

L'embryon et ses mitochondries

Embryo and mitochondria

Pascale May-Panloup^{1,2}
Pascal Reynier^{2,3}

¹ Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers, France

² Mitolab, Institut Mitovasc, CNRS 6015, Inserm U1083, Université d'Angers, Angers, France

<pamaypanloup@chu-angers.fr>

³ Département de biochimie et génétique, centre hospitalier universitaire d'Angers, Angers, France

Résumé. Les mitochondries, présentes dans quasiment toutes les cellules eucaryotes, assurent la production d'énergie mais aussi de nombreuses autres fonctions essentielles pour la cellule. Leur particularité est de posséder leur propre génome, transmis selon un mode uniparental maternel qui implique des mécanismes très spécifiques survenant au cours de la gamétogenèse et de l'embryogenèse. Cet ADN mitochondrial, aisément quantifiable, constitue un excellent biomarqueur de la masse mitochondriale. L'ovocyte mature s'est ainsi révélé être la cellule de l'organisme la plus riche en ADNmt et la masse mitochondriale de l'ovocyte a été corrélée à sa compétence à soutenir le développement embryonnaire dans de nombreuses espèces. Le contingent mitochondrial ovocytaire initial est en effet la base sur laquelle s'appuie de subtiles modifications métaboliques nécessaires à chacune des étapes clés du développement embryonnaire précoce. La reprogrammation épigénétique est par exemple sous étroite influence des cofacteurs métaboliques issus du métabolisme mitochondrial et les espèces réactives de l'oxygène produites par la chaîne respiratoire sont des éléments essentiels de régulation de la signalisation cellulaire chez l'embryon. Cette implication mitochondriale dans les processus de reproduction a permis d'envisager l'ADN mitochondrial comme un biomarqueur de la compétence ovocytaire et de la viabilité embryonnaire, bien que les données actuelles méritent confirmation. Elle permet aussi d'envisager ces organites comme une cible thérapeutique potentielle. Cette revue fait le point sur vingt années de recherche ayant fait émerger ces concepts.

Mots clés : embryon, mitochondrie

Abstract. Mitochondria, present in almost all eukaryotic cells, produce energy and contribute to many other essential cellular functions. In particular, mitochondria possess their own genome, which is transmitted in a uniparental maternal mode that involves very specific mechanisms during gametogenesis and embryogenesis. This easily quantifiable mitochondrial DNA (mtDNA) is an excellent biomarker of the mitochondrial mass. The mature oocyte has been shown to be the richest cell in mtDNA and the mitochondrial mass of the oocyte has been correlated with its ability to support embryonic development in many species. The initial mitochondrial contingent of the oocyte is indeed the basis on which subtle metabolic changes are needed at each of the key stages of early embryonic development. For example, epigenetic reprogramming is under the strong influence of metabolic cofactors derived from mitochondrial metabolism, and the reactive oxygen species produced by the respiratory chain are essential elements for the regulation of cell signalling in the embryo. This mitochondrial involvement in the reproductive processes has made mtDNA a biomarker of oocyte competence and embryonic viability. Although current data require confirmation, it allows mitochondria to be considered as potential therapeutic targets. This review focuses on the past 20 years of research that have led to the emergence of these novel concepts.

Key words: embryo, mitochondria

Les mitochondries sont des organites présents dans quasiment toutes les cellules eucaryotes. Elles sont issues d'une endosymbiose entre les cellules eucaryotes ancestrales et une α -protéobactérie capable de métaboliser l'oxygène. Elles représentent le site de catabolisme terminal des molécules énergétiques et permettent la production de plus de 90 % de l'adénosine triphosphate (ATP) nécessaire aux fonctions cellulaires, par le biais de la phosphorylation oxydative (Oxphos) (figure 1).

Cette dernière dépend de l'activité de cinq complexes multienzymatiques enchâssés dans les replis (crêtes) de la membrane interne mitochondriale : les complexes I à IV, qui constituent la chaîne de transport des électrons, et le complexe V (ATP synthase), qui couple l'exploitation du potentiel de membrane à la synthèse d'ATP. Le fonctionnement Oxphos génère la majeure partie des espèces réactives de l'oxygène (ROS, pour *reactive oxygen species*) endogènes

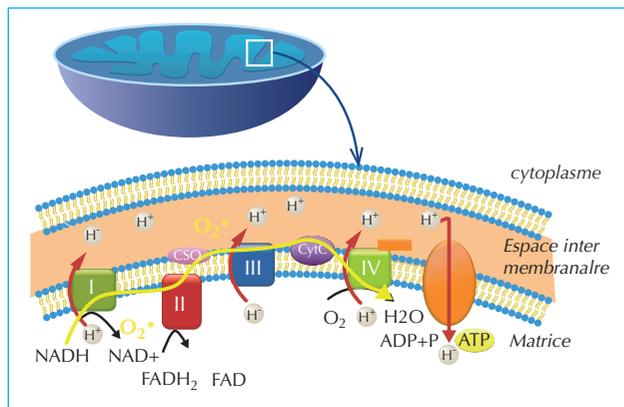


Figure 1. La mitochondrie a pour rôle central la production d'énergie sous forme d'ATP par le biais de la phosphorylation oxydative. Celle-ci est réalisée par la chaîne respiratoire constituée de 4 complexes multienzymatiques (I à IV) qui constituent la chaîne de transport des électrons et le complexe V qui produit l'ATP. Le fonctionnement d'Oxphos génère la majeure partie des ROS ($O_2\bullet$).

impliquées dans des voies de régulation cellulaires mais qui peuvent s'avérer toxiques lorsqu'elles sont produites en excès. Outre leur importance dans la production énergétique, ces organites jouent aussi un rôle central dans les biosynthèses des composés organiques, l'apoptose, l'homéostasie du calcium et la thermogénèse, ainsi que dans les voies de signalisation cellulaires et de l'expression génique [1, 2].

Chaque cellule somatique contient plusieurs centaines de mitochondries qui forment un réseau dynamique capable de se mouvoir, de se scinder et de fusionner, en réponse aux besoins cellulaires. Du fait de l'existence de ce réseau, les mitochondries sont, en pratique, difficilement dénombrables ; aussi estime-t-on souvent la masse mitochondriale de manière indirecte par la quantification de l'ADN mitochondrial (ADNmt). Les mitochondries possèdent en effet leur propre génome : une molécule d'ADN circulaire double brin d'environ 16 kilobases (Kb). La plupart des séquences de cet ADN sont codantes et permettent la synthèse de treize sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire, vingt-deux ARNt et deux ARNr. Les autres protéines mitochondriales, estimées à environ 1 500, sont codées par le génome nucléaire et adressées secondairement à la mitochondrie.

La régulation de la biogenèse mitochondriale joue un rôle essentiel dans les fonctions mitochondriales. Les facteurs impliqués dans cette régulation sont principalement le *mitochondrial transcription factor A* (TFAM), un facteur de transcription qui promeut la réplication et la transcription de l'ADNmt, et les *nuclear respiratory factors 1 and 2* (NRF1 et NRF2), qui contrôlent l'expression des protéines de la chaîne respiratoire d'origine nucléaire et celle de TFAM, assurant ainsi la coordination de l'expression des gènes mitochondriaux et nucléaires.

Les fonctions mitochondriales sont coordonnées au métabolisme cellulaire global par PGC1 α (pour *PPAR coactivator 1*) et par des désacétylases NAD-dépendantes de la famille des sirtuines.

Mitochondrie, gamétogénèse et transmission de l'ADN mitochondrial

La transmission uniparentale maternelle est la règle pour la majorité des organismes avec un génome mitochondrial uniquement hérité de l'ovocyte. Ceci est la résultante de deux événements (*figure 2*) :

- tout d'abord, plusieurs mécanismes concourent à l'élimination de l'ADNmt paternel : la diminution drastique du nombre de mitochondries au cours de la spermatogénèse et la destruction spécifique des mitochondries et/ou de l'ADNmt d'origine paternelle au cours de l'embryogénèse précoce [3],
- ensuite, au cours de l'ovogénèse, se produit une amplification globale du pool mitochondrial, faisant de l'ovocyte mature la cellule la plus riche de l'organisme en mitochondries, avec plusieurs centaines de milliers de copies d'ADNmt quelle que soit l'espèce considérée [4]. Cette amplification serait le fruit d'un phénomène appelé « goulot d'étranglement » ou *bottleneck*. Selon cette théorie, seul un très petit nombre de molécules d'ADNmt serait à l'origine de l'ADNmt ovocytaire, et par conséquent, de l'ADNmt d'un organisme. Ce mécanisme semble reposer à la fois sur une réduction du nombre de copies d'ADNmt dans les cellules germinales primordiales (qui ne contiendraient qu'un petit nombre de mitochondries

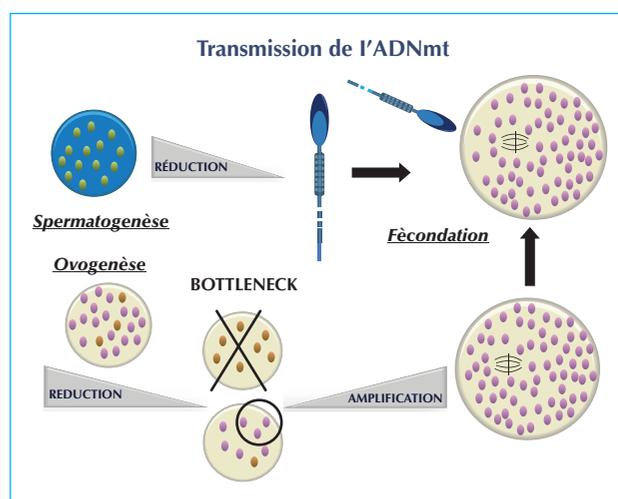


Figure 2. La transmission de l'ADNmt est uniparentale : le spermatozoïde comprend très peu de mitochondries, qui seront détruites après la fécondation, tandis que l'ovocyte subit une amplification globale du pool mitochondrial pour en faire la cellule la plus riche en mitochondries de l'organisme.

fondatrices), suivie d'une amplification considérable au cours de l'oogenèse, avec une réplication préférentielle possible d'une sous-population de molécules d'ADNmt [5]. Les cellules germinales primordiales prémigratoires, ne contenant qu'un petit nombre de mitochondries fondatrices, pourraient être sélectionnées en fonction de leur activité Oxphos (reposant sur l'intégrité de leur ADNmt [5]), avant de peupler l'organisme. Ce mécanisme pourrait, dans une certaine mesure, éliminer les génomes mitochondriaux anormaux et homogénéiser l'ADNmt, préservant ainsi l'intégrité mitochondriale au fil des générations. La théorie de la *bottleneck* explique comment l'ADNmt, qui est connu pour être plus instable que l'ADN présent dans le noyau cellulaire, peut être « rafraîchi » et « épuré » d'une génération à l'autre [5]. Toutefois, ce goulot d'étranglement génétique est extrêmement complexe, car sa taille varie considérablement en fonction du type de variants d'ADNmt ; en fait, divers modèles de ségrégation ont été observés dans les généalogies humaines transmettant des mutations pathogènes d'ADNmt [6].

Mitochondries et embryon : aspects physiopathologiques

Importance du pool mitochondrial ovocytaire pour le démarrage du développement embryonnaire

L'embryogenèse prend racine dans l'ovogenèse, et, en particulier, le pool mitochondrial ovocytaire est essentiel au démarrage du développement embryonnaire. Ainsi, un contenu faible en ADNmt ovocytaire a été associé à des échecs de fécondation [7] et à des anomalies du développement embryonnaire chez l'homme [8] et dans d'autres espèces [9].

Assurer une production énergétique suffisante

Un élément important est l'apparente constance de l'ADNmt au cours de l'embryogenèse précoce. En dehors d'une très courte période avant le stade deux cellules, mise en évidence chez la souris [10] et le porc [11], l'ADNmt de l'embryon au stade clivé ne se réplique pas. Pendant cette phase, le métabolisme énergétique embryonnaire repose essentiellement sur l'utilisation du pyruvate par le biais de la phosphorylation oxydative. La masse mitochondriale de l'ovocyte doit donc être suffisante pour que la répartition des mitochondries entre les différents blastomères embryonnaires permette le fonctionnement optimal de chaque cellule jusqu'à la reprise effective de la biogenèse mitochondriale. Plusieurs auteurs ont ainsi relié une insuffisance du contenu en ATP avec des échecs de fécondation et des anomalies du développement embryonnaire [12]. Certains ont montré une différence

de contenu en ATP entre les blastomères embryonnaires en lien avec un nombre de mitochondries différent. Ils ont montré qu'une anomalie de répartition des mitochondries au stade 2PN conduisait à une distribution inégale des mitochondries dans les blastomères embryonnaires avec, pour ceux héritant d'un faible contingent mitochondrial, une faible production d'ATP et une incapacité à poursuivre leurs divisions, chez l'homme notamment [13].

Le paradoxe de l'embryon clivé : métabolisme oxydatif et faible activité mitochondriale

Le métabolisme de l'ovocyte et de l'embryon clivé est oxydatif (*figure 3*) ; leurs mitochondries sont pourtant peu différenciées. Celles-ci sont sphériques et mesurent moins de 1 μm ; elles ont peu de crêtes, consomment peu d'oxygène et produisent peu d'ATP [14]. C'est la masse mitochondriale globale qui semble critique pour fournir l'énergie nécessaire à l'embryon. En outre, la capacité des mitochondries à se localiser dans les zones cytoplasmiques à forte demande énergétique serait essentielle à la maturation ovocytaire et au développement de l'embryon [12, 15]. L'organisation spatiale des organites, et en particulier des mitochondries à fort potentiel de membrane ($\Delta\psi$), reflétant leur activité, a été corrélée au potentiel développemental embryonnaire [16]. Cependant, les différentes études montrent une grande variabilité des profils de distribution des mitochondries au cours de l'ovogenèse et de l'embryogenèse, notamment chez la souris, ainsi que de grandes différences entre les espèces [17]. L'équilibre entre besoin et production énergétiques pourrait être lié à l'intrication étroite de l'activité mitochondriale et de la signalisation calcique, le calcium étant un activateur d'Oxphos, par le biais de l'activation des déshydrogénase du cycle de Krebs, de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase. Ainsi, il existe des zones de contact entre le réticulum endoplasmique (RE) et les mitochondries, permettant la transmission des signaux calciques MAM (pour *mitochondria associated membranes*) entre les deux types d'organites [18]. Ce mécanisme est connu pour intervenir lors de la fécondation, où l'activation mitochondriale par le calcium relargué par le RE induit les oscillations calciques nécessaires à l'activation ovocytaire.

Une autre hypothèse permettant d'expliquer la faible consommation d'oxygène serait l'utilisation de la « voie de sauvetage de l'adénosine » qui permet, à partir de l'adénosine monophosphate (AMP) de produire de l'ATP sous l'action respective de l'adénylate kinase puis de la créatine kinase comme cela a été mis en évidence dans l'ovocyte bovin [19].

Limiter le stress oxydant

La maintenance d'une faible activité Oxphos, pouvant être stimulée par une augmentation de la demande en ATP,

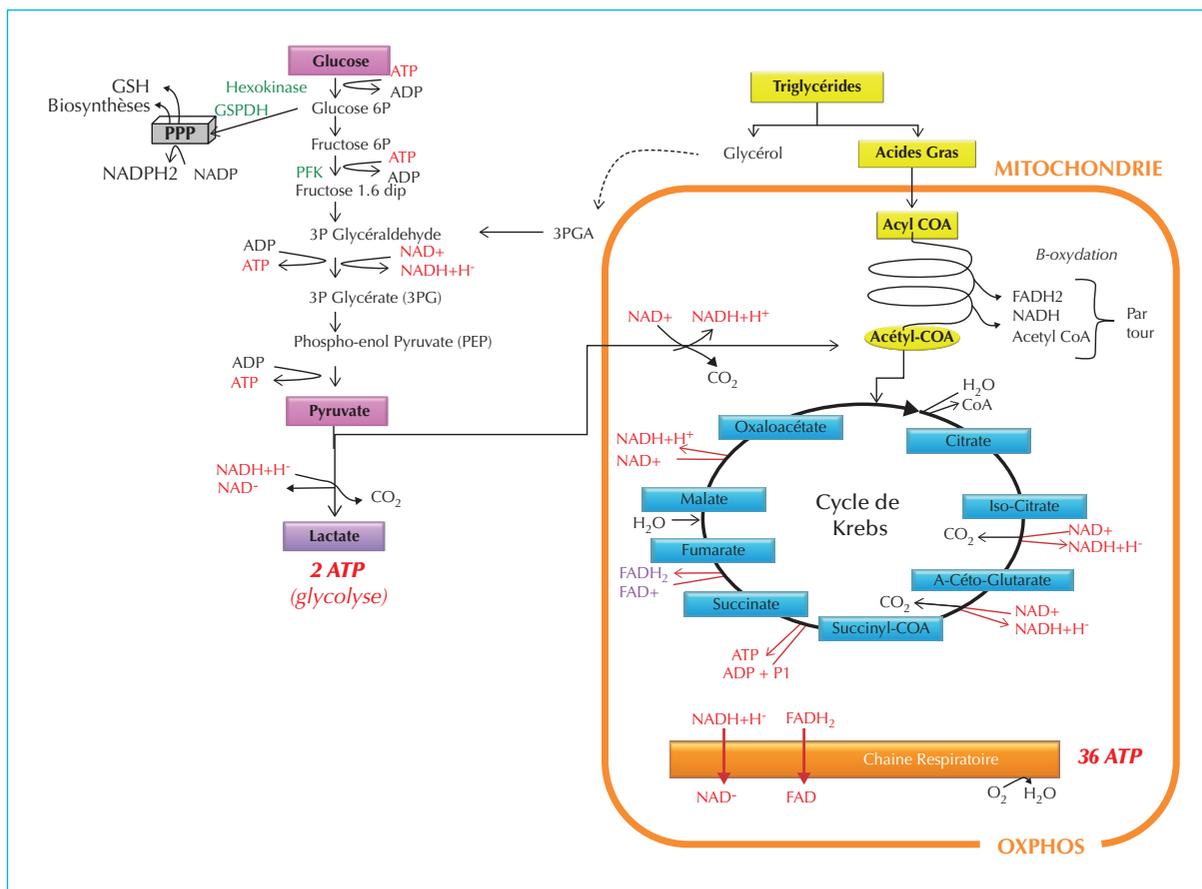


Figure 3. Production énergétique : glycolyse et phosphorylation oxydative.

serait un des moyens de limiter le stress oxydant inhérent à l'activité de la chaîne respiratoire. En effet, plus de 95 % des ROS proviennent du fonctionnement de la chaîne respiratoire. Ces ROS jouent un rôle dans le signalment d'une dysfonction mitochondriale et dans le déclenchement des processus de réparation cellulaire ou de l'apoptose, mais, en dehors d'une plage physiologique, elles sont capables d'entraîner des dommages moléculaires et cellulaires et de déclencher la mort embryonnaire [20]. Un taux de ROS faible est donc important pour éviter les dommages oxydatifs, notamment de l'ADNmt particulièrement exposé par sa proximité avec la chaîne respiratoire, dépourvu d'histones protectrices et de mécanismes efficaces de réparation. Ainsi, un dysfonctionnement mitochondrial induit par un stress oxydant au cours de la maturation ovocytaire a été lié à l'infertilité et à des pertes fœtales précoces [21].

Préserver le statut redox

Le métabolisme mitochondrial confère aussi à la mitochondrie un rôle majeur dans l'équilibre redox embryonnaire. Cet équilibre dépend du ratio de plusieurs couples redox présents dans la cellule. Les trois plus

importants sont le glutathion réduit/oxydé (GSH/GSSG) et les couples nicotinamide adénine dinucléotide (NADH)/NAD⁺ et NAD phosphate (NADPH)/NADP⁺. Or, les mitochondries régulent les ratios NAD(P)H/NAD(P)⁺, produisent des ROS capables de déséquilibrer le statut redox, et des métabolites intermédiaires nécessaires à la régénération des antioxydants embryonnaires.

De modestes changements dans le statut redox de l'embryon, ainsi que la production de taux faibles, ou de manière localisée, de ROS, agissent comme des molécules de signalisation au sein de l'embryon [2]. Une dysfonction mitochondriale ou un fonctionnement trop actif est susceptible d'entraîner une perturbation du statut redox de l'embryon et une dérégulation des voies de signalisation. Plusieurs facteurs de transcription, critiques dans le développement embryonnaire, sont connus pour être régulés par le stress oxydant et l'équilibre redox [22].

Régulation transcriptionnelle et activation du génome embryonnaire

Un lien direct entre l'activité métabolique mitochondriale et la dynamique chromatinienne a été récemment objectivé. En effet, les métabolites intermédiaires du

métabolisme cellulaire sont aussi des cofacteurs de la reprogrammation épigénétique [1, 23] (figure 3). Ainsi l' α -cétooglutarate et le succinate, produits par le cycle de Krebs, régulent l'activité des TET (pour *ten-eleven translocation*), impliquées dans la déméthylation de l'ADN. De la même manière, l'acétylcoenzyme A fournit le groupement acétyle nécessaire à l'acétylation des histones par les histone acétyl-transférases (HAT). Enfin, le NAD⁺ est capable de réguler l'activité des histone désacétylase (HDAC). La période préimplantatoire est une phase où surviennent les changements épigénétiques les plus importants, ce qui la rend particulièrement sensible aux perturbations métaboliques.

Une étude récente a montré que plusieurs enzymes du cycle de Krebs seraient directement impliquées dans le remodelage épigénétique survenant au cours de l'activation du génome embryonnaire (EGA). Ces enzymes seraient capables de se relocaliser partiellement et transitoirement dans le noyau des blastomères, par le biais d'un mécanisme encore non élucidé (vésicules de transport ou protéines chaperonnes ?). Elles seraient actives dans le noyau, où elles permettraient de fournir les cofacteurs nécessaires à la régulation épigénétique. Ainsi, le fait de bloquer ce système est corrélé à la perte des modifications spécifiques des histones et bloque l'EGA chez la souris. Chez l'homme, la pyruvate déshydrogénase a aussi été mise en évidence dans le noyau au moment de l'EGA au stade 4/8-cellules [24].

La courte phase répliquative de l'ADNmt mise en évidence dans certaines espèces animales avant l'EGA [10, 11] pourrait ainsi être cruciale au développement embryonnaire. Elle permettrait de fournir le pool mitochondrial suffisant à la production des métabolites intermédiaires et des enzymes nécessaires à l'EGA.

En conclusion, au stade clivé, l'importance du pool mitochondrial et l'apparente discordance entre la consommation de pyruvate et la production d'ATP pourraient découler du fait que l'activité mitochondriale, à ce stade, n'a pas seulement pour objet la synthèse d'ATP, mais aussi le maintien d'un équilibre redox et la production de métabolites intermédiaires nécessaires aux processus cellulaires et à l'expression génique [25]. Ainsi, pendant cette période, une faible activité mitochondriale serait en faveur d'un *quiet metabolism*, ou plus précisément d'un métabolisme équilibré et parcimonieux [26].

Reprise de la biogenèse mitochondriale : de la morula au blastocyste

La reprise de la biogenèse mitochondriale survient progressivement (figure 4). Elle correspond à la reprise de la réplication de l'ADNmt et à la transformation des mitochondries, qui prennent une forme active (forme allongée et membrane interne repliée en crêtes). Cette phase s'accompagne d'une augmentation importante de la consommation de glucose et d'oxygène [27]. La biogenèse mitochondriale est maximale aux environs de l'implantation, au stade blastocyste, qui marque le début de la différenciation de l'embryon chez les grands mammifères [28] et au stade de l'« œuf cylindrique » chez les rongeurs [29]. Au stade blastocyste, le trophoblaste est le premier à connaître une différenciation mitochondriale [30]. En effet, la demande énergétique est forte, pour assurer le fonctionnement des pompes Na/K-ATPases et la formation du blastocèle, et ces cellules utilisent le glucose principalement par voie oxydative. Les cellules de la masse cellulaire interne, elles, se multiplient, gardent provisoirement leur caractère de pluripotence et préparent l'augmentation de la biomasse embryonnaire lors de l'implantation dans un environnement hypoxique. Ces processus utilisent un métabolisme glycolytique favorable

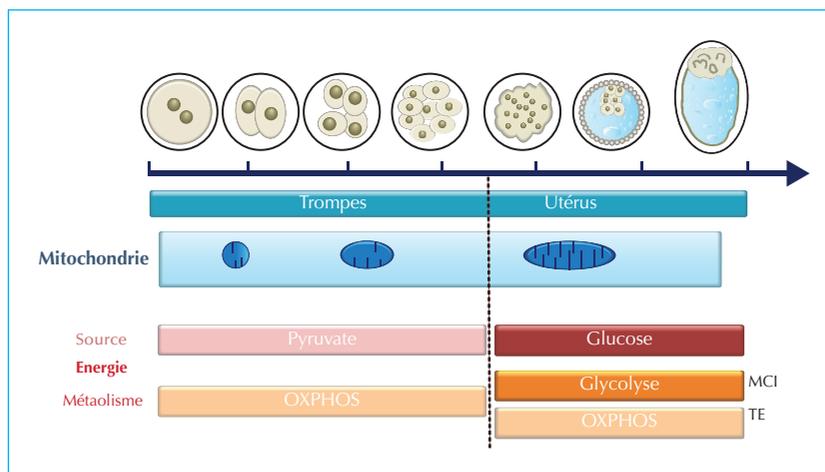


Figure 4. Modifications mitochondriales, source d'énergie et type de métabolisme au cours de l'évolution embryonnaire.

à la production des précurseurs des biosynthèses protéiques (glucose dirigé vers la voie des pentoses-phosphates fournissant le NADPH₂ essentiel aux biosynthèses) et aux divisions cellulaires rapides [31].

Notion de set-point

Le pool mitochondrial ovocytaire se répartit progressivement dans les différents blastomères embryonnaires. Pour une lignée cellulaire donnée, le point le plus bas du contenu en ADNmt constituerait le *set-point*, point à partir duquel reprend la réplication de l'ADNmt et démarre la différenciation cellulaire avec perte de la pluripotence [32]. La reprise de la biogenèse mitochondriale serait donc concomitante des premiers phénomènes de différenciation survenant au stade morula dans le trophoctoderme. Les cellules de la masse cellulaire interne se différencieront plus tardivement et donneront les différentes lignées cellulaires. Parmi celles-ci, les cellules germinales primordiales sont celles qui vont maintenir le taux d'ADNmt le plus bas [32], et ce n'est que lors de la croissance ovocytaire au cours de la folliculogénèse que la biogenèse mitochondriale reprendra et conduira à la constitution du pool mitochondrial de l'ovocyte mature.

Reprise anormale de la biogenèse mitochondriale

Il a été proposé qu'une anomalie embryonnaire ou un pool mitochondrial ovocytaire insuffisant pourrait entraîner un mécanisme compensatoire conduisant à une induction prématurée de la biogenèse mitochondriale [33]. La reprise prématurée de la biogenèse mitochondriale, à un stade où l'embryon présente normalement un métabolisme global faible, pourrait rompre le fragile équilibre entre demande et production énergétique et conduire à une dérégulation des voies de signalisation cellulaires et à des dommages oxydatifs.

Mitochondries et biomarqueurs du développement embryonnaire

La recherche de biomarqueurs du potentiel implantaire embryonnaire constitue le challenge des praticiens de l'Assistance médicale à la procréation pour améliorer les chances de grossesse tout en diminuant les risques de grossesses multiples. La mitochondrie, impliquée dans la qualité ovocytaire et le développement embryonnaire, a, ces dernières années, été l'objet de diverses recherches en ce sens.

Mitochondries des cellules du cumulus

Les interactions au sein du complexe cumulo-ovocytaire orchestrent le métabolisme afin d'assurer le bon équilibre énergétique requis pour la méiose, la fécondation et le soutien de l'embryogenèse précoce.

Les mitochondries des cellules du cumulus (CC), compte tenu de leur rôle central dans les voies métaboliques énergétiques, sont donc directement impliquées dans l'établissement de la compétence des ovocytes au cours de l'ovogénèse [34]. Certains auteurs ont postulé que les mitochondries des CC pourraient être les témoins de la compétence ovocytaire et qu'elles offriraient l'une des meilleures approches non invasives pour évaluer les processus métaboliques sous-jacents à la qualité des ovocytes. Dans une première étude, le contenu en ADNmt ovocytaire a été corrélé positivement au contenu moyen en ADNmt des CC [35]. Ultérieurement, le nombre de copies d'ADNmt des CC s'est révélé prédictif de la qualité des embryons lors de procédures de fécondation *in vitro*, avec des valeurs prédictives positives et négatives de 84,4 et 82,1 %, respectivement [36]. Cette étude a été confirmée sur 202 embryons avec un lien significatif entre la quantité d'ADNmt des CC entourant un ovocyte et la qualité morphocinétique de l'embryon qui en est issu [37]. Enfin, une étude récente, portant sur quatre-vingt-quatre complexes cumulo-ovocytaires, a montré qu'un nombre significativement plus élevé de copies d'ADNmt dans les CC était noté pour les embryons implantés par rapport aux embryons non implantés (moyenne, respectivement, de : 215 (σ : 375) et 59 (σ : 72) ; $p < 10^{-4}$). Une analyse multivariée tenant compte de l'âge des femmes, de la qualité de l'embryon et du niveau d'hormone anti-müllérienne suggérait une relation indépendante entre le contenu en ADNmt des CC et le potentiel d'implantation d'embryons [38]. Des études prospectives sont encore nécessaires à la validation de ces résultats.

ADN mitochondrial libre

La recherche de biomarqueurs s'est aussi portée sur le milieu de culture embryonnaire. Les embryons qui se sont développés jusqu'au stade blastocyste présentent, dans leur milieu de culture, un ratio ADNmt/ADN nucléaire significativement supérieur à ceux ayant cessé de se développer ou ayant évolué plus lentement [39]. Malheureusement, la possibilité que les milieux de culture soient contaminés par de l'ADN exogène ou de l'ADNmt des CC présentes autour de l'embryon rend l'utilisation de ce biomarqueur plutôt délicate [40].

ADN mitochondrial et biopsie de trophoctoderme

Si la quantité d'ADNmt de l'ovocyte est reconnue positivement corrélée à sa compétence, la valeur prédictive de ce taux dans les biopsies embryonnaires est plus discutée. Les premières études montrent, dans l'embryon clivé comme dans l'ovocyte, un contenu d'ADNmt plus important dans les embryons de meilleure qualité [41] ou chez les patientes jeunes que chez les patientes âgées (la qualité ovocytaire étant liée à l'âge

maternel) [42]. Ces résultats ne sont pas confirmés, certains autres auteurs rapportant même une tendance inverse [33, 43]. Ces discordances sont probablement liées à la grande variabilité interembryonnaire et interblastomères du contenu en ADNmt, à un stade donné [41]. Lorsque l'on s'intéresse aux embryons au stade blastocyste, un taux élevé d'ADNmt dans le trophoctoderme semble être plutôt péjoratif quant à la qualité embryonnaire. Ainsi, les blastocystes aneuploïdes ou issus de femmes âgées présentent des taux d'ADNmt supérieurs [42]. La capacité implantatoire de l'embryon euploïde serait, elle aussi, inversement corrélée au contenu en ADNmt des cellules embryonnaires du trophoctoderme. Cela a été montré de manière rétrospective par Fragouli, en 2015, sur 131 blastocystes, par Diez-Juan, en 2015, sur soixante-cinq blastocystes [33] et par Ravichandran, en 2017, sur 1 505 embryons [44], puis confirmé de manière prospective sur 199 embryons par la même équipe [45]. Il a été proposé que la quantité d'ADNmt dans les biopsies de trophoctoderme pourrait témoigner d'un stress embryonnaire hypothéquant leur potentiel implantatoire. Ainsi, un taux élevé d'ADNmt pourrait témoigner d'une activation mitochondriale anormale en raison d'un besoin énergétique potentiellement lié à des anomalies du développement embryonnaire [33]. Un tel mécanisme a déjà été mis en évidence dans les embryons porteurs de mutations pathogènes de l'ADNmt qui contiennent significativement plus d'ADNmt que les contrôles, suggérant un mécanisme réplcatif compensatoire pour maintenir un nombre de molécules saines suffisantes au développement embryonnaire [46].

Cependant, ces résultats suggérant que « moins d'ADNmt est mieux » ont été mis en question par d'autres équipes, qui n'observaient pas de différence entre les blastocystes, quelle que soit leur ploïdie, l'âge de la femme ou leur chance d'implantation [47]. De la même manière, lorsque l'on étudie le taux d'ADNmt du trophoctoderme d'embryons transférés dans le cadre d'un double transfert ayant conduit à une grossesse unique, on ne met pas en évidence de différence entre l'embryon implanté et l'embryon non implanté [48]. Le débat continue [49, 50] et la réponse définitive nécessitera la réalisation d'études de large ampleur prenant en considération, d'une part, les conditions de culture embryonnaire et les techniques de quantification de l'ADNmt, et d'autre part les facteurs confondants capables d'influer sur le contenu en ADNmt cellulaire, comme la consommation de tabac ou l'indice de masse corporelle [37, 51].

Mitochondries comme cibles pour améliorer la fertilité

Améliorer la fonction mitochondriale

Plusieurs études ont été réalisées pour explorer les possibilités d'améliorer les fonctions mitochondriales par

l'utilisation d'agents pharmacologiques capables de protéger du stress oxydant ou d'améliorer la production énergétique (revue en [52]). Chez l'animal, des résultats ont été obtenus avec diverses molécules telles que :

- la coenzyme Q10, un composant alternatif de la chaîne respiratoire mitochondriale possédant des propriétés anti-oxydantes, qui ont permis de réduire l'atrésie folliculaire, d'améliorer l'expression des gènes mitochondriaux dans l'ovocyte et de restaurer l'activité mitochondriale,
- la rapamycine, qui peut augmenter la mitophagie et le renouvellement mitochondrial,
- le resvératrol, un inducteur de la biogenèse et de l'activité des mitochondries.

Alors que la rapamycine est réservée à des indications ciblées en médecine humaine, en tant qu'immunosuppresseur, le resvératrol et la coenzyme Q10 ont prouvé leur innocuité et la coenzyme Q10 a déjà été utilisé pour surmonter l'effet de l'âge sur la fertilité féminine. L'activation de certaines molécules clés, telles que les sirtuines (Sirt3), pourrait être l'une des meilleures méthodes d'amélioration de la biogenèse mitochondriale.

La restriction calorique a aussi été envisagée pour améliorer la fertilité. Les expériences chez le rongeur ont montré qu'une diminution de l'apport calorique de 40 % induisait une réduction considérable de la survenue de dommages mitochondriaux et d'erreurs méiotiques. Chez l'homme, un régime riche en protéines et pauvre en sucres a été associé à une augmentation des taux de blastulation et de grossesse.

L'utilisation d'antioxydants reste très controversée et la méta-analyse de la Cochrane de 2013 ne met pas en évidence de bénéfice quant au taux de grossesses cliniques et de naissances.

Transfert de cytoplasme ou de mitochondries

Contexte

Afin d'éviter la transmission de maladies mitochondriales héréditaires graves, dues à des mutations pathogènes de l'ADNmt, ont été développées les techniques d'« échanges de cytoplasme ». Ces techniques consistent schématiquement à transférer le génome nucléaire de l'ovocyte d'une patiente porteuse d'une mutation pathogène de l'ADNmt dans le cytoplasme ovocytaire d'une donneuse. Cela conduit à l'obtention d'un conceptus portant les deux génomes nucléaires parentaux et le génome mitochondrial d'un tiers donneur, d'où l'appellation de « bébés à trois parents ». Cette technique a été validée en 2015 par le parlement au Royaume-Uni puis entérinée en 2016 par la Human Fertilization and Embryology Authority (HFEA). Un premier enfant conçu avec cette approche est né en septembre 2016 au Mexique. Néanmoins, ces techniques font débat, tant sur le plan éthique que sur celui de leur innocuité. Les principaux facteurs d'inquiétude reposent sur la persis-

tance de faibles taux d'ADNmt de la receveuse pouvant conduire à une hétéroplasmie mitochondriale (coexistence de deux types de génomes mitochondriaux), potentiellement délétère en soi, ou à une réémergence de l'ADNmt porteur du variant pathogène au cours de l'embryogenèse. L'autre risque serait la rupture du dialogue nucléocytoplasmique qui pourrait perturber le fonctionnement cellulaire.

Néanmoins, le développement de ces techniques a ravivé la problématique du transfert de mitochondries dans le traitement de certaines infertilités, notamment celles liées au vieillissement ovarien ou à des arrêts de clivage embryonnaire [53].

Transfert de cytoplasme ou de mitochondries dans le traitement de l'infertilité

L'injection d'une fraction de cytoplasme d'un ovocyte donneur provenant d'une femme jeune dans un ovocyte de femme plus âgée améliore suffisamment la compétence ovocytaire pour permettre un développement embryonnaire normal. Cette méthode a permis, dans les années 2000, d'obtenir des grossesses avec près de cinquante naissances, notamment aux États-Unis [54]. Ces expériences ont cependant été interdites par la Food and Drug Administration (FDA), en 2002, en raison des incertitudes quant à la balance bénéfique/risque.

Il est intéressant de comprendre l'origine de cette restauration de la compétence ovocytaire. Parmi les facteurs cytoplasmiques (ARN, organites, etc.) potentiellement impliqués dans la restauration de cette compétence, les mitochondries pourraient être les éléments déterminants. En effet, le transfert de mitochondries isolées est capable, à lui seul, d'augmenter la capacité de production d'ATP de l'ovocyte, de prévenir l'apoptose ovocytaire et de promouvoir le développement embryonnaire dans différentes espèces, notamment chez l'homme [53]. Ces techniques posent cependant le problème du risque d'hétéroplasmie et d'altération du dialogue nucléocytoplasmique. Afin d'éviter cet écueil, le transfert de mitochondries isolées provenant de cellules somatiques du même individu a été proposé. Néanmoins, les mitochondries d'origine somatique ont des caractéristiques tissu-spécifiques et semblent altérer le développement embryonnaire [55]. Les meilleurs résultats sont obtenus avec des mitochondries de cellules d'origine ovarienne. Le transfert de mitochondries à partir de cellules folliculaires a donné des résultats chez les bovins, et même chez l'homme. Cependant, on sait que l'atrésie des ovocytes est provoquée par des signaux apoptotiques émis par les cellules folliculaires, ce qui suggère que le transfert mitochondrial de ces cellules pourrait comporter un risque majeur de dégénérescence des ovocytes. L'utilisation de mitochondries à partir de cellules somatiques soulève également la question du transfert de mitochondries âgées, c'est-à-dire qu'elles ont le même

âge que l'ovocyte receveur. Une autre source possible serait les cellules germinales autologues. En effet, des ovogonies souches ont été identifiées dans l'ovaire de souris puis, par la même équipe, dans l'ovaire humain. L'existence et l'accessibilité de ces cellules souches restent cependant controversées. L'injection de mitochondries provenant de ces cellules souches isolées pour traiter l'infertilité a été interdite dans certains pays (États-Unis, FDA) mais utilisée dans d'autres (Canada et Espagne notamment) sous l'appellation d'*autologous germline mitochondrial energy transfer* (Augment). Bien que les premiers résultats aient pu paraître encourageants [56], une étude randomisée récente s'est prématurément interrompue en raison de résultats intermédiaires en défaveur de la technique avec des taux de blastulation de 23 % dans le groupe traité contre 41 % dans le groupe contrôle [57]. Est-ce la technique elle-même qui est délétère ou la source mitochondriale ? Chez le porc, l'utilisation d'ovocytes compétents comme source de mitochondries s'est montrée bénéfique sur la restauration de la compétence ovocytaire [11]. Néanmoins, l'utilisation de ces procédures dans l'espèce humaine nécessitera des études approfondies préalables concernant leur innocuité.

Conclusion

Le rôle de la mitochondrie dans la compétence ovocytaire et le développement embryonnaire, longtemps négligé, a récemment fait l'objet d'une littérature dense et parfois contradictoire. La difficulté de cerner exactement le rôle de la mitochondrie dans ces processus vient de ce que, au-delà de la production d'énergie, cet organite se situe au centre du métabolisme, des voies de signalisation cellulaires et de la régulation de l'expression génique. Cette complexité rend compte de la difficulté, dans l'état actuel de nos connaissances, de trouver des marqueurs mitochondriaux indépendants et universellement fiables ou d'envisager la mitochondrie comme une cible thérapeutique. Cela ouvre néanmoins un vaste champ d'exploration prometteur.

Liens d'intérêt : Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Gut P, Verdin E. The nexus of chromatin regulation and intermediary metabolism. *Nature* 2013 ; 502(7472) : 489-98.
2. Shadel GS, Horvath TL. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell* 2015 ; 163(3) : 560-9.
3. Carelli V. Keeping in shape the dogma of mitochondrial DNA maternal inheritance. *PLoS Genet* 2015 ; 11(5) : e1005179.

4. Otten AB, Smeets HJ. Evolutionary defined role of the mitochondrial DNA in fertility, disease and ageing. *Hum Reprod Update* 2015 ; 21(5) : 671-89.
5. Stewart JB, Chinnery PF. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nat Rev Genet* 2015 ; 16(9) : 530-42.
6. Steffann J, Monnot S, Bonnefont JP. mtDNA mutations variously impact mtDNA maintenance throughout the human embryo fetal development. *Clin Genet* 2015 ; 88(5) : 416-24.
7. Santos TA, El Shourbagy S, St John JC. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. *Fertil Steril* 2006 ; 85(3) : 584-91.
8. Murakoshi Y, Sueoka K, Takahashi K, et al. Embryo developmental capability and pregnancy outcome are related to the mitochondrial DNA copy number and ooplasmic volume. *J Assist Reprod Genet* 2013 ; 30(10) : 1367-75.
9. El Shourbagy SH, Spikings EC, Freitas M, St John JC. Mitochondria directly influence fertilisation outcome in the pig. *Reproduction* 2006 ; 131(2) : 233-45.
10. McConnell JM, Petrie L. Mitochondrial DNA turnover occurs during preimplantation development and can be modulated by environmental factors. *Reprod Biomed Online* 2004 ; 9(4) : 418-24.
11. Cagnone GL, Tsai TS, Makanji Y, et al. Restoration of normal embryogenesis by mitochondrial supplementation in pig oocytes exhibiting mitochondrial DNA deficiency. *Sci Rep* 2016 ; 6 : 23229.
12. Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, Mota PC, Sousa AP, Amaral A. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update* 2009 ; 15(5) : 553-72.
13. Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Hum Reprod* 2000 ; 15(12) : 2621-33.
14. Motta PM, Nottola SA, Makabe S, Heyn R. Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Hum Reprod* 2000 ; 15(Suppl 2) : 129-47.
15. Van Blerkom J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion* 2011 ; 11(5) : 797-813.
16. Van Blerkom J. Mitochondria in early mammalian development. *Semin Cell Dev Biol* 2009 ; 20(3) : 354-64.
17. Dumollard R, Ward Z, Carroll J, Duchon MR. Regulation of redox metabolism in the mouse oocyte and embryo. *Development* 2007 ; 134(3) : 455-65.
18. Patergnani S, Suski JM, Agnoletto C, et al. Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). *Cell Commun Signal* 2011 ; 9 : 19.
19. Scantland S, Tessaro I, Macabelli CH, et al. The adenosine salvage pathway as an alternative to mitochondrial production of ATP in maturing mammalian oocytes. *Biol Reprod* 2014 ; 91(3) : 75.
20. Bain NT, Madan P, Betts DH. The early embryo response to intracellular reactive oxygen species is developmentally regulated. *Reprod Fertil Dev* 2011 ; 23(4) : 561-75.
21. Grindler NM, Moley KH. Maternal obesity, infertility and mitochondrial dysfunction: potential mechanisms emerging from mouse model systems. *Mol Hum Reprod* 2013 ; 19(8) : 486-94.
22. Ufer C, Wang CC, Borchert A, Heydeck D, Kuhn H. Redox control in mammalian embryo development. *Antioxid Redox Signal* 2010 ; 13(6) : 833-75.
23. Lees JG, Gardner DK, Harvey AJ. Pluripotent stem cell metabolism and mitochondria: beyond ATP. *Stem Cells Int* 2017 ; 2017 : 2874283.
24. Nagaraj R, Sharpley MS, Chi F, et al. Nuclear localization of mitochondrial TCA cycle enzymes as a critical step in mammalian zygotic genome activation. *Cell* 2017 ; 168(1-2) : 210-223 e11.
25. Guantes R, Diaz-Colunga J, Iborra FJ. Mitochondria and the non-genetic origins of cell-to-cell variability: more is different. *Bioessays* 2016 ; 38(1) : 64-76.
26. Leese HJ, Guerif F, Allgar V, Brisson DR, Lundin K, Sturmey RG. Biological optimization, the Goldilocks principle, and how much is lagom in the preimplantation embryo. *Mol Reprod Dev* 2016 ; 83(9) : 748-54.
27. Houghton FD, Leese HJ. Metabolism and developmental competence of the preimplantation embryo. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004 ; 115(Suppl 1) : S92-6.
28. St John J. The control of mtDNA replication during differentiation and development. *Biochim Biophys Acta* 2013 ; 1840(4) : 1345-54.
29. Piko L, Taylor KD. Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. *Dev Biol* 1987 ; 123(2) : 364-74.
30. Houghton FD. Energy metabolism of the inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. *Differentiation* 2006 ; 74(1) : 11-8.
31. Kaneko KJ. Metabolism of preimplantation embryo development: a bystander or an active participant? *Curr Top Dev Biol* 2016 ; 120 : 259-310.
32. Sun X, St John JC. The role of the mtDNA set point in differentiation, development and tumorigenesis. *Biochem J* 2016 ; 473(19) : 2955-71.
33. Diez-Juan A, Rubio C, Marin C, et al. Mitochondrial DNA content as a viability score in human euploid embryos: less is better. *Fertil Steril* 2015 ; 104(3) : 534-541 e1.
34. Dumesic DA, Meldrum DR, Katz-Jaffe MG, Krisher RL, Schoolcraft WB. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril* 2015 ; 103(2) : 303-16.
35. Bouclet L, Chao de la Barca JM, Morinière C, et al. Relationship between diminished ovarian reserve and mitochondrial biogenesis in cumulus cells. *Hum Reprod* 2015 ; 30(7) : 1653-64.
36. Ogino M, Tsubamoto H, Sakata K, et al. Mitochondrial DNA copy number in cumulus cells is a strong predictor of obtaining good-quality embryos after IVF. *J Assist Reprod Genet* 2016 ; 33(3) : 367-71.
37. Desquiret-Dumas V, Clément A, Seegers V, et al. The mitochondrial DNA content of cumulus granulosa cells is linked to embryo quality. *Hum Reprod* 2017 ; 32(3) : 607-14.
38. Taugourdeau A, Desquiret-Dumas V, Hamel JF, et al. The mitochondrial DNA content of cumulus cells may help

predict embryo implantation. *J Assist Reprod Genet* 2019 ; 36(2) : 223-8.

39. Stigliani S, Persico L, Lagazio C, Anserini P, Venturini PL, Scaruffi P. Mitochondrial DNA in Day 3 embryo culture medium is a novel, non-invasive biomarker of blastocyst potential and implantation outcome. *Mol Hum Reprod* 2014 ; 20(12) : 1238-46.

40. Hammond ER, McGillivray BC, Wicker SM, et al. Characterizing nuclear and mitochondrial DNA in spent embryo culture media: genetic contamination identified. *Fertil Steril* 2017 ; 107(1) : 220-228 e5.

41. Lin DP, Huang CC, Wu HM, et al. Comparison of mitochondrial DNA contents in human embryos with good or poor morphology at the 8-cell stage. *Fertil Steril* 2004 ; 81(1) : 73-9.

42. Fragouli E, Spath K, Alfarawati S, et al. Altered levels of mitochondrial DNA are associated with female age, aneuploidy and provide an independent measure of embryonic implantation potential. *PLoS Genet* 2015 ; 11(6) : e1005241.

43. Konstantinidis M, Alfarawati S, Hurd D, et al. Simultaneous assessment of aneuploidy, polymorphisms and mitochondrial DNA content in human polar bodies and embryos with the use of a novel microarray platform. *Fertil Steril* 2014 ; 102(5) : 1385-92.

44. Ravichandran K, McCaffrey C, Grifo J, et al. Mitochondrial DNA quantification as a tool for embryo viability assessment: retrospective analysis of data from single euploid blastocyst transfers. *Hum Reprod* 2017 ; 32(6) : 1282-92.

45. Fragouli E, McCaffrey C, Ravichandran K, et al. Clinical implications of mitochondrial DNA quantification on pregnancy outcomes: a blinded prospective non-selection study. *Hum Reprod* 2017 ; 32(11) : 2340-7.

46. Monnot S, Samuels DC, Hesters L, et al. Mutation dependence of the mitochondrial DNA copy number in the first stages of human embryogenesis. *Hum Mol Genet* 2013 ; 22(9) : 1867-72.

47. Victor AR, Brake AJ, Tyndall JC, et al. Accurate quantitation of mitochondrial DNA reveals uniform levels in human blastocysts irrespective of ploidy, age, or implantation potential. *Fertil Steril* 2017 ; 107(1) : 34-42 e3.

48. Treff NR, Zhan Y, Tao X, et al. Levels of trophectoderm mitochondrial DNA do not predict the reproductive potential of sibling embryos. *Hum Reprod* 2017 ; 32(4) : 954-62.

49. Ho JR, Arrach N, Rhodes-Long K, et al. Blastulation timing is associated with differential mitochondrial content in euploid embryos. *J Assist Reprod Genet* 2018 ; 35(4) : 711-20.

50. Klimczak AM, Pacheco LE, Lewis KE, et al. Embryonal mitochondrial DNA: relationship to embryo quality and transfer outcomes. *J Assist Reprod Genet* 2018 ; 35(5) : 871-7.

51. de Los Santos MJ, Diez Juan A, Misfud A, et al. Variables associated with mitochondrial copy number in human blastocysts: what can we learn from trophectoderm biopsies? *Fertil Steril* 2018 ; 109(1) : 110-7.

52. Cecchino GN, Seli E, Alves da Motta EL, Garcia Velasco JA. The role of mitochondrial activity in female fertility and assisted reproductive technologies: overview and current insights. *Reprod Biomed Online* 2018 ; 36(6) : 686-97.

53. Zhang J, Zhuang G, Zeng Y, et al. Pregnancy derived from human zygote pronuclear transfer in a patient who had arrested embryos after IVF. *Reprod Biomed Online* 2016 ; 33(4) : 529-33.

54. Cohen J, Scott R, Schimmel T, Levron J, Willadsen S. Birth of infant after transfer of anucleate donor oocyte cytoplasm into recipient eggs. *Lancet* 1997 ; 350(9072) : 186-7.

55. Takeda K, Tasai M, Iwamoto M, et al. Microinjection of cytoplasm or mitochondria derived from somatic cells affects parthenogenetic development of murine oocytes. *Biol Reprod* 2005 ; 72(6) : 1397-404.

56. Oktay K, Baltaci V, Sonmezer M, et al. Oogonial precursor cell-derived autologous mitochondria injection to improve outcomes in women with multiple IVF failures due to low oocyte quality: a clinical translation. *Reprod Sci* 2015 ; 22(12) : 1612-7.

57. Labarta E, de los Santos MJ, Herraiz S, et al. Autologous mitochondrial transfer as a complementary technique to intracytoplasmic sperm injection to improve embryo quality in patients undergoing in vitro fertilization-a randomized pilot study. *Fertil Steril* 2018 ; 111(1) : 86-96.