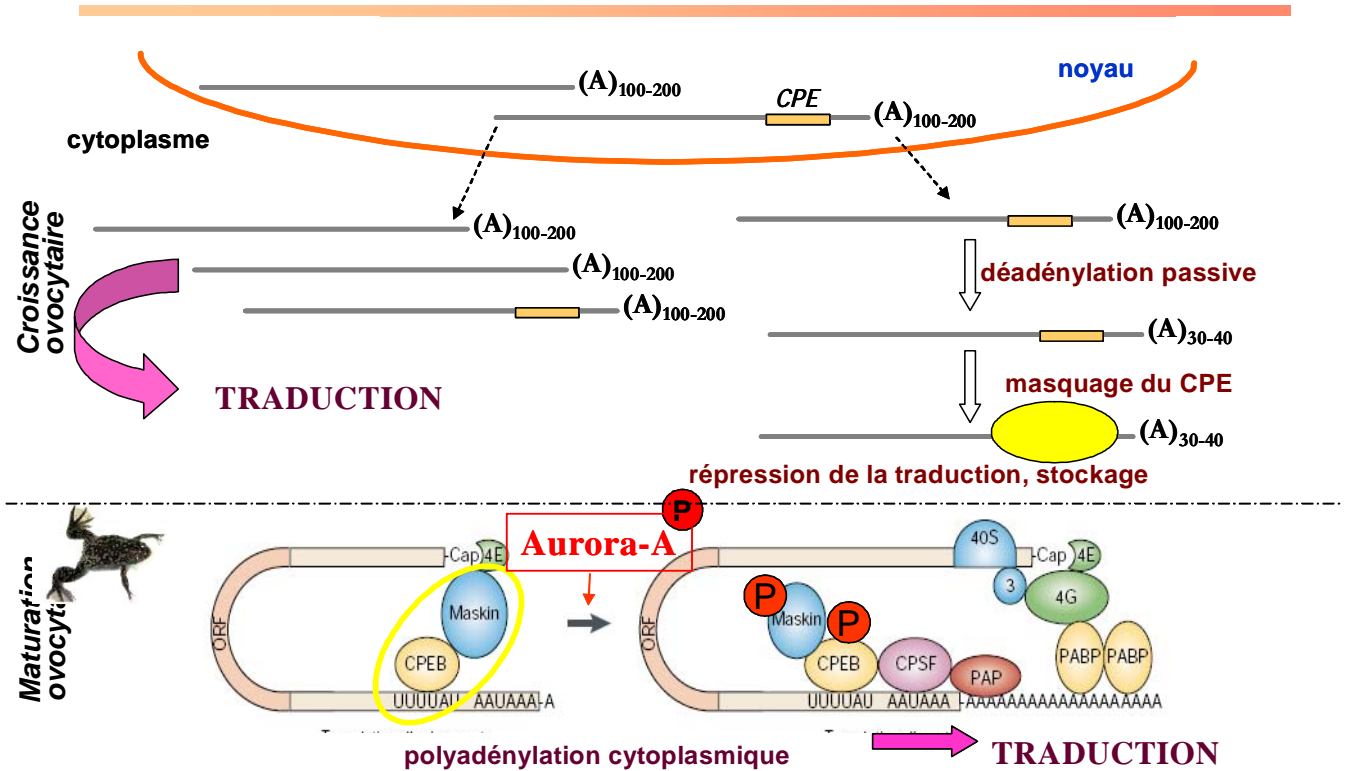


Figure 2. Schéma de l'implication de Aurora-A et de CPEB dans la polyadénylation cytoplasmique et l'initiation de la traduction dans l'ovocyte chez le Xénope. Une forme phosphorylée active de la kinase Aurora-A phosphoryle les protéines CPEB et maskin, ce qui permet le positionnement et la stabilisation de la CPSF, le recrutement de la PAP (polyA polymerase) et finalement l'élongation de la queue polyA. De même, la protéine eIF4E est recrutée pour former un complexe auquel se lie PABP (polyA-binding protein). PABP reconnaît également la queue polyA ce qui induit la circularisation de l'ARNm et favorise le déclenchement de sa traduction.

2.2.2. Modifications du contenu protéique de l'ovocyte pendant la maturation

L'ovocyte est une cellule particulière dans la mesure où les données transcriptomiques ne reflètent pas forcément le changement du contenu protéique. Sans prendre en compte le transport de certaines protéines entre les cellules de cumulus et l'ovocyte, une partie importante des ARN messagers ovocytaires ne sont pas traduits à l'instant de la transcription; mais une régulation fine des modifications post-transcriptionnelles par polyadénylation et deadénylation dirige la traduction. De nombreuses publications récentes ont fait la comparaison des transcriptomes des ovocytes matures (in vivo ou in vitro) et immatures - y compris chez la femme (Assou et al. 2006), (Gasca et al. 2007), (Wells, Patrizio, 2008), (Jones et al. 2008), chez la vache (Fair et al. 2007), (Katz-Jaffe et al. 2006), (Thelie et al, 2009) et chez le macaque (Lee et al. 2008). En fonction de la normalisation de données, plusieurs lots de gènes ont été montrés comme étant différentiels dans les ovocytes à différents stades de maturation. En règle générale, les plus variables sont les gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, la signalisation, le développement, le cycle cellulaire, la formation du cytosquelette et les communications cellulaires. Cependant, dans l'ovocyte, l'évolution du niveau des transcrits ne reflète pas nécessairement la concentration en protéine. Par exemple, les quantités d'ARNm CCNB1 (cycline B) et MOS ne changent pas entre ovocytes immatures et ovocytes maturés in vitro, pourtant les protéines correspondantes sont absentes dans l'ovocyte immature et sont synthétisées au cours de la MIV. La protéine ovocyte-spécifique MATER est présente au même niveau dans l'ovocyte avant et après MIV ainsi que dans l'embryon jusqu'au stade morula, contrairement à l'ARNm qui se dégrade progressivement (Pennetier et al. 2006, article 10).

Chez les ruminants et le xénope, la synthèse protéique est requise pour l'initiation de la maturation afin de produire les sous unités composant le MPF, contrairement aux rongeurs où le pré-MPF est déjà présent dans l'ovocyte immature et elle est nécessaire lors de la transition métaphase-I /métaphase-II, entre autres pour produire à nouveau de la cycline B, celle-ci étant dégradée en fin de première méiose par un processus ubiquitine-dépendant

Des analyses de la synthèse des protéines dans les ovocytes bovins avant et au cours de la maturation par l'incorporation de 35S-méthionine montrent un changement de profil protéique pendant la MIV du à la néo-synthèse (Kastrop et al. 1990), (Vigneron et al. 2004a). Par exemple, 130 et 136 spots correspondant aux protéines néo-synthétisées entre 4-8 h et 16 -20 h de MIV, respectivement, ont été visualisés sur un gel d'électrophorèse bi- dimensionnel dans les ovocytes bovins (Coenen et al. 2004).

Un grand nombre d'ovocytes est requis pour avoir une quantité suffisante de protéines pour une analyse protéomique classique. Ceci constitue un facteur limitant mais il est indispensable pour adopter une approche globale. L'analyse du protéome effectuée à partir de plus de 1000 ovocytes bovins par 2-DLCMS2 (two-dimensional liquide chromatography tandem mass spectrometry) a permis d'identifier 1092 protéines dans les ovocytes immatures et 4395 protéines dans les cellules du cumulus (Memili et al. 2007a). L'analyse différentielle quantitative du protéome des ovocytes bovins

immatures et matures la plus récente a été réalisée par marquage des protéines avec des cyanines et visualisation après gel 2D (2D-DIGE, plus de 5000 ovocytes utilisés). Cette approche a permis d'identifier 38 spots correspondant aux 10 protéines les plus différenciellement exprimées entre ovocyte immature (stade VG) et ovocytes matures (stade Métaphase-II) parmi les 3500 spots détectés au total (Berendt et al. 2009b). Étonnamment, aucune des protéines connues précédemment comme étant différenciellement exprimées dans ce modèle n'a été retrouvée dans cette étude. Une forme de glutathion S-transferase GSTM5 et de E2 (dihydrolypoyllysine-residue succinyltransferase, un composant clé du cycle de Krebs) était largement plus représentée dans l'ovocyte mature, tandis que les quantités de clusterine, peroxyredoxine PRDX3, du facteur d'élongation EF-1g, de la protéine 14-3-3e, 6PGL (6-phosphogluconolactonase) et de la TCTP (translationally controlled tumor protein) semblent être sous - exprimés au cours de la MIV. Sur le même modèle, par une approche similaire, un autre groupe a détecté 550 spots différentiels. Parmi les 40 protéines identifiées, on trouve la tubuline B, la peroxyredoxine PRDX2 et CCNE2, qui diminuent entre le stade VG et le stade Meta-II, et la disulfide isomérase qui augmente (Bhojwani et al. 2006). Parmi ces 550 spots détectés dans l'ovocyte bovin, entre 30 et 50% ont été trouvés comme étant phosphorylés à un moment ou un autre au cours de la maturation. Ainsi le changement de profil protéique au cours de la MIV est accompagné de phénomènes phosphorylation / déphosphorylation qui pourraient être un des mécanismes régulateurs majeurs de l'expression des gènes au cours de cette période.

En conclusion, l'ovocyte est une cellule très particulière, il doit subir un long processus de différenciation, finement régulé et touchant à la fois son noyau et son cytoplasme tout au long de la folliculogénèse, afin de devenir finalement un gamète de bonne qualité. L'ovocyte est au cœur de nombreux défis scientifiques (régulation du cycle cellulaire et la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes, par exemple) et technologiques (production d'embryon et technologies associées, par exemple). En même temps, l'ovocyte est l'objet de nombreux enjeux, tels que le contrôle de la fertilité chez les animaux domestiques et l'utilisation potentielle des travaux sur ces thématiques pour la sélection génétique basée sur la génomique, ainsi que l'amélioration des techniques de procréation assistée chez la femme.

Dans la description de mes travaux actuels, je vais tenter de cerner les apports de mes travaux dans ce domaine et comment j'envisage leur poursuite, dans un futur proche ou plus lointain.

B. Bilan d'activité de recherches

TRAVAUX ANTERIEURS

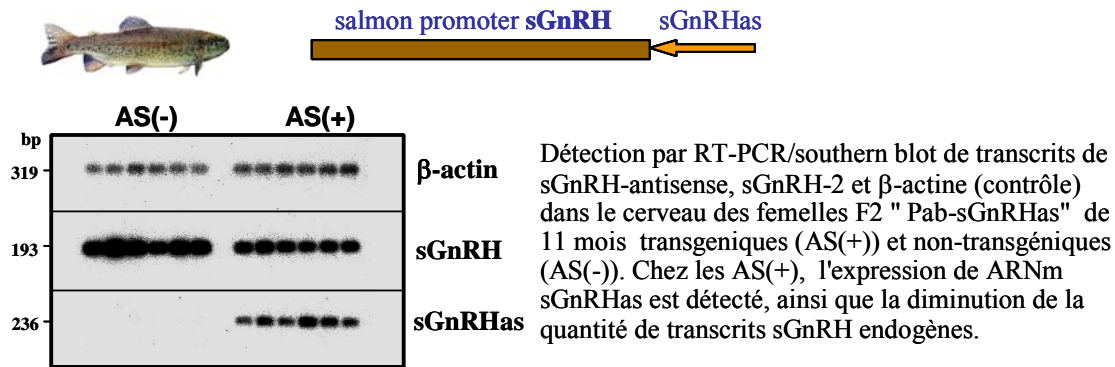
1. Caractérisation des lignées de poissons transgéniques exprimant l'ARN GnRH-antisens.

Les risques environnementaux liés à la dissémination de poissons transgéniques dans le milieu naturel sont liés aux modifications phénotypiques induites par le transgène, en particulier s'il confère un avantage reproductif important. Le projet européen "*Biological containment of transgenic fish and risk assessment of interspecies gene transfer*" avait comme objectif ultime de développer un **modèle de poisson stérile par transgénèse**. La stratégie retenue a été l'antagonisation de la production du sGnRH (une forme de GnRH hypophysiotrope) par un transgène **ARN antisens** du **sGnRH** de saumon, pouvant théoriquement induire une stérilité d'origine centrale. L'intérêt de cette approche portait sur la capacité à restaurer une gamétogénèse par l'action périphérique d'extraits hypophysaires. Des séquences promotrices des gènes de **sGnRH** ou de **l'histone H3** de saumon ont été utilisées pour induire l'expression de l'ARNm antisens du sGnRH ainsi que les gènes – marqueurs dans les truites transgéniques.

Pour ce travail, j'ai mis en œuvre la technique de transgénèse des ovocytes fécondés de la truite par micro-injection cytoplasmique ainsi que tout un ensemble de méthodes de détection d'expression des transgènes aux niveaux ADN, ARN et protéine, qui m'ont servi pour plusieurs études sur des lignées transgéniques (**articles 18, 24, 26, 27**).

J'ai ainsi pu obtenir des lignées transgéniques *Promoteur-sGnRH-sGnRHantisens* exprimant le transgène majoritairement dans le cerveau mais aussi dans les gonades (**Figure 3**). Cette expression diminue la quantité d'ARNm sGnRH dans le cerveau et le niveau de GnRH dans l'hypophyse des poissons transgéniques adultes, mais les niveaux de gonadotrophines FSH et LH ne sont pas différents chez les transgéniques par rapport aux non transgéniques. Malgré quelques perturbations de la gamétogénèse (poids de gonades moindre chez les transgéniques), ces lignées n'étaient pas stériles (**article 24**). Cela est probablement dû d'une part à une expression insuffisante du transgène et d'autre part à l'utilisation de promoteur et de séquence hétérologue. En fait, nous avons montré par ailleurs l'existence de deux gènes codant pour sGnRH chez la truite (**article 21**).

Les lignées portant le transgène de *sGnRHantisens* sous contrôle du promoteur ubiquiste de **l'histone H3** expriment fortement le transgène dans les **gonades** des animaux immatures. Deux mâles - fondateurs sur quatre ne se sont pas reproduits naturellement au bout de 3 ans, alors que tous les animaux non transgéniques de cette cohorte se sont reproduits à un an (contrairement au protocole expérimental, les femelles n'ont pas été gardées jusqu'à l'âge de la maturité qui est de 2-3 ans). Chez ces animaux « **stériles** », une spermatogénèse



346 S UZBEKOVA and others · GnRH antisense RNA expression in transgenic trout

TABLE 1. Comparative physiological analysis of transgenic AS(+) and nontransgenic AS(-) fish from 'Pab-sGnRH-antisense' F2 transgenic families

Parameters	Males 11-months-old		Females 11-months-old		Females 20-months-old	
	AS(-) (n=43)	AS(+) (n=39)	AS(-) (n=34)	AS(+) (n=41)	AS(-) (n=14)	AS(+) (n=16)
Weight (g)	187 ± 33	180 ± 27	162 ± 31	165 ± 39	1096 ± 56	905 ± 49
GSI (%)	0.28 ± 0.27	0.25 ± 0.20	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.03	10.02 ± 0.99	5.99 ± 1.34
sGnRH in brain (pg/ μ g protein)	2.36 ± 1.59	2.60 ± 1.89	3.30 ± 0.21	2.54 ± 1.25	6.87 ± 0.53	7.43 ± 0.75
sGnRH in pituitary (pg/pituitary)	416.3 ± 35.2	271 ± 24.9	298.3 ± 33.9	257 ± 17.4	3112 ± 379	2223 ± 247
FSH, plasma level (ng/ml)	3.08 ± 0.31	2.99 ± 0.32	3.11 ± 0.50	3.73 ± 1.10	7.38 ± 1.51	8.48 ± 1.74
LH, plasma level (ng/ml)	0.48 ± 0.17	0.41 ± 0.18	0.33 ± 0.03	0.35 ± 0.03	2.68 ± 0.31	5.26 ± 2.28

Values considered to be significantly different ($P < 0.05$) are in bold.

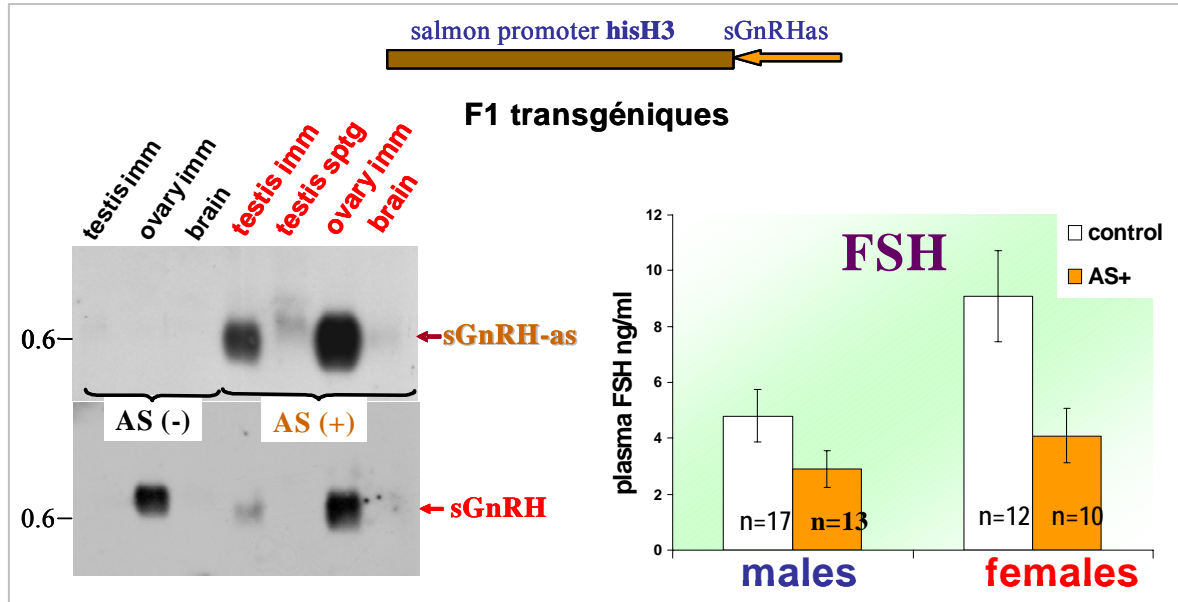


Figure 3. Analyse de lignées de truite transgéniques exprimant sGnRH-antisens soit sous le promoteur spécifique (sGnRH, image et tableau en haut) soit ubiquiste (histoneH3, image en bas). Les animaux descendant du même géniteur transgénique croisé avec une femelle contrôle ont été comparés : AS(+) - portant le transgène, AS(-) - non-transgéniques.

transitoire a pu être induite par administration d'extrait hypophysaire. L'étude répétée sur la descendance (80 mâles) a confirmé ce résultat en F1, montrant une très significative diminution du nombre d'animaux entrant en spermatogenèse à un an dans cette famille (19% transgènes vs 58 % témoins). Le taux de la FSH et l'index gonado - somatique (**GSI**, poids gonades/poids corporel) ont significativement diminués chez les animaux transgéniques immatures (**Figure 3**).

Nous avons conclu que l'action d'un transgène dans ces lignées est **multisite** et plus particulièrement **gonadique**. En F2, l'expression du transgène diminue très fortement par rapport au F1. A l'âge de deux ans, nous n'avons pas observé de différence significative entre les mâles F2 transgéniques et non transgéniques. L'analyse de l'ADN génomique de ces animaux a montré la **ségrégation** et une **forte méthylation** des multiples copies du transgène, donc l'arrêt de l'expression. Au finale, cette lignée a s'avéré de ne pas être stable au niveau de l'expression du transgène. Cependant nous avons clairement montré que ARNm sGnRH-antisens exprimé au niveau gonadique peut bloquer la reproduction spontanée des poissons transgéniques.

2. Expression des gènes codant pour les peptides apparentés au GnRH et leur récepteurs dans les gonades de truite arc-en ciel.

Pour tenter d'expliquer l'effet des ARNm **sGnRHantisens** sur la gamétogenèse, nous avons suivi l'évolution de l'expression de gènes codant pour deux formes de GnRH connues chez la truite (sGnRH et cGnRH-II) ainsi que deux isoformes de leurs récepteurs dans les gonades de truite au cours du cycle sexuel. Nos résultats montrent que dans les ovaires de truite, gènes codant pour sGnRH et cGnRH-II ainsi que ses récepteurs GnRH-R1 et GnRH-R2 ont exprimé différemment au cours de l'ovogenèse, la maturation ovocytaire, avant et après l'ovulation. Les gènes **sGnRH-1 et sGnRH-2** subissent en plus des **épissages alternatifs** différentiels et leur expression est également stade - dépendant (**articles 19, 20, 22**). A l'intérieur de l'ovaire, ces gènes sont exprimés de façon différente dans la granulosa, la thèque ou l'ovocyte (**article 20**).

Chez les organismes supérieurs, l'expression des peptides de type GnRH a été décrite également dans les gonades humaines (Dong et al., 1993), plus précisément dans les cellules de granulosa. Selon la littérature, les peptides de type GnRH auraient des effets directs sur la prolifération, la capacité de réguler la stéroïdogenèse, la stimulation de la reprise de la méiose des ovocytes in vitro chez les poissons (Habibi et al., 1988); ils pourraient être réprimés par les œstrogènes (Radovick et al., 1991) et être impliqués dans l'apoptose. Chez la **vache**, les ARNm du récepteur de GnRH ont été mis en évidence dans les COC après la MIV. En plus, in vitro, le GnRH (0.8 microgram/ml) et ses agonistes augmentent le taux de clivage après la fécondation (Funston, Seidel, 1995).

En conclusion, l'ensemble de ces données nous conforte dans l'idée que les produits de gènes du GnRH sont probablement impliqués dans le contrôle paracrine de l'ovogenèse chez les vertébrés.

PROJETS DE RECHERCHE ACTUELS.

Depuis plusieurs décennies, une baisse de fertilité constante chez les vaches laitières hautes productrices (VLHP) notamment dans la race Holstein est observée (Barbat et al. 2005). Cette dégradation de fertilité se manifeste essentiellement sur les étapes précoces du développement embryonnaire en relation avec la qualité de l'ovocyte (Humblot 2001). La capacité de l'ovocyte à être fécondé et à donner un embryon viable constitue le principal facteur limitant pour permettre une gestation du fait du rôle prépondérant de l'ovocyte au cours des premiers stades embryonnaires (Lonergan et al. 2003 ; Humblot et al. 2005). La qualité de l'ovocyte en terme de sa capacité à maintenir le développement embryonnaire dépend du succès de sa différenciation et de sa maturation terminale. Ce succès repose sur un **dialogue** entre l'**ovocyte** et cellules de granulosa qui l'entourent, notamment les cellules de **cumulus**.

Mes travaux réalisés au sein de l'équipe "Follicule, ovocyte et développement" ont pour **objectifs à:**

- a) contribuer dans la compréhension de mécanismes moléculaires de la maturation ovocytaire par l'analyse des gènes exprimés dans l'ovocytes et cellules de cumuls
- b) rechercher les marqueurs de la qualité de l'ovocyte : ceux qui sont exprimés dans l'ovocyte même et ceux qui reflètent son état, mais qui sont exprimées pas les cellules de cumulus.

Mes recherches actuelles portent essentiellement sur la **différenciation moléculaire de l'ovocyte** au cours de sa maturation et **l'interaction entre l'ovocyte et les cellules de cumulus**.

1. Dialogue ovocyte-cumulus

Le couplage métabolique entre ovocyte et cellules de granulosa notamment cumulus oophorus et les échanges continus des substances entre ces types cellulaires tout au long de la folliculogénèse sont déterminants dans la maintenance de l'arrêt méiotique et l'acquisition de la compétence au développement par l'ovocyte. Pendant la maturation *in vitro* des ovocytes bovins, la présence de cellules de cumulus favorise le taux de fertilisation et le développement en comparaison avec les ovocytes maturés dénudés (Zhang et al. 1995), (Fatehi et al. 2002). Une des raisons qui explique ce phénomène est le déficit en synthèse de GSH (glutathions) par les ovocytes dépourvus de son cumulus. Pourtant, en mettant des ovocytes dénudés en présence des COCs entières (mais pas les CC détachées) durant la MIV et la FIV, la compétence de ces ovocytes pour se développer jusqu'au stade de blastocyste est retrouvée (Luciano et al. 2005). Cependant, même après une maturation dans COCs *in vitro*, les ovocytes n'atteignent pas la qualité des ovocytes maturés *in vivo* chez le bovin (Holm et al. 2002; Rizos et al. 2002a; Rizos et al. 2002b), et chez la souris (Kim et al. 2004).

Pour mieux comprendre les mécanismes d'interactions entre l'ovocyte et les cellules de cumulus et le rôle des CC dans l'acquisition de la qualité ovocytaire, nous avons utilisé différentes méthodes pour comparer :

- **Les ovocytes** bovin maturés en complexes cumulo-ovocytaires (**COC**) et les ovocytes maturés dénudés (**DO**)
- **Les cellules de cumulus** des COCs maturés **in vivo** extraites de follicules par ovum-pick-up (**CC OPU**) et **des** COCs maturés **in vitro** (**CC MIV**)

1.1. Compétence au développement *in vitro* de COC vs DO

Nous avons comparé le taux de maturation et de développement *in vitro* COC et DO dans nos conditions expérimentales. Le pourcentage d'ovocytes arrivés à la métaphase-II ne diffère pas entre COC et DO. Le taux de clivage entre ces groupes n'est pas différent après l'activation de parthénogénèse par ionomycine/ 6-DMAP, mais il est moindre dans DO après la FIV en coculture avec COCs (**Figure 4**). Le taux de blastocystes obtenu par parthénogénèse est similaire entre COC et DO, par contre après la FIV et en comparaison avec les COC, beaucoup moins de DO arrivent à ce stade. Le pourcentage de blastocystes qui sont expansés et éclos après 8 jours de culture est moindre dans le groupe DO par rapport au COC, et cela est observé pour les embryons dans les deux cas – obtenus par parthénogénèse et après la FIV. Donc, il ressort clairement, que la qualité des ovocytes maturés dénudés est moindre comparée au COC, surtout par rapport à leur capacité de s'associer avec le génome paternel (taux de clivage) et de passer la phase de la transition maternelle embryonnaire (taux de blastocystes).

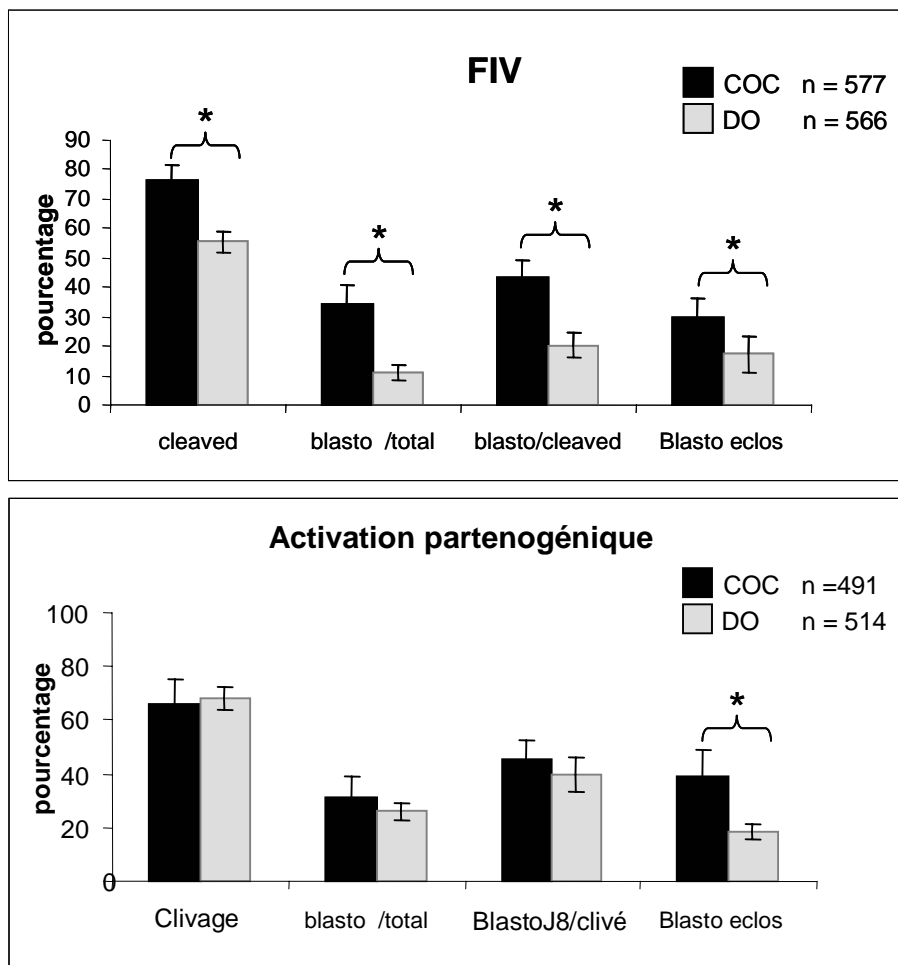


Figure 4. Taux de développement des ovocytes maturés avec (COC) ou sans cellules de cumulus (DO) après la fécondation in vitro ou après l'activation de la parthénogénèse par ionomycine/6-DMAP). * - différence est significative (Student test, $P < 0.05$)

1.2. Comparaison COC et DO par les approches de génomique fonctionnelle.

Pour comparer les **profils transcriptomiques** entre COC et DO, nous avons réalisé des hybridations de puces à ADN. Pour cela nous avons développé et validé un certain nombre d'outils. Pour compléter une banque soustraite d'ADNc de l'ovocyte bovin obtenu par S. Pennetier avec mon aide, j'ai regroupé une collection de 165 clones représentant 99 gènes d'intérêt. Ces clones ont été obtenus soit par recherche *in silico* des séquences par rapport aux gènes humains identifiés préalablement dans l'ovocyte bovin (Dalbies-Tran, Mermillod, 2003) et ont été recherchés via le Centre de Ressources Biologiques GADIE (Jouy en Josas), ou produits localement par un sous-clonage à partir de l'ADNc des ovocytes de vache. Ce macroarray comporte donc 934 clones ADNc exprimés préférentiellement dans l'ovocyte bovin (Pennetier et al., 2005 - **article 11**). Je me suis également investie dans les tests de validité d'un autre macroréseau d'ADNc bovin nommé MEM (muscle, embryon et glande mammaire), comportant 2304 clones réalisés dans le cadre du programme ROGER, impliquant 5

groupes INRA. Pour ma partie, j'ai réalisé sur ces réseaux les hybridations des cibles d'ovocyte bovin, montrant que 56% des sondes sont détectées (**article 12**).

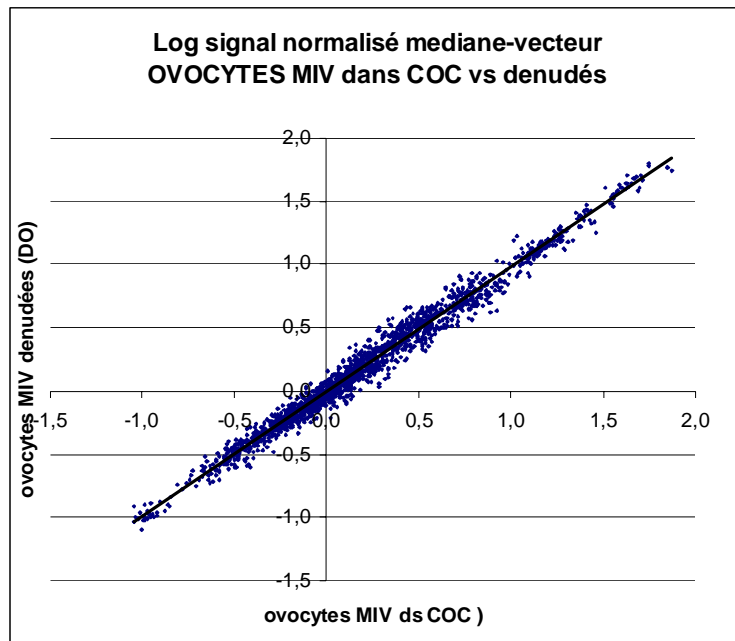


Figure 5. Comparaison des transcriptomes des ovocytes maturés dans COC ou dénudés DO. Graphique représente le log ratio des signaux normalisés obtenus par l'hybridation de macroarray comportant 934 clones ADNc exprimés préférentiellement dans l'ovocyte. Les profils transcriptomiques COC et DO sont très similaires.

Pour l'analyse transcriptomique COC et DO, nous avons utilisé deux macroarrays décrits et aussi une puce à oligonucléotides fait par CRB (puce 22K d'oligo bovins présentent plus de 15000 gènes). Seulement les ovocytes ayant réellement atteint le stade de métaphase II et triés par la présence d'un globule polaire ont été sélectionnés pour constituer les cibles représentant ces deux groupes. Les résultats d'analyse par hybridation montrent que **très peu** de gènes sont différemment exprimés entre ces groupes (**Figure 5**). Par exemple, sur plus de 10000 gènes détectés exprimés dans l'ovocyte, seulement une vingtaine de gènes différentiels ont été trouvés après le traitement statistique des 8 jeux de données (4 répliques biologiques COC vs DO analysés "en swap", analyse différentielle en variance mixte, FDR 5%, $p < 0.05$, ratio d'expression ou "fold change" > 1.5). Les gènes différemment exprimés sont impliqués dans la régulation de la transcription (*MED10*, *LEO1*) et de la traduction (*RPS20*, *EiFIAX*), ainsi que dans le métabolisme et la réponse au stress oxydative (*NDUEFA13*, *PRDX2*). L'analyse d'expression de ces et certains autres candidats est en cours de validation par PCR en temps réel.

Compte tenu du fait que les transcriptomes DO et COC sont très similaires, la différence de compétence au développement entre ces groupes pourrait résider dans des différences de **synthèse ou d'activation protéique**. J'ai donc comparé les niveaux protéiques de certaines facteurs méiotiques tels que CCNB1, AURKA, phospho-MAPK3/1 et TUBA, ainsi que le profil global sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE entre COC et DO (**protéome**), mais aucune différence significative n'a pu être mise en évidence. Nous poursuivons la comparaison de DO et COC par l'analyse de profils protéiques obtenus par la spectrométrie de masse (ICM-MS, partie 3.2).

Au cours de ce travail, j'ai encadré deux stagiaires en deuxième année de l'IUT Bioinformatique (2 mois), en leurs confiant certaines analyses bioinformatiques et expérimentations par PCR en temps réel. Le travail est poursuivi actuellement sous ma direction en collaboration avec un étudiant en stage postdoctoral, et la plateforme de protéomique du Centre INRA de Tours.

1.3. Analyse de l'expression génique dans les cellules de cumulus au cours de la maturation : modèles in vitro et in vivo.

Il est bien documenté, que les ovocytes maturés in vivo ont une capacité au développement nettement plus élevé par rapport à ceux qui ont subi la MIV. Il paraît évident que les CC sont également très différents en terme de l'expression génique dans ces conditions.

Depuis 2007 j'encadre un doctorant, Mohamad Salhab, qui réalise une thèse dont les buts est de préciser le rôle du dialogue ovocyte/cumulus dans la régulation des modifications transcriptionnelles et fonctionnels de ces deux populations cellulaires au cours de la maturation chez le bovin. L'objectif est de caractériser les facteurs s'exprimant dans les cellules du cumulus et qui sont responsables du fait que l'ovocyte bovin mûri in vitro reste moins compétent pour le développement par rapport à celui qui est mûri in vivo.

Dans un premier temps, nous avons utilisé une approche de **gènes candidats**. Parmi les gènes connus être impliqués dans la stéroïdogénèse et l'apoptose, plusieurs ont été étudiés par RT-PCR en temps réel dans les CC au cours de la maturation in vitro. L'expression des gènes *STAR*, *COX2*, *BAX* et *PGR* augmente au cours de la MIV, *ACTB* diminue, et *TGFβ* et *ERS2* sont stables entre CC immatures et matures. Par une approche plus **globale**, en utilisant un macroarray ADNc MEM bovins (Bernard et al.2005, **article 12**), nous avons mis en évidence plusieurs gènes potentiellement différentiels au cours de la MIV. Parmi les gènes, qui augmentent l'expression pendant la MIV, sont *TMSB4* (Thymosin B4) et *TMSB10* (Thymosin B10). Leur expression a été étudiés dans les CC de différents modèles : i) COC maturés in vitro dans les milieux différents, ii) CC des vaches adultes et des veaux, iii) COC maturés in vitro et in vivo. Par RT-PCR en temps réel, nous avons confirmé l'augmentation de l'expression de *TMSB4* et *TMSB10* au cours de la MIV et montré la surexpression de ces gènes dans les CC maturés in vivo par rapport à la MIV. L'immunolocalisation de *TMSB10* dans les CC suggère qu'il jouerait un rôle dans le remodelage du cytosquelette des CC au cours de leur expansion.

Le travail s'est poursuivi en utilisant microarray "CRB 22K oligo bovins" pour l'étude transcriptomique des CC. Nous avons comparé CC des COCs maturés in vitro (**MIV**) versus ceux maturés in vivo et prélevés par ponction (**OPU**). Les premières analyses montrent que plus de 150 gènes sortent comme différentiellement exprimés après l'analyse de variance de gènes individuels et plus de 700 après l'analyse de variance mixte entre ces conditions (package statistique Anapuce, False Discovery Rate < 1%). Une surexpression d'un facteur >10 pour la Glutathione S-transférase *GSTA1*, proto-oncogène *FOS* et thioredoxine-interacting protein *TXNIP* a été observée dans les **OPU**. Pour la condition MIV, les gènes les plus différentiellement surexprimés sont *SERPINA5* (plasma serine

protéase inhibitor) et *MMP9* (matrix metalloproteinase-9). L'analyse des résultats pour attribuer une fonctionnalité à l'ensemble des gènes différentiels via "Gene Ontology", définir les voies de signalisation dont ils font partie (via "Ingenuity") et valider leur expression différentielle est actuellement en cours.

2. Régulation méiotique de l'ovocyte

2.1. Etude de gènes - candidats préférentiellement exprimés dans l'ovocyte.

Notre groupe a travaillé également sur l'étude de gènes candidats spécifiques à l'ovocyte. Il s'agit principalement d'orthologues de gènes ovocyte spécifiques découverts chez la souris. Le travail collectif sur l'identification et l'étude de ces candidats a abouti à plusieurs articles dont je suis auteur principal* ou co-auteur (gène *ZAR1*, **article 9***, gène *MATER*, **article 10**; gène *NALP9*, **article 14**).

Gène "Zygote Arrest 1" (ZAR1) chez le bovin, le porc et l'humain

Ce travail a été en partie effectué par Monica Roy-Sabau au cours de son stage de 4 mois sous ma responsabilité et qui est en co-auteur de l'article.

Chez la souris, l'ablation du gène *zar1* par knock-out amène à un blocage complet du développement de l'embryon au stade de 2 cellules. Ce gène est conservé chez toutes les espèces vertébrées étudiées (Wu et al. 2003), mais il n'était pas encore connu chez les animaux domestiques. J'ai étudié ce gène chez le bovin et le porc en parallèle avec le gène *ZAR1* de l'ovocyte humain (collaboration avec V. Cadoret et D. Royère, CHRU de Tours).

Nous avons mis en évidence plusieurs transcrits différemment épissés pour ce gène et les ADNc correspondants ont été clonés à partir des ARN d'ovocytes bovins et porcins. Dans ces deux espèces, ce gène est fortement exprimé dans l'ovaire et les testicules, plus faiblement dans l'hypothalamus et l'hypophyse, et absent des autres tissus somatiques analysés. Chez ces deux espèces, la quantité de transcrits polyadénylés diminue très significativement pendant la maturation in vitro, se dégrade ensuite au cours de l'embryogenèse précoce et la transcription n'est pas réactivée lors de l'activation du génome embryonnaire.

Les transcrits détectés dans l'ovaire ont une taille supérieure par rapport à ceux qui sont présents dans le testicule : il s'agit d'un épissage tissu - spécifique du gène *ZAR1*, que nous avons mis en évidence pour la première fois chez le porc, le bovin et l'humain (**Figure 6**). L'hybridation in situ dans l'ovaire montre que *ZAR1* est exprimé exclusivement dans l'ovocyte dès le stade des follicules primordiaux, et dans le testicule il est préférentiellement exprimé dans les spermatides rondes.

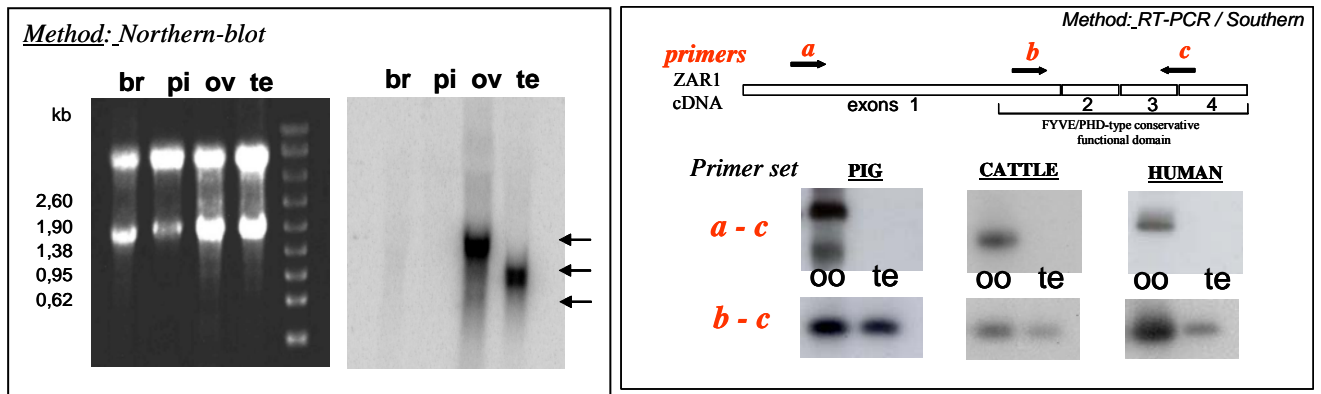


Figure 6. A gauche : Détection de l'ARN ZAR1 par Northern blot chez porcine.br –cerveau, pi – hypophyse, ov – ovaire, te -testis **A droite :** Schéma des ARNm différemment épissés dans l'ovocyte et le testicule. Epissage alternatif des transcrits ZAR1 dans les cellules germinales chez le porcine, bovine et humaine et mise en évidence par RT-PCR dans l'ovocyte (oo)

En analysant la séquence nucléotidique des gènes ZAR1 chez ces trois espèces, j'ai trouvé différents **éléments de régulation post-transcriptionnelle** : nombreuses séquences **palindromiques** répétées dans les séquences codantes, et dans 3'-UTR - Pumilio-binding site et EDEN (embryo-deadenylation element). Ces éléments indiquent que ZAR1 peut être impliqué dans la régulation de la transcription, et qu'il est lui-même régulé au niveau post-transcriptionnel.

Autres gènes candidats spécifiques à l'ovocyte ont été étudié par notre groupe : MATER et NALP9 (articles10, 14). Ces gènes ont des points communs – outre son expression préférentielle dans l'ovocyte, les taux de leur transcrits total et polyadénylés baissent dans l'embryon précoce et leur transcription ne redémarre pas après l'activation du génome embryonnaire. Pourtant, les travaux récents de notre groupe ont montré que les profils transcriptomiques de ces gènes (ZAR1, MATER, NALP9) au cours de la maturation ne semblent pas refléter la qualité de l'ovocyte, car ils varient de façon similaire quelques soit les conditions de la maturation - in vivo ou in vitro (Thélie et al., 2007 **article 6**), l'age des animaux (vache adulte vs veau) ou taille folliculaire (follicules < 4 ou >6 mm) ou dans (R. Romar et al., submitted). Néanmoins, la quantité de l'ARNm polyadénylé ZAR1 et NALP9 est subtilement diminuée dans les ovocytes des animaux prépubertés par rapport aux vaches adultes.

2.2. Protéines et voies de signalisations impliquées dans la maturation ovocytaire

La majorité d'études de signalisation méiotique chez les vertébrés sont menés chez le xénope et la souris, et plusieurs voies de signalisation impliquées dans la méiose ovocytaire ont été décrites (MAPK ERK, MPF, insuline/PI3K, MAPK p38); néanmoins les ovocytes de grands mammifères ont aussi été étudié (Abrieu et al., 2001, Villa-Diaz & Miyano, 2004; Tomek & Smiljakovic, 2005; Acevedo et al., 2007;). Chez le bovin, l'activation des voies principaux tels que MAP kinases ERKs, JNK, PKB/AKT, MAPK p38, AMPK, Aurora-A a été également montré (Vigneron 2004, **article 17**, Uzbekova et al – **articles 1, 5**). Inhibition spécifique de telle ou telle voie pendant de la MIV mène au blocage de la méiose. Dans mes travaux décrits ci-dessous, j'ai suivie plusieurs protéines kinases en utilisant parmi d'autre une approche fonctionnelle telle que la modulation spécifique de l'activité kinase par les inhibiteurs spécifiques.

2.2.1. Aurora kinases chez le bovin (article 5)

Au cours de l'analyse de la banque des transcrits ovocyte – spécifique (Pennetier et al, 2005, **article 11**), la surexpression très significative du gène codant pour Aurora A (AURKA) a été remarquée. L'augmentation de la quantité de la protéine AURKA dans l'ovocyte bovin pendant la MIV, ainsi que le rôle potentiel de cette kinase, en parallèle à l'activité du MPF et autres kinases impliquées dans la régulation et la coordination des événements méiotiques nucléaires et cytoplasmiques (MAPK, PKB, JNK) ont été mis en évidence avec une étudiante en thèse, Céline Vigneron (**article 17**). En collaboration avec l'équipe « Cycle cellulaire » de l'UMR 6061 du CNRS de Rennes (Yannik Arlot-Bonnemains et Claude Prigent), j'ai poursuivi les recherches sur la famille d'Aurora kinases pour définir leurs rôles potentiels dans l'ovocyte bovin.

Dans ce travail j'ai montré que les ARN messagers d'Aurora A, B et C sont surexprimés dans l'ovaire et le testicule bovin par rapport aux autres tissus somatiques. Les protéines correspondantes sont détectées dans l'ovocyte et le testicule.

Les profils d'expression des ARN et des protéines d'Aurora A, B et C dans l'ovocyte sont différents au cours de sa croissance, lors de la maturation in vitro et du développement embryonnaire précoce. Les ARNm de Aurora A et C sont stables durant la MIV, mais diminuent fortement au stade morula et blastocyste, tandis que l'ARNm de Aurora B réinitialise son expression après l'activation du génome embryonnaire. **Aurora A** est la forme la plus abondante dans l'ovocyte; la protéine est accumulée progressivement dans le cytoplasme au cours de la croissance folliculaire et de la maturation, son profil d'expression dans l'ovocyte est très différent de celui des cellules somatiques. Aurora B est associée aux chromosomes de l'ovocyte en métaphase I/II de la méiose. Aurora C est très peu exprimée

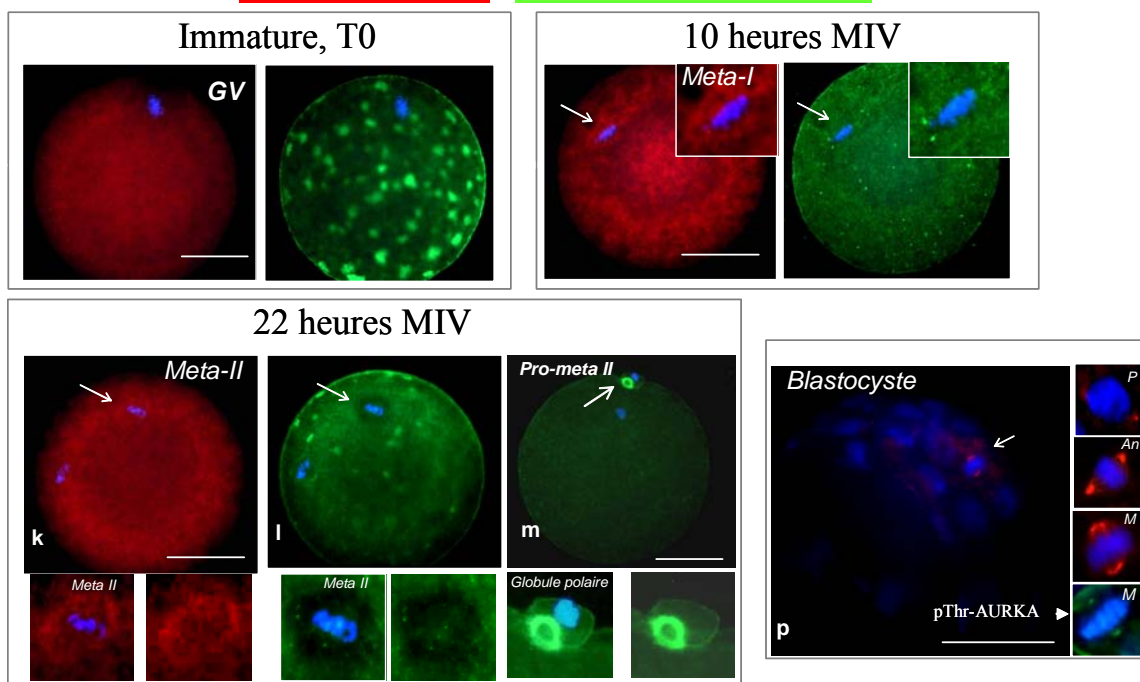


Figure 7. AURKA (protéine totale, fluorescence rouge) est distribuée dans le ooplasme, et se concentre sur le fuseau méiotique dans l'ovocyte. Phospho-Thr-AURKA (fluorescence verte) est localisée dans MTOC dans les ovocytes immatures et sur l'anneau contractile entre ooplasme et GP dans l'ovocyte mature. Dans le blastocyste, AURKA et sa forme active sont présentes seulement dans les cellules mitotiques et concentrées sur les pôles du fuseau et centrosomes.

dans l'ovocyte. Les trois kinases Aurora, y compris Aurora A active, ont été détectées concentrées sur l'anneau contractile / "midbody" entre l'ovocyte mature et le premier globule polaire (**Figure 7**). L'administration durant la MIV de VX680, l'inhibiteur spécifique de l'activité kinase d'Aurora, diminue l'expression des ARNm MOS et génère des ovocytes multinucléaires par des divisions méiotiques anormales sans expulsion du globule polaire. Nos résultats suggèrent que les Aurora kinases sont fortement impliquées dans la méiose ovocytaire chez le bovin et sont en cohérence avec les données chez la souris et la truie qui sont apparues après notre publication (Swain et al. 2008, Saskova et al. 2008, Nishimura et al., 2009). Aurora A a certainement un rôle dans la transition entre la première et la deuxième division méiotique et l'expulsion du globule polaire. Nous avons voulu savoir également si AURKA est impliquée dans les régulations de la polyadénylation des transcrits maternels portant CPEs via CPEB. Parmi ceux qui portent ce séquence CPE, on y trouve les gènes déterminantes de la méiose : CCNB1, CDK1 et MOS.

2.2.2. Expression de régulateurs de la méiose (CPEB, CCNB1, MOS, CDK1) dans l'ovocyte bovin au cours de la MIV.

Les événements méiotiques sont régulés par plusieurs facteurs. Certains sont traduits au cours de la maturation et peuvent être régulés par CPEB comme chez le xénope (chapitre B). Nous avons démontré que CPEB est présente dans l'ovocyte bovin, et elle est différenciellement phosphorylée durant la maturation (Uzbekova et al., 2008 - **article 5**). CPEB est majoritairement dégradée dans

l'ovocyte mature, mais ce qui reste est concentré sur l'anneau contractile entre l'ovocyte et le globule polaire au moment de l'expulsion (**Figure 8**). AURKA active (phosphorylé sur Thr) et les autres Aurora kinases sont également concentrées à cet endroit (Uzbekova et al., 2008 – article 5)

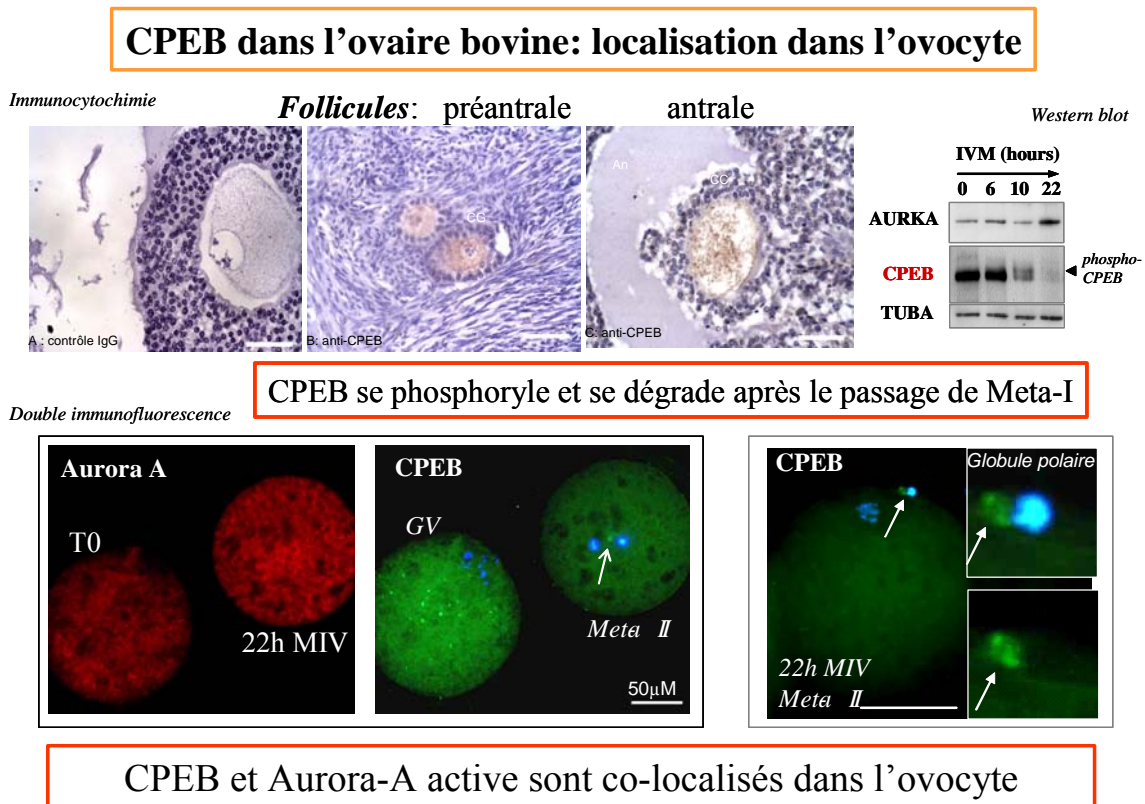
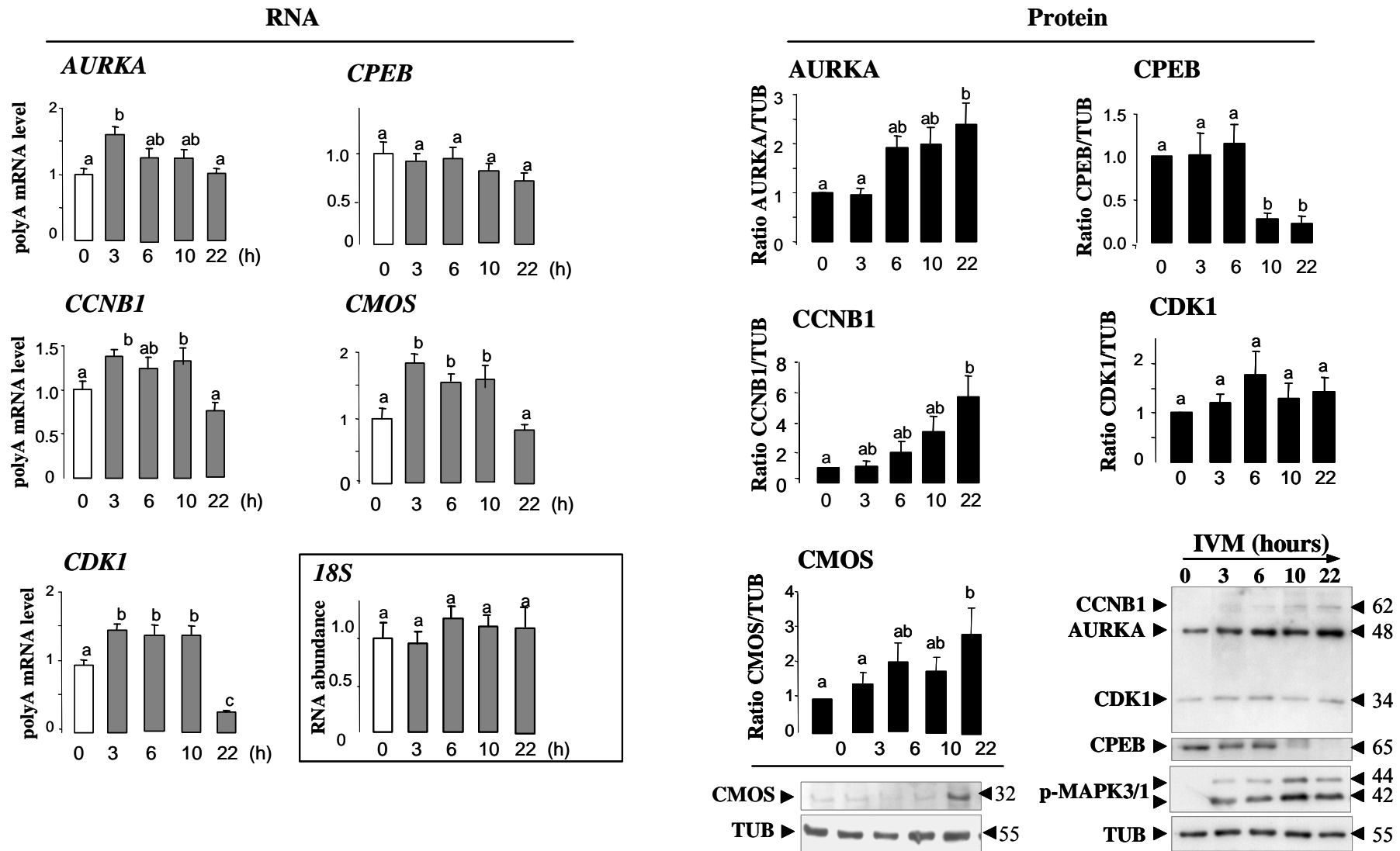


Figure 8. CPEB est localisée dans l'ovocyte des follicules primaires. Le niveau d'expression de CPEB baisse pendant la maturation, la protéine restant se concentrer sur l'anneau contractile de séparation de la GP et l'ovocyte.

Nous avons également étudiés pendant la MIV, la **cinétique** de certains facteurs liés aux composantes de la MPF **cycline B1 et CDK1**, ainsi que **MOS, CPEB et Aurora-A**, aux niveaux des transcrits et des protéines en tenant compte des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation des MAP kinases 3/1 (ERK1/2) et CPEB (**Figure 9**).



Les **transcrits**, portant des sites CPE, augmentent leur niveau de polyadénylation avant GVBD (*MOS*, *CCNB1*, *CDK1* et *AURKA*). Par ailleurs, le niveau d'expression des **protéines** CCNB1, MOS et AURKA augmente, tandis que celle du CPEB diminue (**Figure 9**).

Si la méiose est bloquée par les inhibiteurs de la MPF (roscovitine) ou de MAPK3/1 (U0126) ou par metformine (activateur de AMPK), CPEB n'est pas dégradée (**Figure 10**).

Les résultats obtenus sont cohérents avec des données bibliographiques rapportant que l'activation d'Aurora-A est indépendante de l'activation des MAP kinases et de celle du MPF dans l'ovocyte. Cela suggère que AURKA n'est pas le seul facteur, impliqué dans le contrôle de la polyadénylation par CPEB et par conséquent, son action directe sur CPEB reste à démontrer.

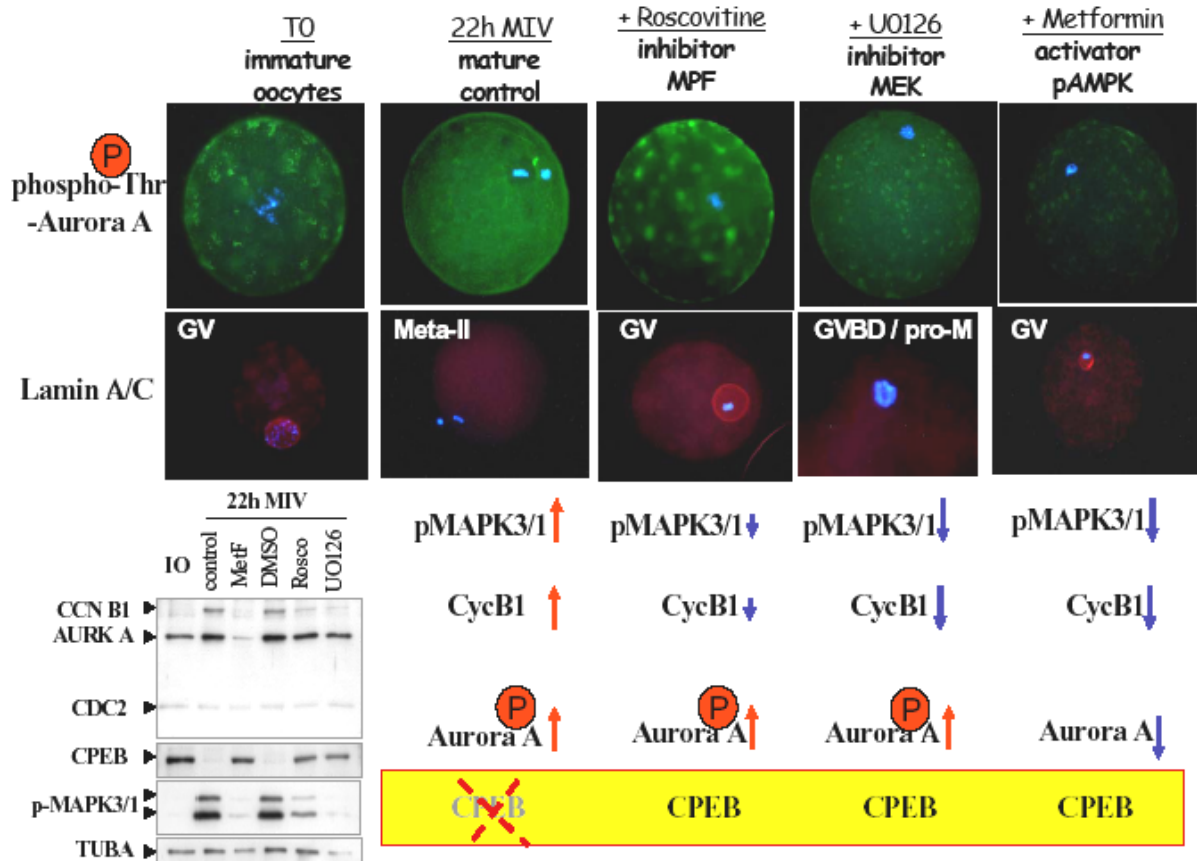


Figure 10. Effets de modulateurs de l'activité de la MPF, MEK (MAPK3/1 kinase) ou AMPK pendant la MIV sur la maturation nucléaire, niveaux protéiques de CCNB1, AURKA, CDC2/CDK1, CPEB et l'activation de AURKA et MAPK3/1.

CPEB est dégradée quand la méiose progresse jusqu'à la métaphase - II et ne se dégrade pas si la méiose est bloquée.

Chez le Xénope, GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) semble pouvoir phosphoryler Aurora-A sur Serine et donc influencer son activation (Sarkissian et al. 2004). Nous avons cherché à savoir si c'est le cas chez le bovin.

2.2.3. GSK3 et son rôle dans la maturation ovocytaire

GSK3 est impliquée dans de nombreux processus cellulaires. Notamment, elle intervient dans la voie WNT/ β -caténine et régule la transcription via la phosphorylation des facteurs de transcription (c-myc, CREB, c-jun). En collaboration avec Joëlle Dupont et avec mon étudiant en thèse Mohamad Salhab, nous étudions l'expression de GSK3 formes A et B dans l'ovocyte et les cellules de la granulosa (murales et du cumulus) du follicule bovin. Nous avons établi les profils d'expression de **GSK3B** dans l'ovaire aux niveaux des transcrits et de la protéine (**article 1**).

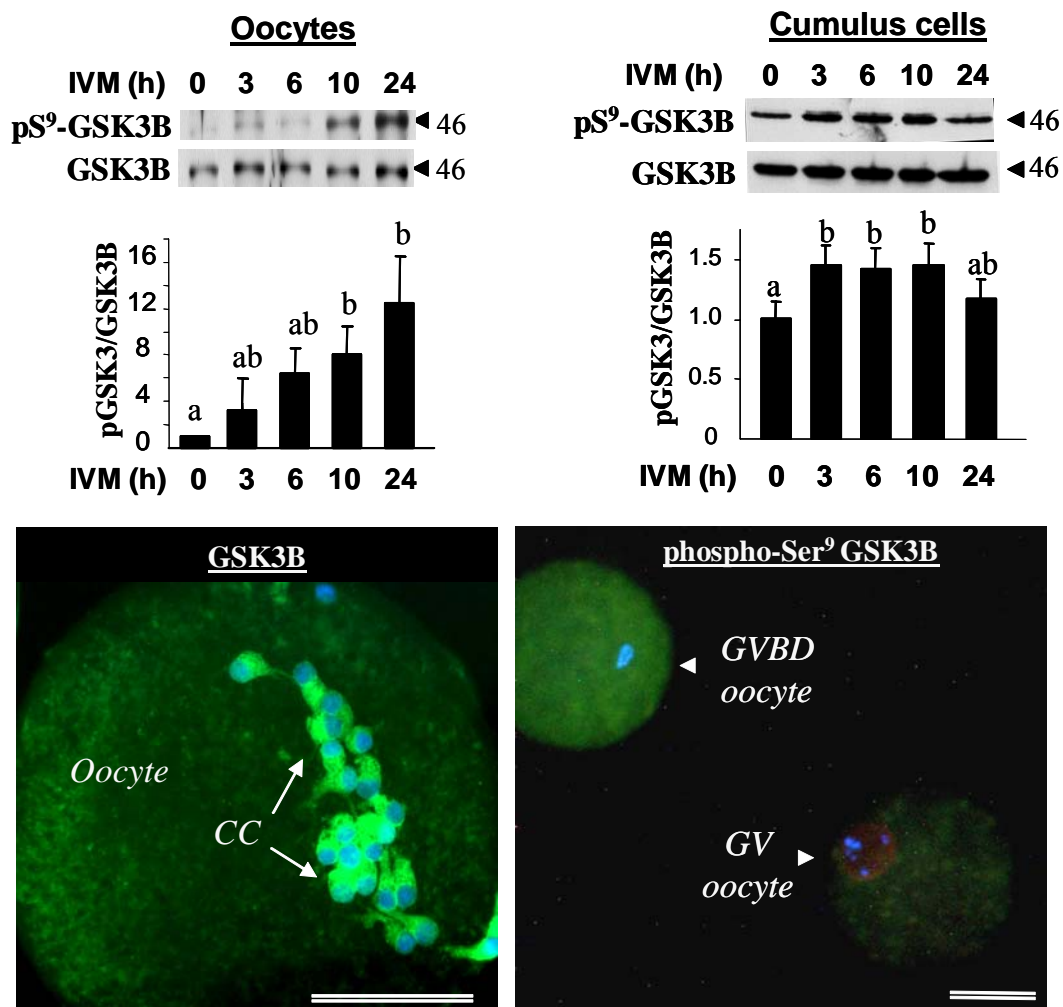
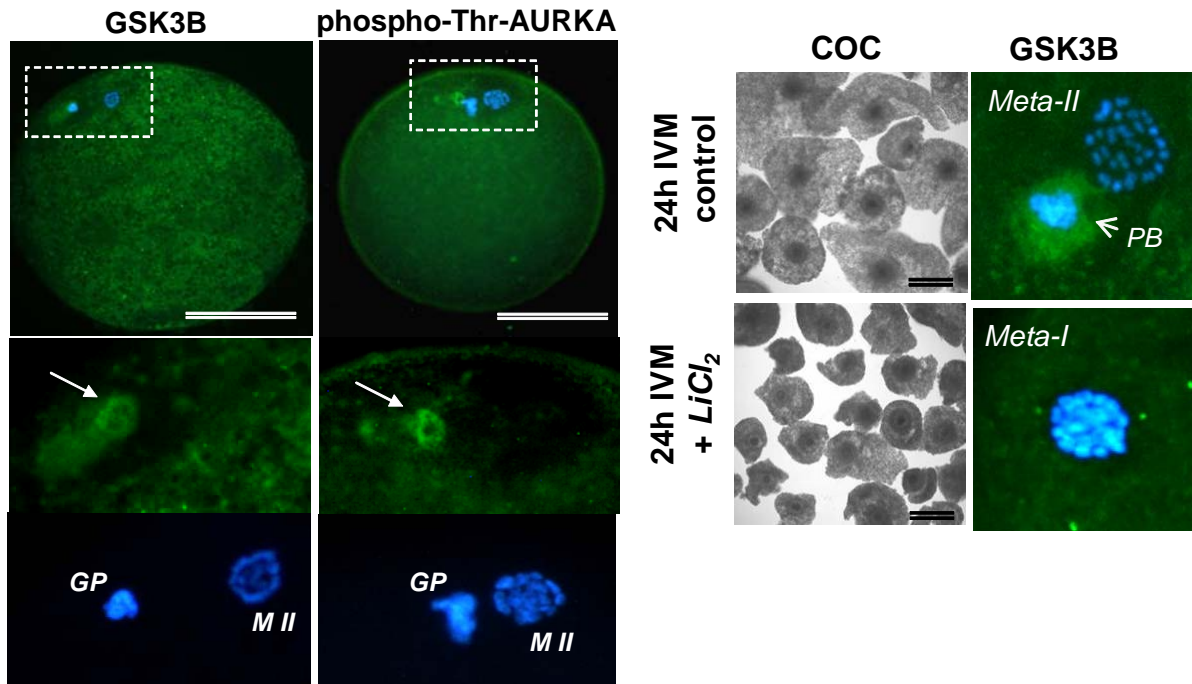


Figure 11. Cinétique de la phospho-Ser⁹ - GSK3B phosphorylation (forme désactivée) dans l'ovocyte et cellules de cumulus bovines pendant la maturation in vitro. Phospho-S⁹GSK3B augmente dans l'ovocyte mais pas dans CC pendant la MIV.

Nos résultats montrent qu'après une **inactivation** par phosphorylation en Serine⁹ de **GSK3B**, cette **kinase** est différenciellement régulée au cours de la maturation dans l'ovocyte et dans les cumulus (**Figure 11**). Dans l'ovocyte mature, GSK3B est concentrée au niveau de l'endroit qui sépare l'ovocyte et le globe polaire, i.e. peut-être elle co-localise avec une forme active de phosphoThr-AURKA (**Fig. 12**, images du haut) et participe à la régulation de son autophosphorylation comme ça a été montré chez le Xenope.



10 - 24 h IVM: Meta- I / II transition:

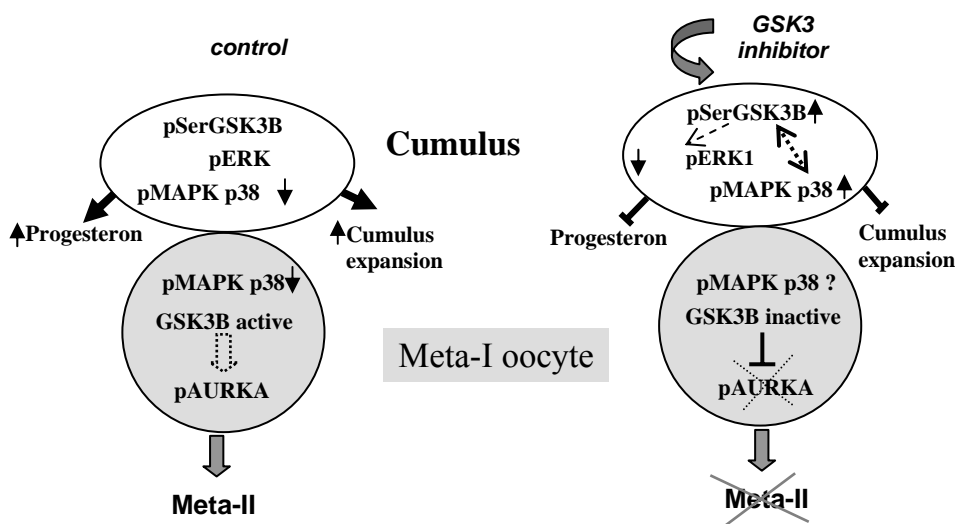


Figure 12. A gauche : Détection par immunofluorescence de GSK3B (totale) et phospho-Thr-AURKA sur l'anneau contractile dans les ovocytes matures. **A droite :** l'administration de 20mM de LiCl₂ pendant la MIV bloque les ovocytes dans la Métaphase-I et empêche la ségrégation des chromosomes.

Schéma : Schéma hypothétique d'implication de GSK3B dans la transition de l'ovocyte en métaphase I à la métaphase II, conclu à partir d'expériences avec les inhibiteurs de GSK3. Phospho-Ser9-GSK3B, phospho-ERK et phospho- p38 sont présents dans le COC, à la métaphase-I. Au cours de la période de 10-24h de la MIV, cumulus est expansé, la sécrétion de progestérone augmente et le niveau de phospho-p38 diminue en CC et dans l'ovocyte. Dans l'ovocyte, GSK3B pourrait participer à la phosphorylation de AURKA, qui est impliquée dans la régulation de la ségrégation des chromosomes et transition Méta-I / Méta-II. Oocyte donc atteint correctement stade métaphase II. En présence d'inhibiteurs de GSK3B, cumulus n'a pas été expansé et la sécrétion de progestérone diminue. Inhibiteur GSK3 (i.e. LiCl) conduit à la phosphorylation de Ser9-GSK3B, une diminution de phospho- ERK, par contre le niveau de phospho-MAPK p38 est maintenu élevé, ce qui pourrait entraver la progression de la méiose normale. Lorsque GSK3B est inactivé par LiCl, les changements dans la phosphorylation de AURKA n'ont pas été correctement produits et l'ovocyte a été bloqué à la Méta - I.

L'administration de **chlorure de lithium**, un inhibiteur sélectif de l'activité de GSK3, pendant 24 heures, bloque la maturation d'ovocyte en métaphase – I. On peut suggérer que GSK3B peut colocaliser avec AURKA et réguler son activité. En plus, en présence du Lithium, les ERK MAPK3/1 sont activées plus tardivement et cela peut expliquer en partie le blocage de la progression de la méiose. Nous avons montré également que le LiCl₂ a un effet dose- et temps- dépendant sur la production de progestérone par les cellules du granuloza, expansion de cumulus et sur l'activation de ERK MAPK3/1 et MAPK14 (p38) au niveau de cellules du cumulus (**schéma en bas de Figure 12**; résultats plus détaillés sont dans **l'article 1**).

2.2.4. AMP-activated Protein Kinase dans la maturation ovocytaire

En collaboration avec Joëlle Dupont et son étudiante en thèse Lucie Tosca, nous avons mené dans les ovaires de vaches des études sur l'expression et le rôle de l'**AMPK**, un régulateur clé du **métabolisme énergétique**. L'AMPK régule la charge énergétique cellulaire en stimulant les voies cataboliques générant de l'ATP et en inhibant les voies anaboliques consommant de l'ATP. Ces actions de l'AMPK sont connues dans de nombreux tissus périphériques (muscle, foie, pancréas, tissu adipeux) mais pas dans le follicule ovarien.

Nous avons montré que l'AMPK est exprimé dans les cellules de la granuloza, la thèque, les complexes cumulo-ovocytaires et le corps jaune de vache (Tosca et al. 2006 - **publication 8**). Nous nous sommes plus particulièrement intéressées au rôle de l'AMPK dans la stéroïdogénèse des cellules de la granuloza en utilisant la **Metformine**. Ce composant est un activateur de l'AMPK, fréquemment utilisé pour le traitement du diabète de type II et du syndrome des ovaires polykystiques chez la femme (PCOS). La metformine induit in vitro une **inhibition AMPK-dépendante de la sécrétion de la progestérone** et de l'oestradiol par les cellules de granuloza (**publication 8**). Elle bloque aussi l'expansion des cellules du cumulus et la maturation de l'ovocyte dans les COCs au stade VG (Tosca et al. 2007) par un mécanisme qui pourrait faire intervenir l'AMPK. En revanche, il n'y a **pas d'effets** de la metformine sur la progression méiotique de l'ovocyte lorsque les ovocytes sont **dénudés** de CC avant la MIV (**Fig. 13**). En plus la MIV des ovocytes dénudés de cellules de cumulus (DO) ne s'accompagne pas de l'activation de l'AMPK dans l'ovocyte. Donc, la **présence de CC semble indispensable au mode d'action de la metformine sur la maturation** in vitro des ovocytes chez le

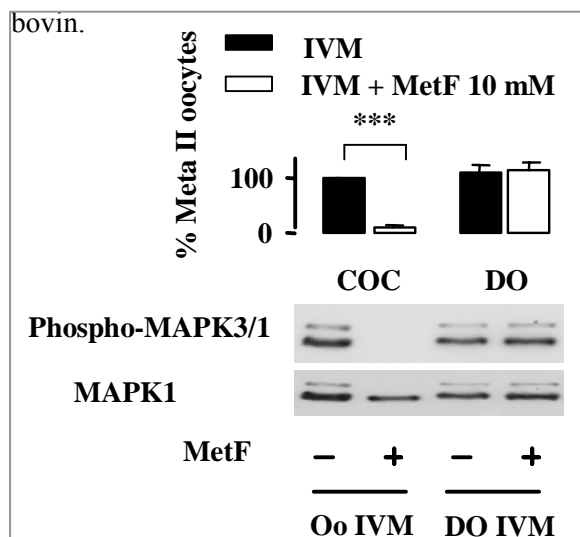


Figure 13. Taux des ovocytes matures (% Meta-II) et l'activation des ERK MAPK3/1 dans l'ovocyte après 22h de MIV en présence (+) ou absence (-) de 10 mM de metformine. Les ovocytes ont été mis en maturation avec les cellules de cumulus (COC) ou dénudés (DO)

Comme déjà évoqué dans la littérature, l'AMPc est un messager secondaire impliqué dans l'arrêt méiotique chez les mammifères. Le niveau de l'AMPc est contrôlé par les phosphodiesterases qui dégradent l'AMPc en 5'-AMP, lui-même activateur de l'AMPK. Nos résultats suggèrent que l'AMPK pourrait contrôler la maturation nucléaire de l'ovocyte car sa phosphorylation est élevée dans les ovocytes immatures puis elle diminue et devient indétectable après la MIV (**Figure 14**).

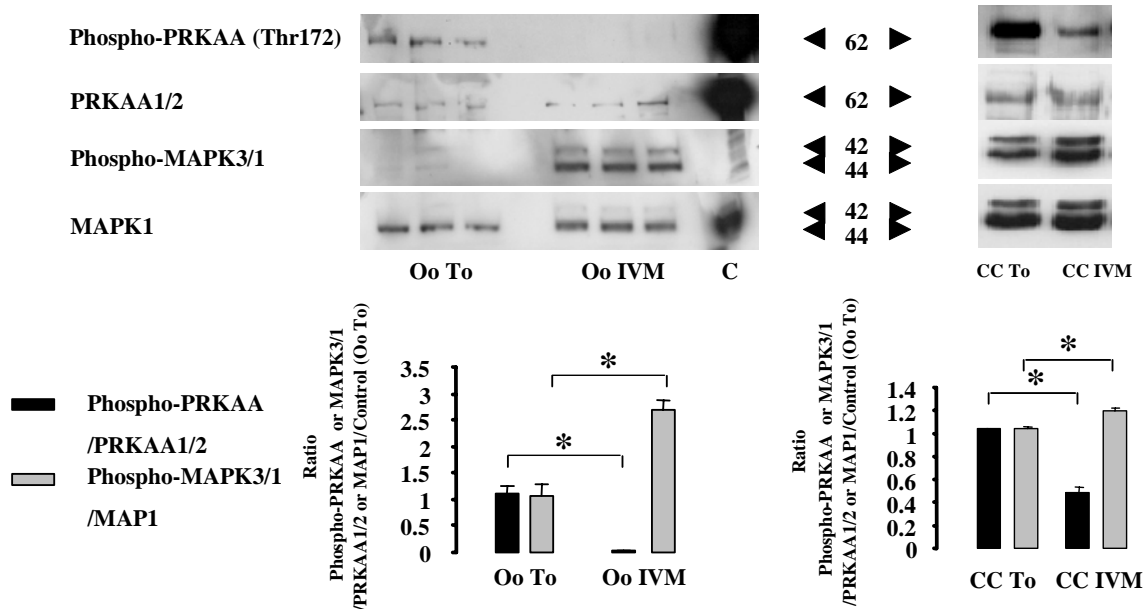


Figure 14. Niveaux de phosphorylation de l'AMPK (PRKAA) et MAPK3/1 ERK dans les ovocytes immatures (Oo T0) et après la MIV (Oo IVM) et dans les cellules de cumulus correspondantes (CC T0 – cumulus immatures; CC IVM – après 22h MIV). Phospho-AMPK diminue pendant la MIV tandis que phospho-MAPK3/1 augmente.

Ainsi, nous pouvons suggérer qu'une **levée de l'inhibition de l'AMPK dans l'ovocyte** est une des conditions requise pour **la reprise de la méiose** chez le bovin. Nos données sont en accord avec d'autres études réalisées sur l'ovocyte bovin (Bilodeau-Goeseels et al. 2007) et porcin (Mayes et al. 2007), mais pas chez la souris. Cela peut s'expliquer par les différences de la cinétique de la maturation et de la dépendance de l'ovocyte d'une synthèse protéique de novo entre ces espèces.

Rappelons, que l'AMPK est connue pour son rôle inhibiteur de la synthèse protéique. En fait, dans nos études la metformine affecte les niveaux de phosphorylation de marqueurs de la synthèse protéique : protéine ribosomale RP6 et facteur d'élongation EEF2. Les quantités de CCNB1 et AURKA dans l'ovocyte est très diminuée en présence de la metformine. Cette inhibition de la néosynthèse peut être dépendante de l'AMPK, car les niveaux de phosphorylation de cette kinase sont augmentés dans ces conditions (**Figure 16**).

L'AMPK joue un rôle dans la méiose et peut être un des **facteurs clé du dialogue entre l'ovocyte et le cumulus**. Son rôle pourrait se situer dans la régulation du passage d'un certain "check point" avant l'initiation de GVBD. Le niveau de phosphorylation/activation de l'AMPK serait un indicateur de la reprise de la méiose ce qui place AMPK comme un marqueur de la maturation ovocytaire. Ce "check

point" peut être important pour permettre à l'ovocyte de s'engager vers la fécondation et vers un futur développement embryonnaire en fonction de son statut nutritionnel et de son environnement.

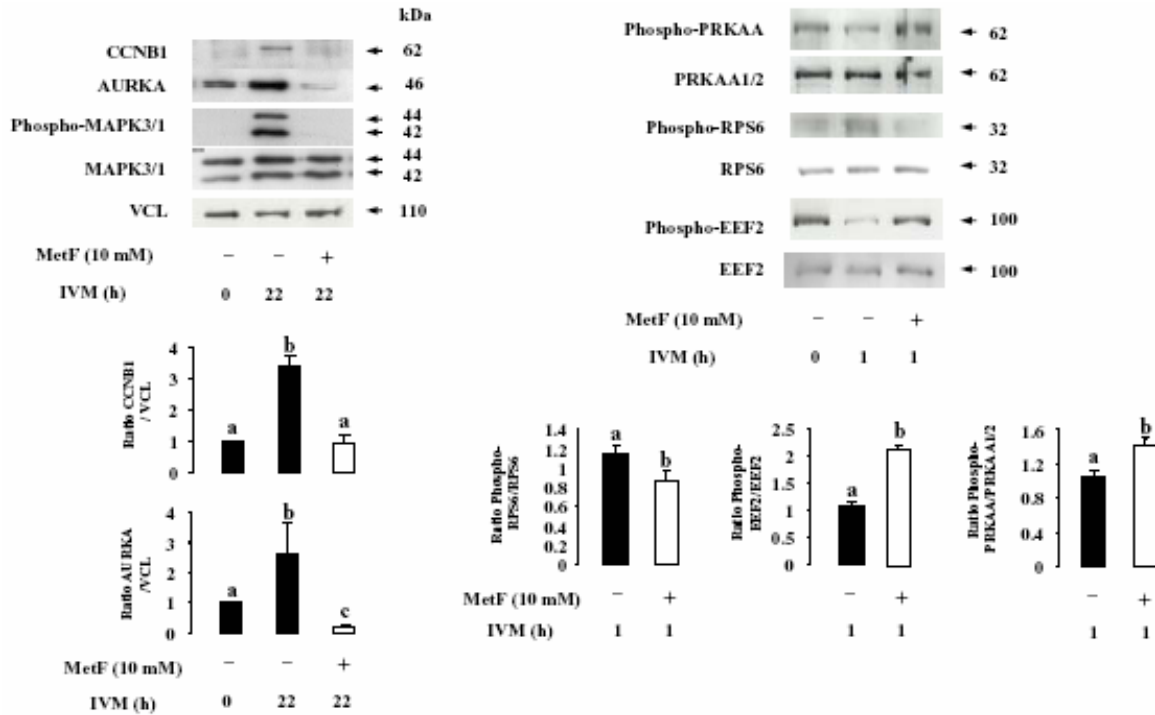


Figure 16. Effet de la metformine sur les niveaux protéiques de CCNB1, AURKA, phosphorylation de MAPK3/1 ERK (22 h de MIV) et sur l'activation des marqueurs de synthèse protéique RP6 et EEF2 (1 h de MIV) dans les ovocytes bovins. Metformine inhibe la synthèse protéique via l'activation de l'AMPK et déphosphorylation des facteurs EEF2 et RPS6.

En conclusion, les résultats décrits dans cette partie sont résumés dans un schéma hypothétique de la participation possible d'AURKA, AMPK, CPEB et GSK3 et ERK/MAPK1/3 dans la reprise et progression de la méiose dans l'ovocyte bovin (**Fig. 17**).

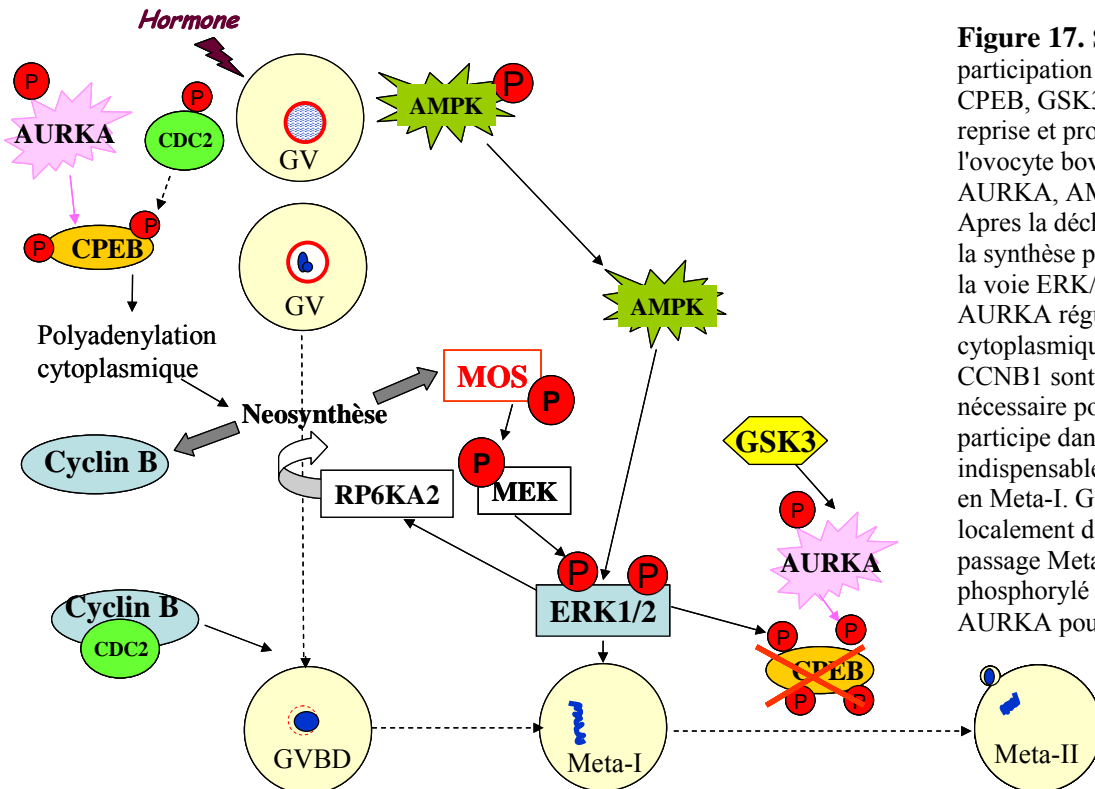


Figure 17. Schéma hypothétique de la participation possible d'AURKA, AMPK, CPEB, GSK3 et ERK/MAPK1/3 dans la reprise et progression de la méiose dans l'ovocyte bovin. Dans l'ovocyte immature, AURKA, AMPK et CPEB sont activés. Après la décharge hormonale, AMPK régule la synthèse protéique en agissant sur RP6 par la voie ERK/MAPK ERK, tandis que AURKA régule la polyadenylation cytoplasmique/traduction via CPEB. MOS et CCNB1 sont néosynthétisés. La MPF active, nécessaire pour le GVBD se forme. MOS participe dans l'activation des ERKs, indispensables pour la formation du fuseau en Meta-I. GSK3 phosphoryle AURKA localement dès le stade de Méta-I. Durant le passage Meta-I/Meta-II, CPEB est hyper phosphorylé par ERK MAPK3/1 en plus de AURKA pour être dégradé.

3. Régulation post-transcriptionnelle : approches protéomiques appliqués à cellules folliculaires

3.1. Protéome de l'ovocyte.

Les approches transcriptomiques montrent certaines limites par rapport à la génomique fonctionnelle de l'ovocyte : l'absence quasi-total de la transcription durant la maturation, la présence de nombreux ARN non-codants et déadénylés, la durée de vie très limitée de certains transcrits avec parfois une incohérence entre le taux de transcrits et le niveau d'expression des protéines qui sont à la clé des fonctions biologiques. Le pouvoir de la protéomique à caractériser un changement reproductible, dans un domaine biologique mesurable corrélé à une maladie, à un traitement ou à un état physiologique donné, en fait une approche quasi incontournable. Ainsi, une grande partie de mon travail vise à étudier l'expression protéique des facteurs méiotiques par plusieurs approches protéomiques.

Les analyses fonctionnelles de protéines par l'utilisation d'anticorps dirigés contre leurs formes totales ou phosphorylées ont été engagées dans mes travaux; cependant cette approche présente certaines limitations. D'une part, la faible quantité de matériel biologique disponible (ovocytes et CC) permet l'analyse d'un nombre restreint de protéines et d'autre part, cette étude ne cible que quelques candidats d'intérêt. Une approche plus globale nécessitant moins de matériel biologique et sans aucun a priori devait être engagée sur ce modèle pour caractériser finement et de façon simultanée l'ensemble des protéines.

Grâce aux avancées instrumentales en spectrométrie de masse et à l'enrichissement des banques de données nucléotidiques (séquençage du génome entier de la vache), l'analyse de l'expression globale des protéines (protéome) de l'ovocyte bovin a pu être envisagée. Dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de spectrométrie de masse (Valérie Labas) de la Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomarqueurs (PAIB) du Centre INRA de Tours, l'inventaire des protéines de l'ovocyte a été réalisé par une approche protéomique de type bottom up (analyses des peptides). La stratégie choisie a consisté à coupler à la fois, l'électrophorèse monodimensionnelle, la nanochromatographie liquide (nanoLC) et la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) pour identifier l'ensemble des protéines de l'extrait protéique total de 1200 ovocytes. Après la digestion tryptique des 65 bandes de gels 1D-SDS-PAGE coloré au bleu de Commassie (<150 kDa), les extraits peptides ont été directement analysés par shotgun (nanoLC-MS/MS). Ainsi, les mélanges peptidiques ont été séparés sur la base de leur hydrophobicité par un système de nanochromatographie liquide à phase inverse avant d'être sélectionnés à la fragmentation par un spectromètre de masse de type trappe ionique linéaire. L'ensemble des données a été confronté avec les banques de données telles que IPI *Bos taurus* ou nr NCBI, ce qui a permis l'identification de plus de **400** protéines. Ces résultats s'accordent avec ceux de la littérature cependant notre liste de protéines n'est pas exhaustive. Par cette approche, seules les protéines majoritaires de l'ovocyte ont pu être identifiées.

Dans le but d'établir une cartographie de référence complète par cette approche, une plus grande quantité de matériel biologique serait nécessaire afin d'atteindre les espèces minoritaires. Cependant, les pouvoirs séparatifs de l'électrophorèse ou de la chromatographie liquide et le pouvoir résolutif des spectromètres de masse restant limités, l'analyse d'un mélange protéique complexe (extrait total) reste encore un défi aujourd'hui. Ceci s'explique par la large gamme dynamique d'expression des protéines (10^8). Afin de diminuer l'hétérogénéité des échantillons et d'enrichir les protéines minoritaires, on pratique généralement un fractionnement subcellulaire. En effet, il a été montré par Memili et al. (2007) que l'analyse LC-2D-MS/MS de fractions (cytosol, membrane, cytosquelette et protéines nucléaires) constituées à partir de 500 ovocytes permettait l'identification de 1092 protéines. Cependant, par le grand nombre de conditions et d'étape d'extraction souvent difficiles à contrôlées, il est difficile d'envisager des analyses différentielles pour comparer les différents états de maturation de l'ovocyte. Il était donc important d'utiliser une autre approche protéomique plus sensible permettant d'accéder à la distribution, à la composition et à la structure chimique d'un grand nombre de composés en mélange, sans aucun a priori. C'est dans ce contexte que nous avons développé l'analyse différentielle quantitative par ICM-MS (Intact Cells MALDI-TOF Mass Spectrometry).

Actuellement, pionniers en France dans ce domaine, cette approche innovante permet la recherche à haut débit de biomarqueurs directement à partir des cellules entières.

3.2. Approche protéomique sur des cellules entières (ovocyte)

L'ICM-MS (Intact Cells MALDI-TOF Mass Spectrometry) consiste à analyser directement les cellules entières par spectrométrie de masse MALDI-TOF afin d'obtenir un profil spectral correspondant à l'ionisation de peptides-protéines cytoplasmiques ou membranaires dans une gamme de masse (< à 30 kDa) parfois inaccessible avec les approches protéomiques classiques (gels 1D-2D). Le spectre reflète ainsi un état physiologique donné, d'une lignée cellulaire. Cette approche présente de nombreux avantages : elle nécessite très peu d'échantillon (jusqu'à la cellule unique) ; elle permet de s'affranchir des étapes d'extraction des protéines (risques de perte ou de dégradation), et elle procure des résultats immédiats et pour un grand nombre d'échantillons. La comparaison des profils permet ainsi rapidement de mettre en évidence l'apparition ou la disparition de nouvelles espèces polypeptidiques en fonction d'un état physiologique donné mais également de visualiser les variations d'expression d'une espèce moléculaire. Ce savoir-faire innovant a été développé par V. Labas et JL. Dacheux (INRA Centre de Tours) sur les spermatozoïdes épидидymaires pour la recherche de marqueurs de maturation. Ainsi, nous avons adapté cette méthode aux cellules folliculaires (**Figure 18**) et actuellement nous arrivons à établir un profil entre **3-25 kDa** à partir d'un **ovocyte unique** ou une partie de cumulus individuel.

Principe de l'ICM-MS sur l'ovocyte bovin

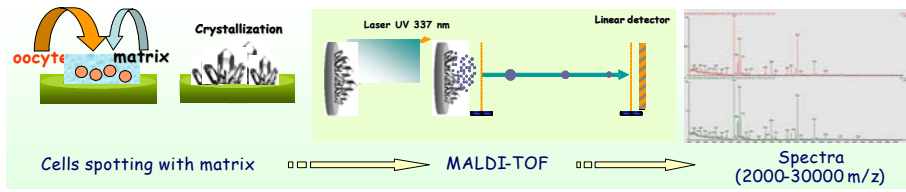
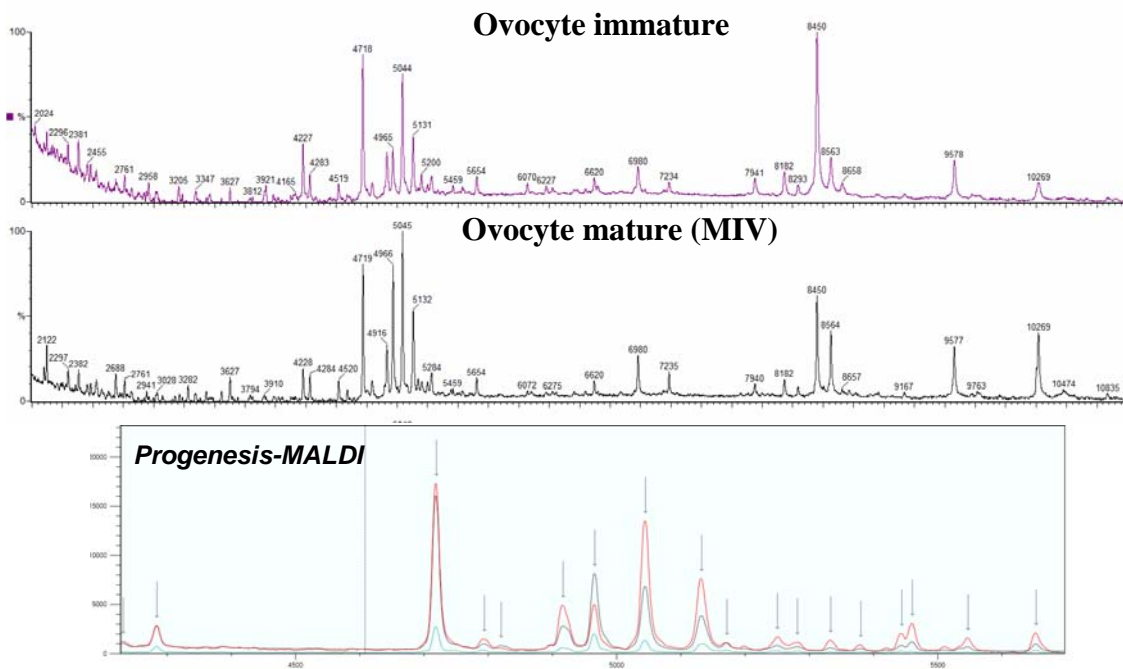


Figure 18.



La superposition des profils protéiques des ovocytes à différents états de maturation donnés et les analyses statistiques des variations d'intensités de pics normalisées, permettent de mettre en évidence des **marqueurs potentiels** de la maturation nucléaire (Figure 19).



imm MIV **Figure 19.** Images typiques de spectres ICM-MS des ovocytes bovins.

Sur la base des spectres individuels pour chaque ovocyte, l'analyse de composantes principales (ACP) effectuée sur des valeurs normalisées de plusieurs pics qui varient dans deux groupes d'ovocytes ($p < 0.001$ en ANOVA) permet de bien distancer les ovocytes immatures et matures (**Figure 20**).

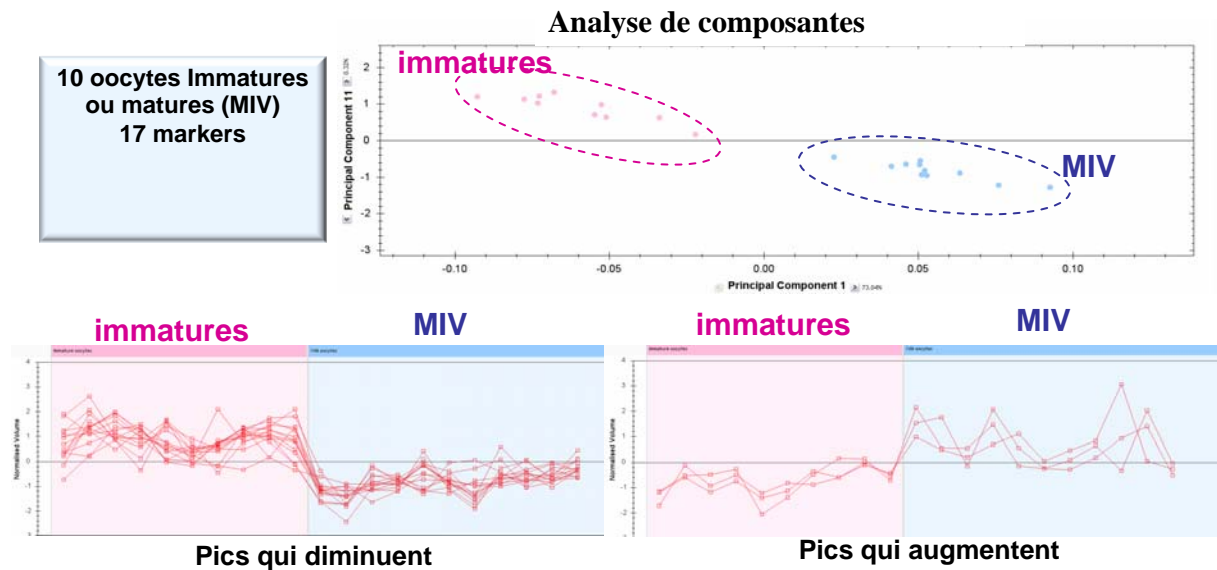


Figure 20. ACP des variations des espèces protéiques entre les ovocytes immatures et MIV

Actuellement, nous sommes en train de tester ces analyses sur les **ovocytes de différentes qualités**.

Un exemple est représenté ci-dessous (**Figure 21**). L'analyse ICM-MS a été effectuée sur

- 10 ovocytes immatures issus de COCs compacts de petits follicules (3-6mm) ponctionnés sur des ovaires d'abattoir
- 6 ovocytes qui sont restés immatures après le traitement de super-ovulation de vaches par FSH (COCs compacts, prélevés par OPU de follicules de plus de 10mm)
- 2 ovocytes immatures issues de COCs compacts ponctionnés de gros follicules (>10 mm) sur des ovaires d'abattoir

L'ACP, en utilisant une quinzaine de pics de différentes intensités, a séparé les ovocytes prélevés de petits follicules post-mortem des gros follicules aspirés par OPU. De plus, les ovocytes de gros follicules post-mortem ont été classés proche du groupe des ovocytes OPU immatures (**Figure 21**). Cela reflète leur état physiologique similaire car les ovocytes qui n'ont pas répondu à la stimulation et ceux qui se trouvent dans la plupart des gros follicules des vaches non stimulées vont très probablement vers l'atrésie, et ils sont très différents des vrais immatures.

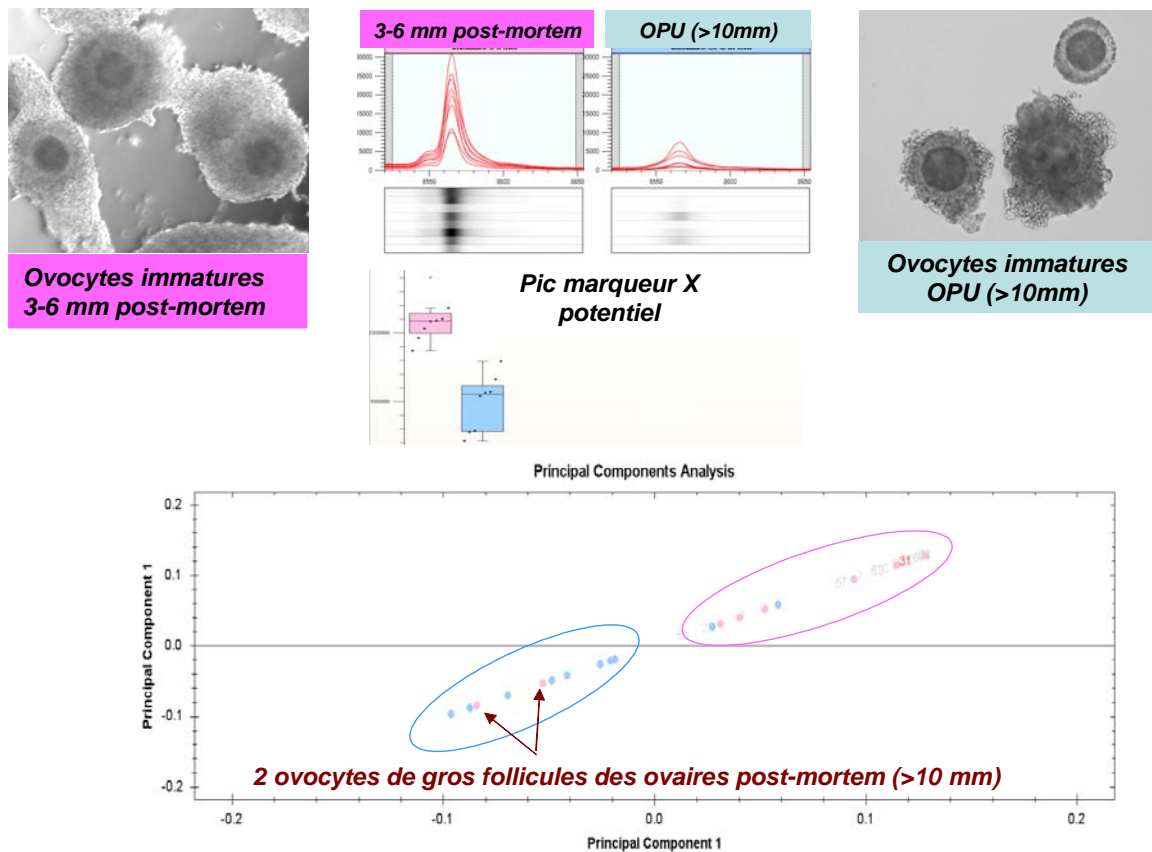


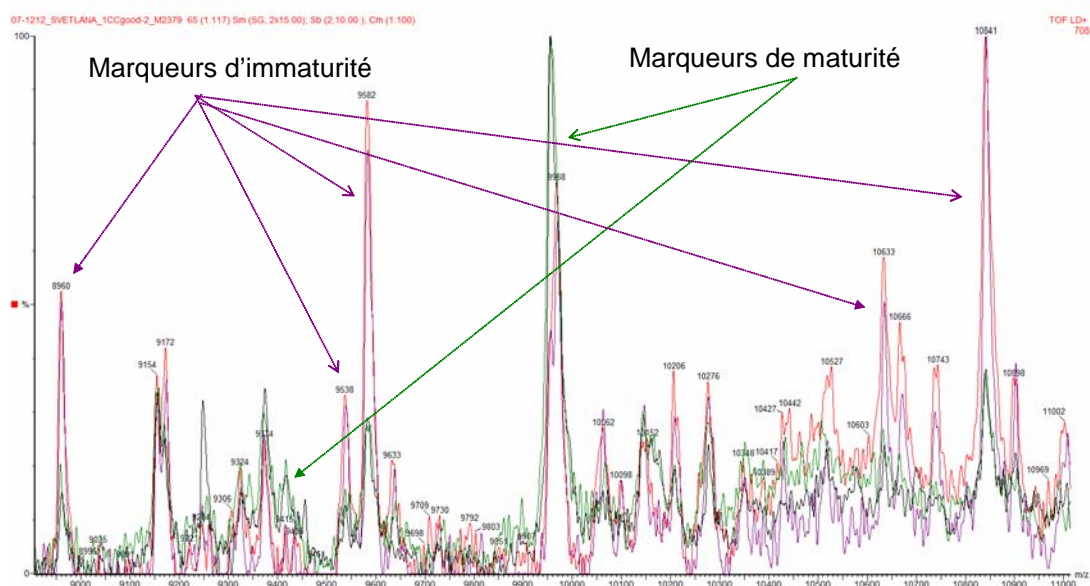
Figure 21. Comparaison des ovocytes immatures issues de petits ou de gros follicules par ACP (Progenesis-MALDI).

3.3. ICM-MS de cellules de cumulus.

La morphologie du cumulus est un bon reflet l'état de l'ovocyte : en général, un cumulus compact englobe l'ovocyte immature, tandis que l'ovocyte mature est entouré par un cumulus expansé.

Nous avons observé que les profils spectraux de cellules de cumulus entourant les ovocytes immatures sont très différents de ceux des ovocytes matures (**Figure 22**). L'analyse des spectres ICM-MS de cellules de cumulus par Progenesis indique plusieurs pics de protéines qui varient significativement dans ces conditions.

Figure 22. Comparaison des spectres de cellules de cumulus bovin immatures (couleurs rouge et violet) et matures (vert et noir)



Ces avancées ouvrent plusieurs voies comme par exemple : peut-on diagnostiquer la **qualité de l'ovocyte** par rapport au **profil protéique de son cumulus** ? Des méthodes **non-invasives** permettant d'estimer indirectement le potentiel d'un embryon sont très attendues dans les techniques de la reproduction assistée humaine (Royere et Guerif, 2008).

Nous nous sommes intéressés à la comparaison des CC venant des COCs individuels, dont les ovocytes correspondants sont à **différents stades de maturation**. Ce travail fait l'objet d'un projet "bottom-up" *Recherche de biomarqueurs de la maturation ovocytaire par spectrométrie de masse sur cellules folliculaires entières de vache, jument et femme* financé par Crédits Incitatifs PHASE en 2008 dont je suis porteur. Sur trois modèles – bovin, équin et humain, en collaboration avec Nadine Gérard, Véronique Cadoret et Valérie Labas, nous comparons les spectres des cellules de cumulus de COCs récupérés par l'OPU à partir de follicules préovulatoires, dont on connaît l'état nucléaire des ovocytes. Pour le modèle humain, les résultats du développement embryonnaires après l'ICSI (intra-cytoplasm sperm injection) sont actuellement disponibles.

Ce projet vise à mettre en évidence **des biomarqueurs universels de maturation ovocytaire** grâce à l'analyse des **variations d'expression protéique** dans les CC.

Les premiers résultats montrent la faisabilité de cette approche et une similarité des spectres chez les trois espèces.

Exemple de l'analyse différentielle sur cumulus: CC de COCs bovins individuels récupérés par l'OPU après la stimulation de la superovulation sont comparés. Entre CC **compacts** (ovocyte immatures, n=4) ou **expansés** (matures, n = 4), pic A est sous-représenté chez les expansés, tandis que pic B est sur-exprimé (**Figure 23**).

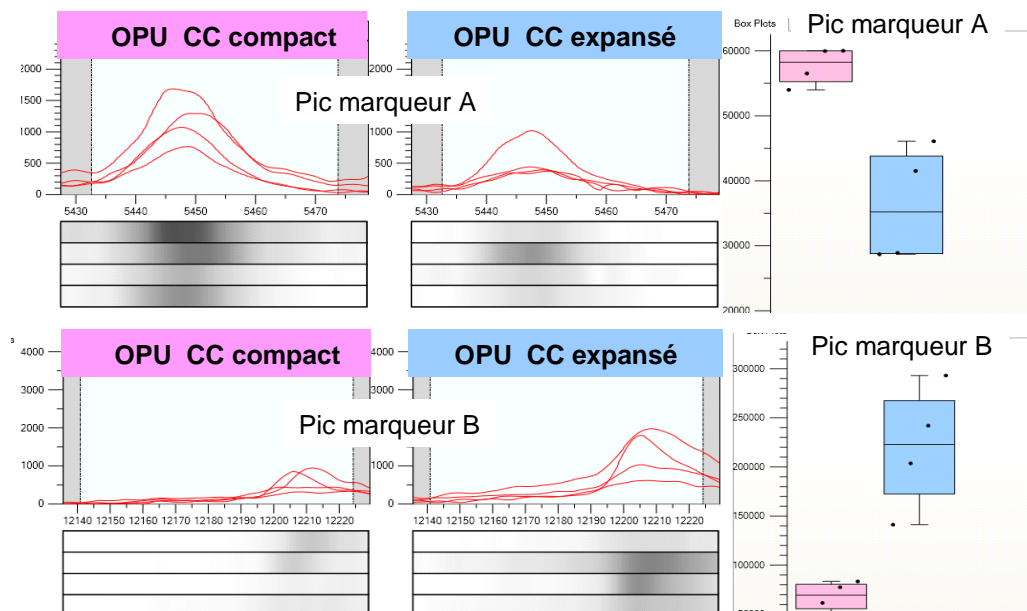


Figure 23. Comparaison des cellules de cumulus de COC récupérés par l'OPU, compactes ou expansés, par ICM-MS /Progenesis-MALDI. Variation de deux pics est montrée.

3.4. Identification des biomarqueurs.

L'ICM-MS a ainsi permis de caractériser de nombreux marqueurs peptidiques et protéiques d'intérêt dans les ovocytes ou cellules du cumulus, cependant il reste encore l'étape ultime de l'identification de ces molécules.

L'approche de type bottom up (gel SDS-PAGE et nanoLC-MS/MS) à partir des extraits protéiques a permis de dresser un inventaire des protéines majoritaires (20-150 kDa) mais très peu pour les protéines de petites tailles. Ainsi, en parallèle, pour les ovocytes et CC immatures et matures bovins, nous avons enrichi et séparé les protéines < 25 kDa par gels SDS-PAGE pour les identifier par nanoLC-MS/MS. La confrontation des données avec la banque de données de *Bos taurus* (IPI) a abouti à l'identification de **147** protéines dans l'ovocyte et **212** dans les cellules de cumulus. **54** protéines sont communes entre ces deux populations cellulaires (**Table 1**). Parmi les 147 protéines identifiées dans les ovocytes, seulement **16** ne sont pas communes entre les états immatures et MIV (**Table 2**), **6** protéines sont identifiées dans les immatures et **10** après la MIV. Parmi les 212 protéines identifiées dans les CC, **7** ont été identifiées uniquement dans les cellules immatures et **13** dans les CC matures (**Table 2**). Cependant, rien ne prouve qu'elles soient différentiellement exprimées dans ces conditions.

Grâce à cette approche d'identification, nous avons pu caractériser certains pics : par exemple le pic présentant un rapport masse sur charge (m/z) = 8564 et annoté comme UBA52 (ubiquitin).

Cependant, à partir des masses théoriques des protéines identifiées, il est très difficile d'attribuer avec certitude le nom d'une protéine à un pic d'intérêt observé par ICM-MS. Chez les eucaryotes supérieurs, le nombre de modifications post-traductionnelles (clivage, greffage de groupements) est élevé et les chances d'observer une protéine donnée à sa masse théorique est infime. Pour attribuer le nom d'une protéine à un pic, l'enrichissement et la purification des espèces protéiques sont en cours.

En conclusion, les diverses approches de la génomique fonctionnelle nous permettent petit à petit d'approfondir nos connaissances de la régulation moléculaire de la maturation de l'ovocyte.

En absence de la transcription dans la période de la maturation, la régulation de la différenciation de l'ovocyte s'effectue au niveau post-transcriptionnel et post-traductionnel. Il ressort que de nombreuses molécules impliquées dans différentes voies de signalisation sont impliquées dans ce processus. Cependant, une même protéine peut avoir des fonctionnalités différentes dans l'ovocyte par rapport aux cellules somatiques (polymorphisme, modifications post-traductionnelles, etc...). Les systèmes biologiques présentent une très grande complexité, la conjugaison de différentes approches et stratégies analytiques seront donc nécessaires afin de les caractériser.

Table 1. Liste des protéines communes entre l'ovocyte et les cumulus identifiées par nanoLC-MS/MS à partir de fractions de petits poids moléculaires

	protein_acc	protein_description	prot_mass
1	IPI00685613	Bt 12 kDa protein	11567
2	IPI00702336	Bt 22 kDa protein	22228
3	IPI00691138	Bt AK2 Isoform AK2B of Adenylate kinase isoenzyme 2, mitochondrial	25617
4	IPI00708398	Bt ALB Serum albumin	69468
5	IPI00824018	Bt ARHGDIA Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	19338
6	IPI00692765	Bt ATP5I ATP synthase subunit e, mitochondrial	8315
7	IPI00841719	Bt ATP5J2 ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit j2	10829
8	IPI00711216	Bt C7H19orf10 UPF0556 protein C19orf10 homolog	19019
9	IPI00706094	Bt CSN1S1 Alpha-S1-casein	24513
10	IPI00717525	Bt DPM1 Dolichol-phosphate mannosyltransferase	29574
11	IPI00704728	Bt EIF5A Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	16821
12	IPI00702891	Bt ERP29 Endoplasmic reticulum protein ERp29	28788
13	IPI00841749	Bt FASTKD3 Isoform 1 of FAST kinase domain-containing protein 3	75438
14	IPI00702950	Bt GSTM3 Glutathione S-transferase M3	26832
15	IPI00686173	Bt GSTP1 Glutathione S-transferase P	23598
16	IPI00689632	Bt HIST1H2BN Histone H2B type 1-N	13915
17	IPI00699128	Bt HSD17B10 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	27123
18	IPI00826297	Bt HSPD1 heat shock 60kDa protein 1	74985
19	IPI00702858	Bt HSPE1 10 kDa heat shock protein, mitochondrial	10925
20	IPI00690094	Bt LGALS1 Galectin-1	14734
21	IPI00913122	Bt LOC100138118 similar to Ras-related protein Rab-11A	20471
22	IPI00704180	Bt LOC513245 similar to ribosomal protein S23	16616
23	IPI00906651	Bt LOC615093 12 kDa protein	11657
24	IPI00727400	Bt LOC789113 similar to Histone H4 replacement CG3379-PC, partial	11794
25	IPI00694142	Bt MIF Macrophage migration inhibitory factor	12335
26	IPI00697914	Bt NDUFA4 NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4	9319
27	IPI00686077	Bt NDUFS3 NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	30250
28	IPI00686420	Bt NME2 Nucleoside diphosphate kinase B	17305
29	IPI00704735	Bt PBP Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	20973
30	IPI00712021	Bt PDCD6 PDCD6 protein	21724
31	IPI00694107	Bt PFN1 Profilin-1	15048
32	IPI00702098	Bt PPIB Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	23729
33	IPI00686092	Bt PRDX1 Peroxiredoxin-1	22195
34	IPI00713112	Bt PRDX2 Peroxiredoxin-2	21932
35	IPI00691994	Bt PRDX4 Peroxiredoxin-4	30722
36	IPI00689857	Bt PRDX6 Peroxiredoxin-6	25051
37	IPI00705941	Bt RAN GTP-binding nuclear protein Ran	24408
38	IPI00695776	Bt RAP1B Ras-related protein Rap-1b	20812
39	IPI00688640	Bt RPL11 60S ribosomal protein L11	20240
40	IPI00695041	Bt RPL23 60S ribosomal protein L23	14856
41	IPI00702348	Bt RPS5 40S ribosomal protein S5	22862
42	IPI00702565	Bt SEC22B SEC22 vesicle trafficking protein homolog B	28709
43	IPI00692468	Bt SOD2 Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	24623
44	IPI00717836	Bt TMED10 Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	24812
45	IPI00689711	Bt TMED9 Transmembrane emp24 domain-containing protein 9	27281
46	IPI00691420	Bt TMEM109 Transmembrane protein 109	26208
47	IPI00706942	Bt TPI1 Triosephosphate isomerase	26673
48	IPI00687665	Bt UBA52 Ubiquitin	8560
49	IPI00729634	Bt UCHL1 12 kDa protein	11819
50	IPI00841443	Bt UCHL1 25 kDa protein	25209
51	IPI00760424	Bt YWHAB Isoform Short of 14-3-3 protein beta/alpha	27832
52	IPI00696435	Bt YWHAE 14-3-3 protein epsilon	29155
53	IPI00707320	Bt YWHAQ 14-3-3 protein theta	27747
54	IPI00703110	Bt YWHAZ 14-3-3 protein zeta/delta	27728

Table 2. Liste de protéines différentielles de petits poids moléculaires identifiées à parti d'extrait protéiques des ovocytes et CC immatures ou maturés in vitro.

Protéines identifiées que dans les ovocytes immatures		
protein_acc	protein_desc	prot_
IPI00702348	Bt RPS5 40S ribosomal protein S5	22:
IPI00689717	Bt HINT2 Histidine triad nucleotide-binding protein 2	17
IPI00702706	Bt - 14 kDa protein	14:
IPI00691420	Bt TMEM109 Transmembrane protein 109	26:
IPI00698367	Bt FAM82C Regulator of microtubule dynamics protein 3	51:
IPI00712739	Bt S100B Protein S100-B	10:

Protéines identifiées que dans les ovocytes matures		
protein_acc	protein_desc	prot_
IPI00717915	Bt LOC527628 similar to hCG27406	24:
IPI00712142	Bt HDHD2 Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 2	28:
IPI00718256	Bt LOC523056 similar to BCL2-like 10	24:
IPI00696116	Bt VAMP2 Vesicle-associated membrane protein 2	12:
IPI00714481	Bt MESDC2 Mesoderm development candidate 2	25:
IPI00704946	Bt LOC524507 similar to ribosomal protein S19	16:
IPI00700762	Bt AK3L1 GTP:AMP phosphotransferase mitochondrial	25:
IPI00713602	Bt ISOC2 Isochorismatase domain-containing protein 2, mitochondrial	22:
IPI00689092	Bt RPL31 60S ribosomal protein L31	14:
IPI00687409	Bt LOC100139784;MRLC2 Myosin regulatory light chain MRLC2	19:

Protéines identifiées que dans les cellules de cumulus immatures		
protein_acc	protein_desc	prot_
IPI00913122	Bt LOC100138118 similar to Ras-related protein Rab-11A	20:
IPI00906651	Bt LOC615093 12 kDa protein	11:
IPI00703500	Bt DCI Dodecenoyl-Coenzyme A delta isomerase	33
IPI00697914	Bt NDUFA4 NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4	93
IPI00721662	Bt C19H17orf61 UPF0451 protein C17orf61 homolog	11:
IPI00694198	Bt RAB5C Ras-related protein Rab-5C	23:
IPI00708428	Bt DAD1 Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit D/	12:

Protéines identifiées que dans les cellules de cumulus matures		
protein_acc	protein_desc	prot_
IPI00691138	Bt AK2 Isoform AK2B of Adenylate kinase isoenzyme 2, mitochondrial	25:
IPI00711977	Bt UBE2L3 Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	17:
IPI00713535	Bt PSMA2 Proteasome subunit alpha type-2	25:
IPI00704974	Bt CRABP2 Cellular retinoic acid-binding protein 2	15:
IPI00694471	Bt RBP1 Retinol binding protein 1, cellular	11:
IPI00696755	Bt SNRPD1 similar to mCG14669	14:
IPI00712750	Bt MMGT1 Transmembrane protein 32	18:
IPI00707433	Bt SRP14 Signal recognition particle 14 kDa protein	12:
IPI00693645	Bt CLIC1 Chloride intracellular channel protein 1	26:
IPI00693004	Bt MGC152007 Protein fucU homolog	16:
IPI00694688	Bt RPS26 40S ribosomal protein S26	13:
IPI00690413	Bt BTF3 Similar to basic transcription factor 3a	16
IPI00711587	Bt PSMA3 Proteasome subunit alpha type-3	28:

C. Perspectives

La fertilité est fortement dépendante de l'état métabolique de l'individu. La qualité de l'ovocyte est également reliée à cet état métabolique directement et via les cellules somatiques avec lesquelles il communique à l'intérieur du follicule. **Les objectifs** de mes projets sont donc de comprendre **les relations entre le métabolisme et la qualité de l'ovocyte**. A terme, ces recherches devraient permettre d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans cet effet du métabolisme, de comprendre leur action et de fournir des leviers permettant d'améliorer la fertilité femelle en contrôlant le métabolisme ou en ajustant leur sélection à des bases phénotypiques fines.

Mes recherches porteront sur **la régulation des stades finaux de la différenciation et de la maturation ovocytaire** car ces stades déterminent en grande partie la qualité de l'ovocyte, sous la dépendance de son environnement local et général. En ce qui concerne la différenciation propre de l'ovocyte, les résultats de mes travaux m'orientent vers l'étude de la **régulation post-transcriptionnelle** de la différenciation ovocytaire. Il est important de s'intéresser à la fois à l'ovocyte et aux cellules du cumulus (CC) qui constituent son environnement somatique direct. En effet, il est maintenant clairement établi que le **dialogue ovocyte/cumulus** joue un rôle déterminant au cours de la croissance folliculaire, régulant à la fois l'acquisition de la compétence au développement par l'ovocyte et la croissance folliculaire elle-même. Mes travaux auront à la fois des retombées cognitives et appliquées. Au niveau cognitif, ils seront orientés vers l'étude des mécanismes régulateurs de la **synthèse des protéines** et de leurs **modifications post traductionnelles et leurs conséquences sur les voies de signalisation** impliquées dans la régulation de la maturation. Ce travail comportera également des **retombées appliquées**, avec par exemple l'identification de **biomarqueurs** non invasifs de la qualité ovocytaire, outils déterminants pour le succès de l'assistance à la procréation, en particulier dans l'espèce humaine.

Des collaborations avec plusieurs équipes scientifiques françaises et étrangères sont prévues pour développer ces projets.

Recherches cognitives : qualité de l'ovocyte

Comme décrit précédemment dans l'introduction de ce manuscrit, la qualité de l'ovocyte dépend des relations qu'il entretient avec son environnement somatique au cours de sa différenciation, de la reprise appropriée de la méiose et du déroulement de sa maturation et enfin, de l'environnement métabolique de ces phénomènes. Je vais donc développer ces trois aspects qui sont au cœur de mes différents projets de recherche.

1. Dialogue ovocyte - cumulus.

a) A **court terme**, la **validation** des résultats d'expression différentielle obtenus par **microarrays** dans le modèle d'**ovocytes** maturés en présence ou absence de cumulus (COC vs DO) sera effectuée par RT-PCR en temps réel. En ce que concerne l'expression dans l'ovocyte, la validation est prise en charge par Sylvain Auclair, post-doctorant recruté dans le cadre du contrat Ovogenae-II. Pour la partie **cumulus**, l'analyse des données transcriptomiques obtenues fait l'objet de la dernière année de thèse de Mohamad Salhab. Elle comprend une analyse par "clustering" pour déterminer les groupes de gènes qui varient d'une façon similaire, et la validation de l'expression différentielle des gènes appartenant aux différents clusters par RT-PCR en temps réel. L'expression des gènes **marqueurs potentiels de la qualité ovocytaire** dans **cumulus** sera analysée dans différents modèles ayant des qualités ovocytaires différentes (maturation *in vitro* et *in vivo*, veaux prépubères, taille et qualité folliculaire...). Une analyse des protéines sera ensuite menée pour les candidats les plus pertinents sur les modèles différentiels *in vitro*.

b) A **moyen terme** et sur une durée de quatre ans, je me suis engagée dans un projet financé par l'ANR à partir de 2009 nommé "OSCILE: Oocyte-somatic cells interactions: lessons from evolution". Je suis responsable du partenariat en ce qui concerne l'UMR PRC. Ce projet comprend plusieurs partenaires : l'UMR 6061 CNRS-Université de Rennes (Franck Chesnel), le SCRIBE INRA (Julien Bobe, coordinateur) et de l'Université d'Aix-Marseille (Pierre Pontarotti).

Ce projet a pour objectif de **comparer le rôle du dialogue ovocyte – cellules somatiques** sur **l'acquisition de la compétence ovocytaire au développement** chez différents vertébrés afin de déterminer les mécanismes les plus importants, conservés dans différentes stratégies évolutives. C'est un projet de génomique comparative qui sera réalisé en parallèle chez deux espèces de vertébrés inférieurs (la truite arc-en-ciel et le xénope) et deux espèces supérieures (la souris et la vache). Il est prévu d'utiliser, pour chaque espèce, des puces Agilent (44K) spécifiques à l'espèce pour réaliser une **analyse transcriptomique** des cellules de la granulosa (cumulus pour les mammifères) à **différents stades pré-ovulatoires**, entourant des ovocytes de **différentes qualités**. L'analyse phylogénétique sera effectuée pour l'ensemble des gènes différentiels communs. Dans une deuxième partie du projet, il est prévu de réaliser des **analyses fonctionnelles** sur un nombre restreint de candidats en visant des mécanismes conservés chez les quatre espèces ou seulement chez les vertébrés supérieurs. Ce travail a débuté en 2009, nous avons déjà stocké les cumulus dont les ovocytes ont une compétence au développement différente (COC immatures de veaux et des vaches adultes, COC maturés *in vitro* ou *in vivo*). Les ARN sont déjà extraits et les hybridations seront être réalisées très prochainement en collaboration avec la plateforme transcriptomique Agilent à Rennes.

c) Des **voies de signalisation différentes** semblent être impliquées au cours de la maturation de l'ovocyte, selon qu'il soit entouré ou non de son cumulus (MAPK14, AMPK, AKT). Ces sujets ont

déjà été abordés dans nos travaux précédents et seront développés plus en profondeur dans les prochaines études **à moyen et long terme**.

2. Régulation méiotique de l'ovocyte

A court et moyen terme, les études seront menées sur des **acteurs impliqués dans les voies de signalisation** activées au cours de la maturation ovocytaire que nous avons mis récemment en évidence dans l'ovocyte et le cumulus bovin : kinases GSK3, AURKA, AMPK (**articles 1, 5, 7**). Dans un premier temps, je vais rechercher le rôle ou les rôles que peuvent jouer les protéines p38 MAPK et mTOR (régulateur de la synthèse protéique) dans la maturation de l'ovocyte, et comment ils sont liés à la synthèse/activation de kinases Aurora .

J'étudierai ensuite la régulation de ces protéines dans l'ovocyte et le cumulus par des facteurs qui modifient le métabolisme intra-folliculaire. Une question sera par exemple de déterminer si l'AMPK, un senseur clé du métabolisme exprimé dans les complexes ovocyte-cumulus, intervient dans cette régulation. La metformine (activateur de l'AMPK) est connue pour améliorer la fertilité des patientes atteintes de syndrome polykystique (PCOS). Elle peut modifier les niveaux de sécrétion de l'insuline et des stéroïdes (Kocak, Ustun, 2006, Sahin et al. 2007). Chez les femmes atteintes du PCOS, des polymorphismes nucléotidiques ont été observés au niveau des gènes GSK3B et AKT2 – deux membres de la voie de signalisation insuline/PI3K (Goodarzi et al. 2007; Goodarzi et al. 2008; Goodarzi et al. 2008). Chez les rates hyper insulinémiques PCOS les niveaux ovariens de AKT, de phospho-AKT et de phospho-GSK3B sont augmentés par rapport aux animaux contrôles, mais pas ceux de MAPK/ERK1/2 (Chakrabarty, Nagamani, 2008). Ces résultats laissent supposer que la sensibilité à l'insuline chez les patientes atteintes d'un PCOS puisse être régulée par la voie de signalisation AKT/GSK3.

Chez les **vaches laitières hautes productrices** la présence de kystes ovariens est fréquemment associée à l'allongement de l'intervalle entre les vêlages (Vanholder et al. 2006). Un polymorphisme du gène codant pour l'une des sous-unités de l'AMPK a été observé en relation avec un **caractère de production laitière** chez la vache (Benkel et al. 2005). Il me paraît donc intéressant d'étudier l'expression de l'AMPK et d'autres acteurs de la voie de l'insuline/PI3K (GSK3B, AKT/PKB) dans des follicules normaux et kystiques chez la vache, ainsi que dans les follicules de différentes tailles et degré de la maturation chez les animaux normaux ou présentant une fertilité réduite.

3. Fonction ovarienne et métabolisme énergétique

Cette thématique est une **nouvelle** orientation de mes recherches, justifiée par les résultats décrits et par le choix que j'ai fait de faire passer cette thématique au premier plan de mes travaux en rejoignant l'équipe « Interactions Métabolisme Reproduction » en cours de création dans l'unité.

L'interaction entre la reproduction et le métabolisme chez la femelle dépend principalement du système endocrinien de l'axe gonado-hypophysaire. Des modifications quantitatives ou qualitatives de l'apport alimentaire modulent l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysio-ovarien car ils provoquent des changements de signaux hormonaux (pulsatilité du GnRH, taux d'insuline, IGF, leptine) qui conduisent à des variations importantes des flux métaboliques dans l'organisme. La fonction ovarienne peut être directement affectée par des médiateurs nutritionnels tel que les hormones, les facteurs de croissance, les neuromédiateurs mais aussi les métabolites eux-mêmes tels que le glucose, les acides gras et les acides aminés. La possibilité d'une **action directe** de ces facteurs sur la maturation de l'ovocyte et **sa qualité** (capacité de développement) n'a pas encore été suffisamment étudiée chez les animaux domestiques. Toutefois, de nombreux travaux suggèrent un rôle important de ces facteurs impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique **sur la qualité de l'ovocyte**. Les composants du système **insuline/IGF** (ligands, récepteurs, IGFBP) sont présents dans les ovaires. L'ovocyte mammalien possède des récepteurs à l'insuline et la voie de l'insuline/PI3K/GSK3 y est fonctionnelle (Acevedo et al. 2007). Des **adipocytokines** et autres hormones, synthétisées et sécrétées par le tissu adipeux (leptine, adiponectine, résistine, ghréline,...), jouent des rôles importants dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysio-ovarien (Mitchell et al. 2005). Cependant, leurs fonctions au niveau ovarien n'ont été évoquées que récemment. Ajoutée dans le milieu maturation in vitro, la **leptine**, qui est connue réguler la sécrétion du GnRH et des gonadotropines au niveau central, améliore la maturation cytoplasmique de l'ovocyte et augmente le taux de développement jusqu'au stade blastocyste chez les porcins et bovins (Craig et al. 2005, Paula-Lopes et al. 2007). L'**adiponectine** stimule l'utilisation du glucose et l'oxydation des acides gras. L'adiponectine et ses récepteurs sont présents dans l'hypophyse mais également dans l'ovaire, y compris l'ovocyte, où ils régulent directement la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa (Chabrolle et al. 2007). L'adiponectine ajoutée pendant la MIV augmente la qualité de la maturation via la voie p38 MAPK et le taux de développement des embryons chez le porc (Chappaz et al. 2008).

Les nutriments, en particulier le **glucose**, les **acides gras** et certains **acides aminés**, peuvent aussi moduler les fonctions ovariennes par une action directe et/ou indirecte. Différents transporteurs du glucose: GLUT1 et l'insulino-dépendant GLUT4 sont exprimés dans l'ovaire (Williams et al. 2001). Le glucose ajouté dans le milieu de la MIV à la concentration proche de celle maintenue dans le liquide folliculaire augmente la vitesse de progression de la maturation nucléaire et les taux de développement embryonnaire (Iwata et al. 2004). Les **acides gras** pourraient également moduler la croissance folliculaire par une action directe au niveau ovarien (Dupont et al., 2008). Dans ce sens, notre laboratoire a montré la présence d'un récepteur aux acides gras, PPAR gamma, dans les cellules de la granulosa de brebis (Froment et al., 2003). Une concentration élevée en acides gras pendant la MIV a un effet négatif sur la maturation, la fécondation et le développement des embryons chez la vache (Leroy et al. 2005). La concentration de certains **acides aminés**, notamment celle de l'alanine et de la glycine dans le liquide folliculaire varie en fonction du stade de croissance du follicule. Une

corrélation a été mise en évidence entre ces valeurs et la qualité de l'ovocyte en terme de capacité au développement jusqu'au stade de blastocyste après FIV (Sinclair et al. 2008).

Projets à moyen et long terme :

Je suis intéressée par les molécules qui jouent un rôle dans la régulation de la **balance énergétique** de l'organisme et qui sont également présentes dans l'ovocyte et les cellules qui l'entourent (AMPK, adiponectine, resistine,...). Nos travaux récents ont montré que ces facteurs sont exprimés par l'ovocyte et les cellules folliculaires. Des modifications de leur expression ou activité pourraient être liées à la baisse de fertilité des vaches laitières hautes productrices. Nous allons donc poursuivre nos travaux sur l'effet de l' adiponectine, de la résistine et d'autres senseurs du métabolisme énergétique sur la maturation de l'ovocyte et sa compétence au développement.

Compte tenu de la forte corrélation négative entre la fertilité et l'intensité de la **mobilisation des réserves énergétiques**, étudier le rôle des voies métaboliques (insuline, acides gras), dans la fonction de reproduction chez la vache, et particulièrement au niveau folliculaire et ovocytaire, me semble très intéressant et prometteur. Nous disposons à l'UEPAO (unité expérimentale attenante à notre unité de recherche) de deux lots de vaches avec un taux différent de réussite après la 1ère IA (insémination animale). Ces animaux se distinguent par un haplotype **Fertil+/+** et **Fertil-/-** pour un QTL de "Fertilité femelle" situé sur le chromosome 3.

Différentes approches peuvent être envisagées, comme les analyses biochimique, protéomique et fonctionnelle au niveau de follicules individuels chez les vaches, mais aussi d'autres espèces, y compris les espèces modèles telles que la souris. Les méthodes d'analyse fine sur les cellules de la granulosa murale et les cumulus obtenus par OPU seront développées sur les animaux de fertilité différente (vaches Fertil+/+ et Fertil-/-) ou soumis à différents régimes nutritionnels. Ces sujets vont être l'objet de collaborations avec d'autres laboratoires, français ou européens.

Le travail que j'ai effectué jusqu'à présent m'a permis d'acquérir les connaissances et les méthodes nécessaires pour ce projet et de construire un réseau de collaboration. Mes projets futurs seront effectués dans le cadre d'une nouvelle équipe de recherche portant sur les interactions entre le métabolisme et la reproduction, dirigée par Joëlle Dupont.

Recherches appliquées – identification de biomarqueurs de la qualité de l'ovocyte

Depuis plus de deux ans je travaille en étroite collaboration avec le laboratoire de spectrométrie de masse (responsable Valérie Labas) de la Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomarqueurs (PAIB) cellulaires et moléculaires qui est localisée dans l'Unité. Cette collaboration sera poursuivie dans le

cadre de la recherche de marqueurs de la qualité ovocytaire au sein de l'ovocyte et des cellules de cumulus chez le bovin.

La **prédiction du potentiel de développement** d'un ovocyte donné est un enjeu majeur dans le champ de la biologie de la reproduction. En effet, dans le cadre de l'**assistance à la procréation** humaine, cette prédiction permettrait de réduire le nombre d'embryons transférés et donc de diminuer le risque de grossesse multiple tout en optimisant les chances de succès. Les recherches sur l'ovocyte sont impossibles chez la femme pour des raisons éthiques, excepté dans des conditions non-physiologiques (ovocytes immatures ou en échec de fécondation). En revanche, les cellules de cumulus humaines sont facilement accessibles, en particulier lors des procédures d'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI). L'étude du profil d'expression de protéines dans le cumulus semble donc être un moyen non invasif pour apprécier la qualité de l'ovocyte qu'il entoure tout en préservant l'intégrité de celui-ci.

Pour ces raisons, l'objectif de notre projet est de suivre l'expression de protéines spécifiques dans les cellules de cumulus en fonction de la maturité nucléaire de l'ovocyte et de sa capacité de développement *in vitro* jusqu'au stade blastocyste. Les cumulus et ovocyte bovins semblent être un bon modèle pour rechercher les marqueurs de la maturation ovocytaire.

Nous avons mis au point les techniques ICM-MS d'abord sur les pools de cellules de cumulus (CC) bovines. Actuellement nous sommes capables d'analyser des CC de complexes ovocyte-cumulus (COC) individuels et même des biopsies de COCs maturés *in vitro* qui sont ensuite fécondés individuellement. Nous recherchons actuellement les **corrélations entre le profil obtenu par ICM-MS sur les CC et la capacité de développement de l'ovocyte** correspondant en vue d'identifier des protéines exprimées dans le cumulus en relation avec le devenir de l'ovocyte après fécondation.

Cette approche a été testée également sur les CC humaines, récoltées lors d'ICSI dans le cadre d'un projet commun avec le laboratoire de biologie de la reproduction CHRU Bretonneau (collaboration V. Cadoret, responsable D. Royère), et ce travail continue.

En perspective, l'identification d'un ou plusieurs marqueur(s) moléculaire(s) permettrait à l'ensemble de la communauté médicale de disposer de critères supplémentaires, communs et objectifs, permettant de déterminer les ovocytes présentant le meilleur potentiel de développement et donc les embryons les plus susceptibles de s'implanter.

Le travail de recherche de biomarqueurs potentiels de la maturité ovocytaire sur un plus grand nombre de modèles et d'échantillons sera poursuivi. Leur identification et leur localisation intra - cellulaire seront étudiées. Différentes parties de ce travail font l'objet d'un projet déposé à la Région Centre (projet PHARAOMIC).

A **très court terme**, l'analyse de grand nombre de spectres ICM-MS d'échantillons de CC et d'ovocytes bovins et équins sera effectuée par un logiciel Progenesis-MALDI:

- CC de COC individuels immatures et maturés *in vitro*
- COC obtenus par OPU *in vivo* : CC de follicules préovulatoires > 10 mm (cumulus expansé ou compact, ovocyte mature ou non)

- Biopsies de COC individuels maturés in vitro dont le développement in vitro (DIV) des ovocytes est suivi individuellement en parallèle.
- Ovocytes immatures et à différents stades de maturation in vitro
- Cellules de la granulosa murale de follicules individuels dont le DIV des ovocytes est suivi individuellement en parallèle.

A moyen terme, l'identification des protéines d'intérêt visualisées lors de l'analyse MALDI sur cellules entières (ovocyte et CC) sera poursuivie. Les protéines < 30 kDa seront enrichies par des méthodes chromatographiques (tamis moléculaire) puis purifiées par chromatographie liquide à phase reverse. L'ensemble des espèces moléculaires isolées seront alors identifiées par l'analyse nano-LC-MS/MS des peptides après digestion par la trypsine.

Dans le cas où le projet PHARAHOMIC serait accepté par la Région Centre, l'arrivée d'un spectromètre de masse à **haute résolution** (LTQ-Orbitrap) plus résolutif et plus sensible, pourrait alors nous orienter vers de nouvelles stratégies analytiques telles que l'analyse "Top down" qui consiste à fragmenter directement les espèces intactes pour obtenir des informations de séquences et ainsi les identifier. D'autres approches globales différentielles faisant appel aux technologies de type iTRAQ ou "label free" pourraient être adoptées pour l'identification et la quantification de biomarqueurs par nanoLC-2D-MS/MS.

En conclusion, à plus long terme, nos recherches tant appliquées que cognitives permettront je l'espère l'identification de facteurs déterminants de la qualité de l'ovocyte, exprimés dans l'ovocyte lui-même ou dans les cellules du cumulus voisines. Il sera très intéressant alors de localiser ces marqueurs au niveau **intracellulaire** et de développer des approches visant à comprendre leurs fonctions.

Références citées

- Abrieu, A, Doree, M, Fisher, D 2001. The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *J Cell Sci* 114. 114(Pt 2. Pt 2), 257-67-257-67.
- Acevedo N, Ding J, Smith GD, 2007. Insulin signaling in mouse oocytes. *Biol Reprod* 77:872-9
- Andresson T, Ruderman JV, 1998. The kinase Eg2 is a component of the *Xenopus* oocyte progesterone-activated signaling pathway. *EMBO J* 17:5627-37
- Assou S, Anahory T, Pantesco V, Carrouer TL, Pellestor F, Klein B, Reyftmann L, Dechaud H, Vos JD, Hamamah S, 2006. The human cumulus-oocyte complex gene-expression profile. *Hum Reprod*
- Barnard DC, Ryan K, Manley JL, Richter JD, 2004. Symplekin and xGLD-2 are required for CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation. *Cell* 119:641-51
- Benkel B, Kollers S, Fries R, Sazanov A, Yoshida E, Valle E, Davoren J, Hickey D, 2005. Characterization of the bovine ampkgamma1 gene. *Mamm Genome* 16:194-200
- Berendt FJ, Frohlich T, Bolbrinker P, Boelhauve M, Gungor T, Habermann FA, Wolf E, Arnold GJ, 2009a. Highly sensitive saturation labeling reveals changes in abundance of cell cycle-associated proteins and redox enzyme variants during oocyte maturation in vitro. *Proteomics*
- Bettegowda A, Smith GW, 2007. Mechanisms of maternal mRNA regulation: implications for mammalian early embryonic development. *Front Biosci* 12:3713-26

- Bhojwani M, Rudolph E, Kanitz W, Zuehlke H, Schneider F, Tomek W, 2006. Molecular analysis of maturation processes by protein and phosphoprotein profiling during in vitro maturation of bovine oocytes: a proteomic approach. *Cloning Stem Cells* 8:259-74
- Bilodeau-Goeseels S, Sasseville M, Guillemette C, Richard FJ, 2007. Effects of adenosine monophosphate-activated kinase activators on bovine oocyte nuclear maturation in vitro. *Mol Reprod Dev* 74:1021-34
- Cao Q, Richter JD, 2002. Dissolution of the maskin-eIF4E complex by cytoplasmic polyadenylation and poly(A)-binding protein controls cyclin B1 mRNA translation and oocyte maturation. *EMBO J* 21:3852-62
- Caraty A, Franceschini I, 2008. Basic aspects of the control of GnRH and LH secretions by kisspeptin: potential applications for better control of fertility in females. *Reprod Domest Anim* 43 Suppl 2:172-8
- Chabrolle C, Tosca L, Dupont J, 2007. Regulation of adiponectin and its receptors in rat ovary by human chorionic gonadotrophin treatment and potential involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis. *Reproduction* 133:719-31
- Chakrabarty S, Nagamani M, 2008. Peripubertal hyperinsulinemia upregulates phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway in rat ovaries. *Reprod Sci* 15:274-84
- Chappaz E, Alborno MS, Campos D, Che L, Palin MF, Murphy BD, Bordignon V, 2008. Adiponectin enhances in vitro development of swine embryos. *Domest Anim Endocrinol* 35:198-207
- Coenen K, Massicotte L, Sirard MA, 2004. Study of newly synthesized proteins during bovine oocyte maturation in vitro using image analysis of two-dimensional gel electrophoresis. *Mol Reprod Dev* 67:313-22
- Craig JA, Zhu H, Dyce PW, Wen L, Li J, 2005. Leptin enhances porcine preimplantation embryo development in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 229:141-7
- Crane R, Gadea B, Littlepage L, Wu H, Ruderman JV, 2004. Aurora A, meiosis and mitosis. *Biol Cell* 96:215-29
- Dalbies-Tran R, Mermillod P, 2003. Use of heterologous complementary DNA array screening to analyze bovine oocyte transcriptome and its evolution during in vitro maturation. *Biol Reprod* 68:252-61
- de Moor, C. H. and Richter, J. D. Translational control in vertebrate development. *Int Rev Cytol* 203. 203:567-608., 567-608. 2001.
- Dong KW, Yu KL, Chen ZG, Chen YD and Roberts JL. 1997. Characterization of multiple promoters directing tissue-specific expression of the human gonadotropin-releasing hormone gene. *Endocrinology* 138:2754-2762.
- Donnay I, Faerge I, Grondahl C, Verhaeghe B, Sayoud H, Ponderato N, Galli C, Lazzari G, 2004. Effect of prematuration, meiosis activating sterol and enriched maturation medium on the nuclear maturation and competence to development of calf oocytes. *Theriogenology* 62:1093-107
- Driancourt MA, Thuel B, 1998. Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. A review. *Reprod Nutr Dev* 38:345-62
- Dupont J, Froment P, Rame C, Pierre P, Coyral-Castel S, & Chabrolle C 2008 [Role of the fatty acids in ovarian functions: involvement of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) and adipokines] *Gynecol Obstet Fertil*. 36 1230-8.
- Fair T, Carter F, Park S, Evans AC, Lonergan P, 2007. Global gene expression analysis during bovine oocyte in vitro maturation. *Theriogenology* 68 Suppl 1:S91-7
- Fair, T., Hulshof, S. C., Hyttel, P., Greve, T., and Boland, M. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. *Mol Reprod Dev* 46. 46(2. 2), 208-15-208-15. 97.
- Fatehi AN, Zeinstra EC, Kooij RV, Colenbrander B, Bevers MM, 2002. Effect of cumulus cell removal of in vitro matured bovine oocytes prior to in vitro fertilization on subsequent cleavage rate. *Theriogenology* 57:1347-55
- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA, 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*
- Froment P, Fabre S, Dupont J, Pisselet C, Chesneau D, Staels B, & Monget P 2003 Expression and functional role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in ovarian folliculogenesis in the sheep *Biol Reprod*. 69 1665-74.
- Funston RN, Seidel GE Jr, 1995. Gonadotropin-releasing hormone increases cleavage rates of bovine oocytes fertilized in vitro. *Biol Reprod* 53:541-5
- Gasca S, Pellestor F, Assou S, Loup V, Anahory T, Dechaud H, De Vos J, Hamamah S, 2007. Identifying new human oocyte marker genes: a microarray approach. *Reprod Biomed Online* 14:175-83
- Goodarzi MO, Antoine HJ, Pall M, Cui J, Guo X, Azziz R, 2007. Preliminary evidence of glycogen synthase kinase 3 beta as a genetic determinant of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 87:1473-6
- Goodarzi, Mark O., Jones, Michelle R., Chen, Yii-Der I., and Azziz, Ricardo. AKT2: First Evidence of Genetic Association with Polycystic Ovary Syndrome. *Diabetes Care* , dc08-0532. 2008.
- Habibi HR, Van der Kraak G, Bulanski E and Peter RE. 1988. Effect of teleost GnRH on reinitiation of oocyte meiosis in goldfish, in vitro. *Am J Physiol* 255:R268-R273.

- Hodgman, Rebecca, Tay, Joyce, Mendez, Raul, and Richter, Joel D. CPEB phosphorylation and cytoplasmic polyadenylation are catalyzed by the kinase IAK1/Eg2 in maturing mouse oocytes. *Development* 128(14), 2815-2822. 2001.
- Holm P, Booth PJ, Callesen H, 2002. Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo- and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. *Reproduction* 123:553-65
- Humblot P, Holm P, Lonergan P, Wrenzycki C, Lequarre AS, Joly CG, Herrmann D, Lopes A, Rizos D, Niemann H, Callesen H, 2005. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 63:1149-66
- Iwata H, Hashimoto S, Ohta M, Kimura K, Shibano K, Miyake M, 2004. Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction* 127:159-64
- Jones GM, Cram DS, Song B, Magli MC, Gianaroli L, Lacham-Kaplan O, Findlay JK, Jenkin G, Trounson AO, 2008. Gene expression profiling of human oocytes following in vivo or in vitro maturation. *Hum Reprod* 23:1138-44
- Josefsberg LB, Galiani D, Lazar S, Kaufman O, Seger R, Dekel N, 2003. Maturation-promoting factor governs mitogen-activated protein kinase activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. *Biol Reprod* 68:1282-90
- Kashiwabara S, Nakanishi T, Kimura M, Baba T, 2008. Non-canonical poly(A) polymerase in mammalian gametogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1779:230-8
- Kastrop PM, Bevers MM, Destree OH, Kruip TA, 1990. Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation in vitro. *J Reprod Fertil* 90:305-10
- Katz-Jaffe, Mandy G., Gardner, David K., and Schoolcraft, William B. Proteomic analysis of individual human embryos to identify novel biomarkers of development and viability. *Fertility and Sterility* 85(1), 101-107. 2006.
- Kim DH, Ko DS, Lee HC, Lee HJ, Park WI, Kim SS, Park JK, Yang BC, Park SB, Chang WK, Lee HT, 2004. Comparison of maturation, fertilization, development, and gene expression of mouse oocytes grown in vitro and in vivo. *J Assist Reprod Genet* 21:233-40
- Kocak I, Ustun C, 2006. Effects of metformin on insulin resistance, androgen concentration, ovulation and pregnancy rates in women with polycystic ovary syndrome following laparoscopic ovarian drilling. *J Obstet Gynaecol Res* 32:292-8
- Lee YS, Latham KE, Vandevoort CA, 2008. Effects of in vitro maturation on gene expression in rhesus monkey oocytes. *Physiol Genomics* 35:145-58
- Leroy JL, Vanholder T, Mateusen B, Christophe A, Opsomer G, de Kruif A, Genicot G, Van Soom A, 2005. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction* 130:485-95
- Levesque, JT and Sirard, MA. Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B in bovine oocytes. *Biol Reprod* 55(6), 1427-1436. 96.
- Liang, Cheng-Guang, Su, You-Qiang, Fan, Heng-Yu, Schatten, Heide, and Sun, Qing-Yuan. Mechanisms Regulating Oocyte Meiotic Resumption: Roles of Mitogen-Activated Protein Kinase. *Mol Endocrinol* 21(9), 2037-2055. 2007.
- Lonergan P, Khatir H, Piumi F, Rieger D, Humblot P, Boland MP, 1999. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *J Reprod Fertil* 117:159-67
- Luciano AM, Lodde V, Beretta MS, Colleoni S, Lauria A, Modena S, 2005. Developmental capability of denuded bovine oocyte in a co-culture system with intact cumulus-oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glutathione. *Mol Reprod Dev* 71:389-97
- Mason AJ, Pitts SL, Nikolics K, Szonyi E, Wilcox JN, Seeburg PH, Stewart TA, 1986. The hypogonadal mouse: reproductive functions restored by gene therapy. *Science* 234:1372-8
- Maton G, Thibier C, Castro A, Lorca T, Prigent C, Jesus C, 2003. Cdc2-cyclin B triggers H3 kinase activation of Aurora-A in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 278:21439-49
- Mayes MA, Laforest MF, Guillemette C, Gilchrist RB, Richard FJ, 2007. Adenosine 5'-monophosphate kinase-activated protein kinase (PRKA) activators delay meiotic resumption in porcine oocytes. *Biol Reprod* 76:589-97
- McGee, E. A. and Hsueh, A. J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 21. 21(2. 2), 200-14-200-14. 2000.
- Mehlmann LM, 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 130:791-9
- Memili E, Peddinti D, Shack LA, Nanduri B, McCarthy F, Sagirkaya H, Burgess SC, 2007a. Bovine germinal vesicle oocyte and cumulus cell proteomics. *Reproduction* 133:1107-20
- Mendez R, Richter JD, 2001. Translational control by CPEB: a means to the end. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:521-9

- Mermillod P, Marchal R, 1999. [Oocyte of domestic mammals: a model for the study of in vitro maturation]. *Contracept Fertil Sex* 27:440-8
- Mermillod P, Dalbiès-Tran R, Uzbekova S, Thélie A, Traverso JM, Perreau C, Papillier P, Monget P. 2008 Factors affecting oocyte quality: who is driving the follicle? *Reprod Domest Anim.* Jul;43 Suppl 2:393-400. Review.
- Mitchell M, Armstrong DT, Robker RL, Norman RJ, 2005. Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction* 130:583-97
- Monniaux D, A. Caraty, F. Clément, R. Dalbiès-Tran, J. Dupont, S. Fabre, N. Gérard, P. Mermillod, P. Monget, S. Uzbekova (2009) Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. INRA Productions Animales (in press)
- Nganvongpanit K, Muller H, Rings F, Hoelker M, Jennen D, Tholen E, Havlicek V, Besenfelder U, Schellander K, Tesfaye D, 2006. Selective degradation of maternal and embryonic transcripts in in vitro produced bovine oocytes and embryos using sequence specific double-stranded RNA. *Reproduction* 131:861-74
- Nishimura Y, Tsutomu Endo, Kiyoshi Kano, Kunihiko Naito 2009 Porcine Aurora A accelerates Cyclin B and Mos synthesis and promotes meiotic resumption of porcine oocytes. *Animal Reproduction Science* 113 : 114–124
- Osborne, H. B. and Richter, J. D. Translational control by polyadenylation during early development. *Prog Mol Subcell Biol* 18. 18:173-98., 173-98. 97.
- Paula-Lopes FF, Boelhaue M, Habermann FA, Sinowatz F, Wolf E, 2007. Leptin promotes meiotic progression and developmental capacity of bovine oocytes via cumulus cell-independent and -dependent mechanisms. *Biol Reprod* 76:532-41
- Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M. 2004. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 303(5658):682-684.
- Pennetier S, Perreau C, Uzbekova S, Thelie A, Delaleu B, Mermillod P, Dalbiès-Tran R, 2006. MATER protein expression and intracellular localization throughout folliculogenesis and preimplantation embryo development in the bovine. *BMC Dev Biol* 6:26
- Racki, Waldemar J. and Richter, Joel D. CPEB controls oocyte growth and follicle development in the mouse. *Development* 133(22), 4527-4537. 2006.
- Radovick S, Ticknor CM, Nakayama Y, Notides AC, Rahman A, Weintraub BD, Cutler GB Jr, Wondisford FE. Evidence for direct estrogen regulation of the human gonadotropin-releasing hormone gene. *J Clin Invest.* 1991 88(5):1649-55.
- Rizos D, Fair T, Papadopoulos S, Boland MP, Lonergan P, 2002a. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Mol Reprod Dev* 62:320-7
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P, 2002b. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 61:234-48
- Romar Raquel, Teresa De Santis, Pascal Papillier, Christine Perreau, Aurore Thelie ,Maria Elena Dell'Aquila, Pascal Mermillod, and Rozenn Dalbiès-Tran. Expression of several maternal-effect and peroxiredoxin genes is affected in bovine oocytes with distinct developmental competence. –s ubmitted
- Rouhana L, Wickens M, 2007. Autoregulation of GLD-2 cytoplasmic poly(A) polymerase. *RNA* 13:188-99
- Royere D, Guerif F, 2008. [Preimplantation embryo development: current status and perspectives in clinical embryology]. *Gynecol Obstet Fertil* 36:1119-25
- Sahin Y, Unluhizarci K, Yilmazsoy A, Yikilmaz A, Aygen E, Kelestimur F, 2007. The effects of metformin on metabolic and cardiovascular risk factors in nonobese women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 67:904-8
- Sarkissian, Madathia, Mendez, Raul, and Richter, Joel D. Progesterone and insulin stimulation of CPEB-dependent polyadenylation is regulated by Aurora A and glycogen synthase kinase-3. *Genes Dev.* 18(1), 48-61. 2004.
- Saskova A, Solc P, Baran V, Kubelka M, Schultz RM, Motlik J, 2008. Aurora kinase A controls meiosis I progression in mouse oocytes. *Cell Cycle* 7:2368-76
- Shoubridge EA, Wai T, 2007. Mitochondrial DNA and the mammalian oocyte. *Curr Top Dev Biol* 77:87-111
- Schramm RD, Paprocki AM, VandeVoort CA. 2003 Causes of developmental failure of in-vitro matured rhesus monkey oocytes: impairments in embryonic genome activation. *Hum Reprod*, 18(4): 826-833
- Sinclair KD, Lunn LA, Kwong WY, Wonnacott K, Linforth RS, Craigon J, 2008. Amino acid and fatty acid composition of follicular fluid as predictors of in-vitro embryo development. *Reprod Biomed Online* 16:859-68
- Sirard, M. A., Parrish, J. J., Ware, C. B., Leibfried-Rutledge, M. L., and First, N. L. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol Reprod* 39. 39(3. 3), 546-52-546-52. 88.
- Sirotkin AV, Duksova J, Makarevich AV, Kubek A, Bulla J, 2000. Evidence that growth factors IGF-I, IGF-II and EGF can stimulate nuclear maturation of porcine oocytes via intracellular protein kinase A. *Reprod Nutr Dev* 40:559-69

- Suss U, Wuthrich K, Stranzinger G, 1988. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured in vitro. *Biol Reprod* 38:871-80
- Swain JE, Ding J, Wu J, Smith GD, 2008. Regulation of spindle and chromatin dynamics during early and late stages of oocyte maturation by aurora kinases. *Mol Hum Reprod* 14:291-9
- Takakura I, Naito K, Iwamori N, Yamashita M, Kume S, Tojo H, 2005. Inhibition of mitogen activated protein kinase activity induces parthenogenetic activation and increases cyclin B accumulation during porcine oocyte maturation. *J Reprod Dev* 51:617-26
- Thelie A, Papillier P, Penetier S, Perreau C, Traverso JM, Uzbekova S, Mermillod P, Joly C, Humblot P, Dalbies-Tran R, 2007. Differential regulation of abundance and deadenylation of maternal transcripts during bovine oocyte maturation in vitro and in vivo. *BMC Dev Biol* 7:125
- Thelie A, Papillier P, Perreau C, Uzbekova S, Hennequet-Antier C, Dalbies-Tran R. 2009 Regulation of bovine oocyte-specific transcripts during in vitro oocyte maturation and after maternal-embryonic transition analyzed using a transcriptomic approach. *Mol Reprod Dev*. Apr 2.
- Tomek W, Torner H, Kanitz W, 2002. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. *Reprod Domest Anim* 37:86-91
- Tomek W & Smiljakovic T 2005 Activation of Akt (protein kinase B) stimulates metaphase I to metaphase II transition in bovine oocytes *Reproduction*. 130 423-30.
- Tosca L, Chabrolle C, Uzbekova S, Dupont J, 2006. Effects of Metformin on Bovine Granulosa Cells Steroidogenesis: Possible Involvement of Adenosine 5' Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK). *Biol Reprod*
- Tosca L, Uzbekova S, Chabrolle C, Dupont J, 2007. Possible Role of 5'AMP-Activated Protein Kinase in the Metformin-Mediated Arrest of Bovine Oocytes at the Germinal Vesicle Stage During In Vitro Maturation. *Biol Reprod*
- Tosti, E., Boni, R., and Cuomo, A. Ca²⁺ current activity decreases during meiotic progression in bovine oocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 279. 279(6. 6), C1795-800-C1795-800. 2000.
- Uzbekova S, Arlot-Bonnemains Y, Dupont J, Dalbiès-Tran R, Papillier P, Penetier S, Thélie A, Perreau C, Mermillod P, Prigent C, Uzbekov R. 2008 Spatio-temporal expression patterns of aurora kinases A, B, and C and cytoplasmic polyadenylation-element-binding protein in bovine oocytes during meiotic maturation. *Biol Reprod*. 2008 Feb;78(2):218-33. Epub 2007 Aug 8.
- Vanholder T, Opsomer G, de Kruif A, 2006. Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reprod Nutr Dev* 46:105-19
- Vigneron C, Perreau C, Dalbies-Tran R, Joly C, Humblot P, Uzbekova S, Mermillod P, 2004a. Protein synthesis and mRNA storage in cattle oocytes maintained under meiotic block by roscovitine inhibition of MPF activity. *Mol Reprod Dev* 69:457-65
- Vigneron C, Perreau C, Dalbies-Tran R, Joly C, Humblot P, Uzbekova S, Mermillod P, 2004b. Protein synthesis and mRNA storage in cattle oocytes maintained under meiotic block by roscovitine inhibition of MPF activity. *Mol Reprod Dev* 69:457-65
- Vigneron C, Perreau C, Dupont J, Uzbekova S, Prigent C, Mermillod P, 2004c. Several signaling pathways are involved in the control of cattle oocyte maturation. *Mol Reprod Dev* 69:466-74
- Villa-Diaz LG & Miyano T 2004 Activation of p38 MAPK during porcine oocyte maturation *Biol Reprod*. 71 691-6.
- Wehrend A, Meinecke B, 2001. Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during in vitro maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. *Anim Reprod Sci* 66:175-84
- Wells D, Patrizio P, 2008. Gene expression profiling of human oocytes at different maturational stages and after in vitro maturation. *Am J Obstet Gynecol* 198:455.e1-9; discussion 455.e9-11
- Williams SA, Blache D, Martin GB, Foot R, Blackberry MA, Scaramuzzi RJ, 2001. Effect of nutritional supplementation on quantities of glucose transporters 1 and 4 in sheep granulosa and theca cells. *Reproduction* 122:947-56
- Wu B, Ignatz G, Currie WB, Yang X, 1997. Expression of Mos proto-oncoprotein in bovine oocytes during maturation in vitro. *Biol Reprod* 56:260-5
- Wu X, Matzuk MM, 2002. GDF-9 and BMP-15: oocyte organizers. *Rev Endocr Metab Disord* 3:27-32
- Wu X, Viveiros MM, Eppig JJ, Bai Y, Fitzpatrick SL, Matzuk MM, 2003a. Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nat Genet* 33:187-91
- Wu X, Wang P, Brown CA, Zilinski CA, Matzuk MM, 2003b. Zygote arrest 1 (zar1) is an evolutionarily conserved gene expressed in vertebrate ovaries. *Biol Reprod* 69:861-7
- Zhang, L., Jiang, S., Wozniak, P. J., Yang, X., and Godke, R. A. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. *Mol Reprod Dev* 40. 40(3. 3), 338-44-338-44. 95.
- Zheng P, Dean J, 2007. Oocyte-specific genes affect folliculogenesis, fertilization, and early development. *Semin Reprod Med* 25:243-51