

Micro-ARN et folliculogénèse : nouvelles perspectives pour décrypter le dialogue au sein du compartiment cellulaire du follicule ovarien

Circulating MicroRNAs and folliculogenesis: New approach for understanding dialog between follicular cells

Elodie Scalici¹
Sophie Brouillet^{2,3,4}
Samir Hamamah^{4,5}

¹ Centre AMP Avignon, laboratoire Bioaxiome, Avignon, France

² Université Grenoble-Alpes, Inserm 1036, Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA), Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble (BIG), Laboratoire biologie du cancer et de l'infection (BCI), Grenoble, France

³ Centre hospitalier universitaire de Grenoble, hôpital Couple-Enfant, centre clinique et biologique d'assistance médicale à la procréation, Centre d'étude et de conservation des œufs et du sperme humains (Cecos), La Tronche, France

⁴ Inserm U1203, Équipe Développement embryonnaire précoce humain et pluripotente, Institut de médecine régénératrice et de biothérapie, Hôpital Saint-Eloi, Montpellier 34295, France

⁵ CHU Montpellier, ART/PGD Division, Hôpital Arnaud de Villeneuve, Montpellier, France
<s-hamamah@chu-montpellier.fr>

Résumé. Le bon déroulement de la folliculogénèse est fondamental pour l'obtention d'un ovocyte capable de générer un embryon ayant un bon potentiel implantatoire. Lors de ce développement folliculaire, l'ovocyte entretient des relations privilégiées avec les cellules du cumulus qui l'entourent et avec lesquelles il forme un complexe cumulo-ovocytaire. Un dialogue s'établit ainsi au sein du follicule, grâce à des jonctions communicantes et des signaux paracrines permettant à l'ovocyte de contrôler certaines fonctions des cellules du cumulus afin d'assurer sa propre survie. Cette interaction se traduit par l'expression de gènes clés, lesquels sont eux-mêmes régulés par de courts fragments d'ARN, d'environ 19-25 nucléotides, appelés microARN. L'identification de ces microARN impliqués dans le dialogue intrafolliculaire devrait aboutir à l'obtention de tests non invasifs permettant d'évaluer la qualité ovocytaire.

Mots clés : microARN, réserve ovarienne, folliculogénèse, assistance médicale à la procréation

Abstract. The good progress of the folliculogenesis is fundamental for obtaining an oocyte capable of generating an embryo having a good implanting potential. During this follicular development, the oocyte has a special relationship with the cumulus cells surrounding it and with which it forms a cumulo-oocyte complex. A dialogue is thus established inside the follicle, thanks to communicating junctions and paracrine signals allowing the oocyte to control certain functions of the cumulus cells in order to ensure its own survival. This interaction is expressed by the expression of key genes, which are themselves regulated by short RNA fragments, about 19-25 nucleotides, called microRNAs. The identification of microRNAs involved in the intrafollicular dialogue should lead to obtaining non-invasive tests to assess the oocyte quality.

Key words: microRNAs, follicular pool, folliculogenesis, ART

La réserve ovarienne (RO) des patientes prises en charge en assistance médicale à la procréation (AMP) est classiquement évaluée au troisième jour du cycle menstruel, par des dosages sériques hormonaux – en particuliers celui de l'hormone antimüllérienne (AMH) –, ainsi que par le compte folliculaire antral (CFA), déterminé à l'aide d'une sonde échographique. Il a cependant été démontré que, si l'AMH est un excellent biomarqueur quantitatif de la RO, il est un mauvais marqueur qualitatif. Aussi cette évaluation demeure-t-elle, dans certains cas, non

informative, du fait de résultats discordants entre l'AMH et le CFA, ne permettant pas une détection efficace et fiable des anomalies potentielles de la (RO) [1-6].

Le bon déroulement de la folliculogénèse est fondamental pour l'obtention d'un ovocyte compétent, pouvant donner lieu, une fois fécondé, à un embryon ayant un bon potentiel de conduire à la grossesse. Lors de ce développement folliculaire, l'ovocyte est en contact très étroit avec les cellules du cumulus (CC) qui l'entourent et avec lesquelles il forme un complexe

Médecine
de la **Reproduction**

Tirés à part : S. Hamamah

cumulo-ovocytaire. Il s'établit dès lors un dialogue permanent au sein de ce complexe, par l'intermédiaire des jonctions communicantes et des signaux paracrines, dialogue au cours duquel l'ovocyte contrôle certaines fonctions des CC qu'il ne peut accomplir lui-même et qui sont nécessaires à sa propre survie. Ces régulations réciproques sont contrôlées par certains gènes-clés. Or, il a été démontré récemment que ces gènes sont eux-mêmes régulés par de courts fragments d'ARN d'environ vingt-deux nucléotides, appelés microARN. Ainsi, l'identification des microARN régulant ces gènes, et leur quantification durant les différents stades de la folliculogénèse, pourraient aboutir au développement de tests non invasifs permettant d'apprécier la qualité de l'ovocyte et sa capacité à donner un embryon compétent à fort potentiel implantatoire.

Au cours de ces dernières années, l'utilisation des acides nucléiques circulants comme outils diagnostiques et/ou pronostiques en cancérologie a largement été documentée. Un organisme adulte est constitué de nombreux types cellulaires différenciés, regroupés en organes qui remplissent des fonctions physiologiques complexes. Chaque individu résulte d'un ovocyte fécondé, le zygote. Cette cellule, par divisions et différenciations successives, donne lieu, à la fin du développement embryonnaire et fœtal, à un organisme doté de toutes les fonctions nécessaires à la vie. Cette évolution progressive, de la conception à la naissance, met en jeu de nombreux mécanismes aux niveaux génétique, moléculaire et cellulaire, qui assurent le développement harmonieux d'un organisme. Dès les stades précoces de la folliculogénèse, une étroite collaboration se met en place entre l'ovocyte et les cellules périovocytaires (granulosa), qui forment le support du follicule. En effet, un gène qui s'exprime est transcrit en ARNm dans le noyau, lequel est ensuite traduit en protéine une fois dans le cytoplasme. Or, il a été observé que, dans certains types cellulaires, un gène pouvait être transcrit en ARNm, mais sans traduction en protéine correspondante. De là est venue la découverte d'une nouvelle classe de petits ARN non codants qui régulent l'expression génique au niveau post-transcriptionnel. Plusieurs études ont montré l'implication des microARN dans la régulation de l'expression de nombreux gènes chez l'humain. Le nombre de gènes cibles modulés par chaque microARN est d'environ une centaine, mais ce nombre est beaucoup plus restreint au sein d'un type cellulaire donné. Ces gènes cibles sont impliqués dans de nombreuses fonctions, et les dysfonctionnements des microARN impliqués dans leur régulation sont en cause dans le développement de maladies cardiovasculaires, de cancers, de dérèglements du métabolisme ou encore de cas d'infertilité [7]. Il a récemment été montré que certains microARN jouent un rôle majeur dans le dialogue cumulo-ovocytaire et dans la folliculogénèse.

Les microARN

Les microARN appartiennent à la famille des « petits ARN » et correspondent à de petites séquences d'ARN simple brin non codantes, de dix-neuf à vingt-cinq nucléotides, issues de régions génomiques inter- ou intragéniques [8]. Ils ont été conservés au cours de l'évolution, des invertébrés aux vertébrés [9]. Identifiés pour la première fois chez le nématode *Caenorhabditis elegans* par Lee *et al.* au début des années 1990 [10], ces microARN ne codent pas des protéines mais régulent l'expression des gènes [11]. Ce type de régulations post-transcriptionnelles qui consiste à inhiber l'expression de certains gènes en interférant avec l'ARN messager (ARNm) correspondant est appelée l'« interférence ARN ». La découverte de ce mécanisme chez *C. elegans* a valu le prix Nobel de physiologie et de médecine, en 2006, à deux biologistes américains Andrew Fire et Craig Mello (*RNA interference – gene silencing by double-stranded RNA*) [12]. Chez les mammifères, les microARN sont habituellement complémentaires d'une petite séquence dans la région 3' non traduite (UTR) de leurs ARNm cibles. Cette régulation post-transcriptionnelle conduit à la dégradation des ARNm cibles ou à l'inhibition de leur traduction protéique [8, 11, 13].

Les microARN sont issus de pré-microARN, transcrits primaires repliés sur eux-mêmes selon une structure dite de « tige-boucle ». Ces pré-microARN sont synthétisés, via la voie classique de transcription, par l'ARN polymérase II (ARN pol II) [14], puis clivés par un complexe protéique composé de Drosha (ARNases ou ribonucléases III de classe 2) et de la *DiGeorge critical region 8* (DGCR8), pour donner un pré-microARN long d'environ soixante-dix nucléotides [15]. Celui-ci est ensuite transporté, par l'exportine 5, du noyau vers le cytoplasme [16], dans lequel il sera clivé par une enzyme de la famille Dicer (ARNases ou ribonucléases III de classe 3), permettant ainsi l'hydrolyse de la structure boucle terminale. Ce clivage aboutit alors à la libération d'un microARN double brin de vingt-deux nucléotides environ (miARNdb) [17], qui interagira par la suite avec une protéine de la famille Argonaute (AGO1 ou AGO2) pour former le complexe *miRNA-induced silencing complex* (miRISC) [13]. Seul le brin spécifique de l'ARNm cible du microARN sera incorporé au sein du complexe miRISC, permettant ainsi l'interaction microARN-ARNm. Enfin, deux voies d'inhibition (*silencing*) des ARNm cibles ont été décrites :

- la première par dégradation de l'ARNm, dans le cas où le complexe miRISC contiendrait AGO2,
- la seconde par répression de la traduction protéique en présence d'AGO1 dans le complexe miRISC (Hutvagner and Simard, 2008).

Les microARN sont programmés pour réduire au silence plus de la moitié des gènes chez les mammifères

[18]. En se basant sur une étude de complémentarité des séquences, un seul microARN pourrait réguler au moins 200 gènes cibles, ayant de multiples fonctions (incluant des facteurs de transcription, des récepteurs et des transporteurs). Dans l'espèce humaine, les microARN contrôlent l'expression d'environ un tiers des ARNm [19]. Certains microARN sont spécifiques d'un tissu, quand d'autres sont exprimés dans plusieurs ([7]; Barad *et al.*, 2004). Localisés à l'intérieur des cellules, ils jouent un rôle crucial dans la régulation de nombreux processus biologiques. L'expression des microARN est en outre elle-même régulée, conduisant à des variations spécifiques et dynamiques de l'expression des différents ARNm cibles, par exemple lors du développement embryonnaire précoce [20, 21].

Expressions et fonctions des microARN dans le compartiment cellulaire du follicule ovarien

La plupart des microARN sont intracellulaires et sont impliqués dans la régulation de plusieurs processus biologiques, notamment au sein du follicule ovarien (Zhao and Rajkovic, 2008; [22, 23]; [24, 25]). Ainsi, dans l'espèce humaine, ils ont été identifiés à la fois dans l'ovocyte [26-29], dans les cellules du cumulus [27, 30, 31] et dans les cellules de la granulosa [32-41]. Ces microARN sont donc impliqués dans la régulation de différentes fonctions telles que la prolifération et l'apoptose des cellules folliculaires [31, 33, 35-37, 39-41], la production d'hormones stéroïdiennes [27, 30, 32, 36, 38] ou encore la maturation ovocytaire [26, 28]. Le *tableau 1* recense l'ensemble des microARN ayant un rôle au niveau de l'ovocyte ou dans les cellules folliculaires dans l'espèce humaine, et pour lesquels des gènes cibles potentiels ont été identifiés.

Particularités de microARN

Un certain nombre de microARN, localisés dans le compartiment intracellulaire, sont également sécrétés dans le milieu extracellulaire et sont donc détectés dans les fluides biologiques (*figure 1*). Ces microARN extracellulaires (ou circulants) sont contenus dans des vésicules lors de leur transport intercellulaire, ce qui leur confère une certaine stabilité, puisque ce confinement les protège des ribonucléases (ARNases). Les microARN sont donc sélectivement et spécifiquement sécrétés par les cellules et entourés du transporteur approprié, pour atteindre leurs cibles spécifiques au niveau des cellules réceptrices. En effet, dans ces cellules réceptrices, ils vont reconnaître et réprimer les ARNm qu'ils régulent [42]. Ce transport

intercellulaire peut être effectué par différents types de transporteur, tels que des vésicules dérivées des membranes cellulaires (exosomes et microparticules), des lipoprotéines de haute (HDL) ou de faible densité (LDL) ou des complexes ribonucléoprotéiques [43] (*figure 1*). Ceci explique que les microARN circulants représentent à l'heure actuelle des biomarqueurs d'intérêt dans l'exploration moléculaire du couple infertile.

MicroARN et faible réserve ovarienne

Une faible réserve ovarienne peut s'expliquer par une atrésie folliculaire physiologique, liée au « vieillissement ovarien », ou pathologique, dans le cadre d'une insuffisance ovarienne prématurée (IOP). Cette atrésie folliculaire est sous-tendue par la mise en place de processus apoptotiques dans les cellules de la granulosa [35, 44]. L'IOP est, dans plus de 80 % des cas, idiopathique, mais peut aussi être d'origine auto-immune, iatrogène, virale ou encore génétique [45].

Des différences d'expression sérique des microARN ont également été identifiées chez des patientes souffrant d'IOP, et notamment une diminution significative de l'expression de miR-22-3p [46] et une forte augmentation de l'expression de miR-23a [35] (*tableau 2*). Ces deux microARN jouent un rôle dans la régulation des processus apoptotiques ; miR-23a serait notamment capable de réguler l'apoptose, en diminuant l'expression de XIAP (pour *X-linked inhibitor of apoptosis protein*) dans les cellules de granulosa humaines. Il a en outre été rapporté que la sous-expression de miR-146a dans les cellules de la granulosa humaines conduit à une inhibition de l'apoptose de ces cellules, grâce à une interaction simultanée sur les gènes *IRAK-1* et *TRAF-6*. De manière intéressante, une augmentation de l'expression de ce microARN a été observée à la fois dans le plasma et dans les cellules de la granulosa de patientes ayant une IOP [40]. Un autre mécanisme intracellulaire conduisant à l'inhibition du miR-139-5p, via la désacétylation d'histone, a été décrit par Zhao *et al.* comme étant en lien avec le développement d'IOP (Zhao *et al.*, 2014).

MicroARN et dialogue cumulo-ovocytaire

Les microARN peuvent avoir un rôle crucial dans la régulation de nombreuses fonctions des cellules folliculaires telles que la stéroïdogenèse, l'apoptose, la lutéinisation ou l'ovulation. Des travaux sur des cellules de la granulosa murale de souris ont mis en évidence soixante-dix-sept ARNm ciblés par deux microARN spécifiques : miR-132 et miR-212 [47]. Ces deux microARN sont

Tableau 1. MicroARN identifiés dans l'ovocyte, les cellules du cumulus et les cellules de la granulosa, leurs fonctions et leurs gènes cibles dans l'espèce humaine ([63], modifié).

microARN	Expression	Régulation	Gènes cibles	Fonctions	Références
let-7a miR-16 miR-21 miR-31 miR-101 miR-145 miR-182 miR-192 miR-194 miR-210 miR-212	Ovocyte	–	<i>PARP1</i> <i>BRCA1</i> <i>RAD50</i> <i>RB1</i>	Réparation cassure double brin Cycle cellulaire (point de contrôle)	[29]
miR-133b	Ovocyte	IGF-1	<i>TAGLN2</i>	Croissance et maturation ovocytaire	[28]
miR-184 miR-10a miR-100	Ovocyte	–	<i>NCOR2</i> <i>HOXA1</i> <i>SMARCA5</i>	Répression de la transcription de récepteurs nucléaires Régulation de gènes spécifiques à l'ovocyte Reprogrammation ovocytaire	[27]
miR-15a miR-20a	Ovocyte	FSH	<i>BCL2</i> <i>CDC25A</i>	Maturation ovocytaire	[26]
miR-483-5p	Cellules du cumulus	–	<i>Notch3</i> <i>MAPK3</i>	Régulation hormonale et métabolisme énergétique Prolifération cellulaire	[30]
miR-483-5p miR-486-5p	Cellules du cumulus	–	<i>IGF2</i> <i>SOCS3</i> <i>SFR</i> <i>PTEN</i> <i>FOXO1</i>	Insulinorésistance Prolifération cellulaire	[31]
32 miRs (dont miR-23)	Cellules du cumulus	–	<i>BCL2</i> <i>CYP19A1</i>	Apoptose Stéroïdogénèse	[27]
miR-23a miR-27a	Cellules de la granulosa	–	<i>SMAD5</i>	Apoptose	[41]
miR-146a	Cellules de la granulosa	–	<i>IRAK1</i> <i>TRAF6</i>	Apoptose	[40]
miR-93	Cellules de la granulosa	Insuline	<i>CDKN1A</i>	Prolifération cellulaire	[39]a
39 miRs	Cellules de la granulosa	–	<i>NF-kB (p65)</i>	Prolifération Sécrétion progestérone-lutéinisation	[38]
miR-513a-3p	Cellules de la granulosa	–	<i>LHCGR</i>	Prolifération et développement folliculaire	[37]
miR-15a	Cellules de la granulosa	–	<i>MAPK/ERK1,2</i> <i>PCNA</i> <i>Caspase 3</i> <i>progestérone</i> <i>testostérone</i> <i>œstradiol</i>	Prolifération cellulaire Apoptose Stéroïdogénèse	[36]
miR-23a	Cellules de la granulosa	–	<i>XIAP</i> <i>Caspase-3</i>	Rôle proapoptotique	[35]
miR-21	Lignées de cellules de la granulosa humaines	–	<i>COL4A1</i>	Rôle dans la membrane basale autour des cellules de la granulosa (<i>structure extracellulaire</i>)	[34]
Pré-miR-10a miR-105 miR-182 miR-15a	Cellules de la granulosa	–	<i>Cycline B1</i> <i>TdT</i> <i>Caspase-3</i> <i>PCNA</i>	Apoptose et prolifération cellulaire	[33]

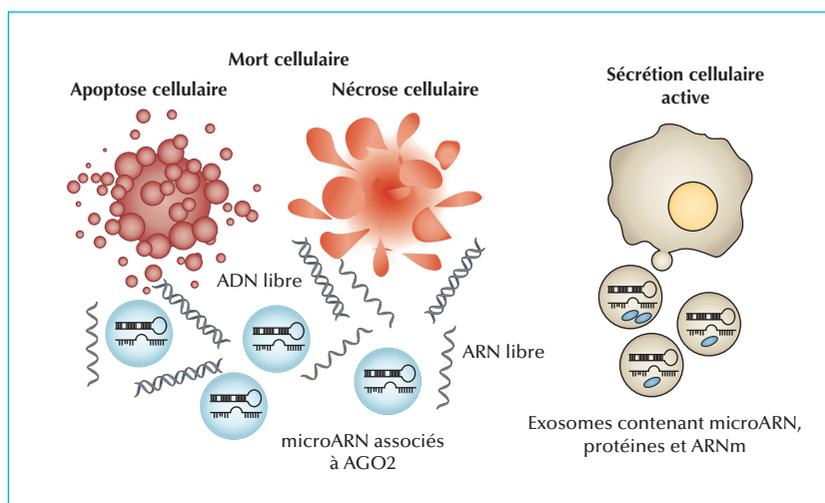


Figure 1. Mécanismes de relargage des acides nucléiques (ADN libre et microARN) vers le compartiment extracellulaire ([59], modifié).

Tableau 2. Profil d'expressions des microARN circulants chez les patientes présentant un SOMPK ou une IOP ([64], modifié).

Fluides biologiques	Sérum		Liquide folliculaire		Références
	↗	↘	↗	↘	
Syndrome des ovaires micropolykystiques	miR-21	–	–	–	[39]b
	miR-222, miR-146 et miR-30c	–	–	–	[60]
	let-7i-3pm, miR-5706, miR-4463, miR-3665 et miR-638	–	–	–	[61]
	miR-124-3p, miR-128, miR-29a-3p et let-7c	–	–	–	[56]
	–	–	miR-132 et miR-320a	–	[62]
	–	–	miR-32, miR-34c, miR-135a, miR-18b et miR-9	–	[62]
Insuffisance ovarienne prématurée	miR-146a	–	–	–	[40]
	–	miR-22-3p	–	–	[46]
	mir-202, mir-146a, mir-125b-2, mir-139-3p, mir-654-5p, mir-27a, mir-765, mir-23a, mir-342-3p et mir-126	let-7c et mir-144	–	–	[35]

surexprimés en présence d'hormone chorionique gonadotrope (hCG) [48]. L'étude sur le miR-93 a montré qu'il ciblerait l'ARNm codant la protéine Lhx8 [49]. Cette protéine Lim homéodomaine est indispensable pour la transition du stade primordial au stade primaire de la

folliculogénèse [50]. Une surexpression du miR-93 pourrait perturber le bon déroulement de la croissance ovarienne. La présence de microARN dans le liquide folliculaire (LF) de plusieurs espèces de mammifères a été rapportée [51-55]. De la même manière, Sang *et al.*

identifient pour la première fois des microARN extracellulaires dans le LF humain, et observent également des variations d'expression de certains de ces microARN chez les patientes ayant un syndrome des ovaires micropolykystiques [56]. Une autre étude s'est intéressée plus précisément aux microARN contenus dans les exosomes, et a démontré qu'ils sont fortement représentés dans le LF humain, et probablement impliqués dans la maturation folliculaire [43]. Cette étude suggère donc que ce transfert de microARN entourés d'exosomes pourrait contribuer à la communication intercellulaire au sein du follicule ovarien. Ainsi, certains microARN intracellulaires sont présents dans le LF, où leur niveau d'expression peut ainsi être évalué. Des variations des profils d'expression intrafolliculaires de certains microARN, en fonction de la maturité ovocytaire [57] et de la qualité embryonnaire [58], ont en outre été récemment décrits.

Conclusion

L'implication des microARN dans la biologie et la médecine de la reproduction fait, à l'heure actuelle, l'objet de recherches intenses. Au cours de ces dernières années, des progrès énormes ont été réalisés dans l'étude des petits fragments d'ARN non codants, dont les microARN ne représentent vraisemblablement que la partie émergée de l'iceberg. Quelques centaines de microARN ont été déjà identifiés. Cependant, un certain nombre de questions concernant leurs modes d'action n'ont toujours pas été élucidées. De plus, la régulation directe ou indirecte des gènes cibles rend plus compliquée l'identification du rôle exact de chaque microARN. Les études sur l'expression et l'implication des microARN dans la régulation de la folliculogénèse offrent de nouvelles perspectives dans la compréhension du mécanisme régulant le dialogue entre les cellules de la granulosa et l'ovocyte au sein du follicule ovarien, et ouvrent la voie à l'identification de marqueurs fiables prédisant la qualité ovocytaire et embryonnaire, et donc la survenue d'une grossesse. Ces études ont des applications directes dans le contrôle de la fertilité humaine.

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

Références

1. La Marca A, Argento C, Sighinolfi G, et al. Possibilities and limits of ovarian reserve testing in ART. *Curr Pharm Biotechnol* 2012 ; 13 : 398-408.
2. La Marca A, Sunkara SK. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice. *Hum Reprod Update* 2014 ; 20 : 124-40.
3. Nelson SM. Biomarkers of ovarian response : current and future applications. *Fertil Steril* 2013 ; 99 : 963-9.
4. Dewailly D, Andersen CY, Balen A, et al. The physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women. *Hum Reprod Update* 2014 ; 20 : 370-85.
5. Asada Y, Tsuiki M, Sonohara M, et al. Performance of anti-Müllerian hormone (AMH) levels measured by Beckman Coulter Access AMH assay to predict oocyte yield following controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Reprod Med Biol* 2019 ; 18 (3) : 273-7.
6. Zhang Y, Xu Y, Xue Q, et al. Discordance between antral follicle counts and anti-Müllerian hormone levels in women undergoing in vitro fertilization. *Reprod Biol Endocrinol* 2019 ; 17(1) : 51.
7. Sun Y, Koo S, White N, et al. Development of a micro-array to detect human and mouse microRNAs and characterization of expression in human organs. *Nucleic Acids Res* 2004 ; 32 : e188.
8. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 2004 ; 116 : 281-97.
9. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001 ; 294 : 853-8.
10. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993 ; 75 : 843-54.
11. Thomas M, Lieberman J, Lal A. Desperately seeking microRNA targets. *Nat Struct Mol Biol* 2010 ; 17 : 1169-74.
12. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998 ; 391 : 806-11.
13. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005 ; 123 : 631-40.
14. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004 ; 14 : 1902-10.
15. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004 ; 432 : 231-5.
16. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003 ; 17 : 3011-6.
17. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science* 2001 ; 293 : 834-8.
18. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009 ; 19 : 92-105.
19. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006 ; 6 : 259-69.
20. Hossain MM, Salilew-Wondim D, Schellander K, Tesfaye D. The role of microRNAs in mammalian oocytes and embryos. *Anim Reprod Sci* 2012 ; 134 : 36-44.

- 21.** García-López J, del Mazo J. Expression dynamics of microRNA biogenesis during preimplantation mouse development. *Biochim Biophys Acta* 2012 ; 1819 : 847-54.
- 22.** Hossain MM, Sohel MM, Schellander K, Tesfaye D. Characterization and importance of microRNAs in mammalian gonadal functions. *Cell Tissue Res* 2012 ; 349 : 679-90.
- 23.** Traver S, Assou S, Scalici E, et al. Cell-free nucleic acids as non-invasive biomarkers of gynecological cancers, ovarian, endometrial and obstetric disorders and fetal aneuploidy. *Hum Reprod Update* 2014 ; 20 : 905-23.
- 24.** Imbar T, Eisenberg I. Regulatory role of microRNAs in ovarian function. *Fertil Steril* 2014 ; 101 : 1524-30.
- 25.** Imbar T, Galliano D, Pellicer A, Laufer N. Introduction: MicroRNAs in human reproduction : small molecules with crucial regulatory roles. *Fertil Steril* 2014 ; 101 : 1514-5.
- 26.** Xu YW, Wang B, Ding CH, Li T, Gu F, Zhou C. Differentially expressed microRNAs in human oocytes. *J Assist Reprod Genet* 2011 ; 28 : 559-66.
- 27.** Assou S, Al-Edani T, Haouzi D, et al. MicroRNAs: new candidates for the regulation of the human cumulus-oocyte complex. *Hum Reprod* 2013 ; 28 : 3038-49.
- 28.** Xiao G, Xia C, Yang J, et al. MiR-133b regulates the expression of the Actin protein TAGLN2 during oocyte growth and maturation : a potential target for infertility therapy. *PLoS One* 2014 ; 9 : e100751.
- 29.** Tulay P, Naja RP, Cascales-Roman O, Doshi A, Serhal P, SenGupta SB. Investigation of microRNA expression and DNA repair gene transcripts in human oocytes and blastocysts. *J Assist Reprod Genet* 2015 ; 32(12) : 1757-64.
- 30.** Xu B, Zhang YW, Tong XH, Liu YS. Characterization of microRNA profile in human cumulus granulosa cells : Identification of microRNAs that regulate Notch signaling and are associated with PCOS. *Mol Cell Endocrinol* 2015 ; 404 : 26-36.
- 31.** Shi L, Liu S, Zhao W, Shi J. miR-483-5p and miR-486-5p are down-regulated in cumulus cells of metaphase II oocytes from women with polycystic ovary syndrome. *Reprod Biomed Online* 2015 ; 31 : 565-72.
- 32.** Sirotkin AV, Ovcharenko D, Grossmann R, Lauková M, Mlynček M. Identification of microRNAs controlling human ovarian cell steroidogenesis via a genome-scale screen. *J Cell Physiol* 2009 ; 219 : 415-20.
- 33.** Sirotkin AV, Laukova M, Ovcharenko D, Brenaut P, Mlynček M. Identification of microRNAs controlling human ovarian cell proliferation and apoptosis. *J Cell Physiol* 2010 ; 223 : 49-56.
- 34.** Mase Y, Ishibashi O, Ishikawa T, et al. MiR-21 is enriched in the RNA-induced silencing complex and targets COL4A1 in human granulosa cell lines. *Reprod Sci* 2012 ; 19 : 1030-40.
- 35.** Yang X, Zhou Y, Peng S, et al. Differentially expressed plasma microRNAs in premature ovarian failure patients and the potential regulatory function of mir-23a in granulosa cell apoptosis. *Reproduction* 2012 ; 144 : 235-44.
- 36.** Sirotkin AV, Kisová G, Brenaut P, Ovcharenko D, Grossmann R, Mlynček M. Involvement of microRNA Mir15a in control of human ovarian granulosa cell proliferation, apoptosis, steroidogenesis and response to FSH. *Microna* 2014 ; 3 : 29-36.
- 37.** Troppmann B, Kossack N, Nordhoff V, Schüring AN, Gromoll J. MicroRNA miR-513a-3p acts as a co-regulator of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor gene expression in human granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 2014 ; 390 : 65-72.
- 38.** Sirotkin AV, Alexa R, Kissová G, et al. MicroRNAs control transcription factor NF- κ B (p65) expression in human ovarian cells. *Funct Integr Genomics* 2015 ; 15 : 271-5.
- 39.** Jiang L, Huang J, Li L, et al. MicroRNA-93 promotes ovarian granulosa cells proliferation through targeting CDKN1A in polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2015 ; 100 : E729-38.
- 40.** Chen X, Xie M, Liu D, Shi K. Downregulation of microRNA-146a inhibits ovarian granulosa cell apoptosis by simultaneously targeting interleukin-1 receptor-associated kinase and tumor necrosis factor receptor-associated factor 6. *Mol Med Rep* 2015 ; 12 : 5155-62.
- 41.** Nie M, Yu S, Peng S, Fang Y, Wang H, Yang X. miR-23a and miR-27a promote human granulosa cell apoptosis by targeting SMAD5. *Biol Reprod* 2015 ; 93(4) : 98.
- 42.** Boon RA, Vickers KC. Intercellular transport of microRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013 ; 33 : 186-92.
- 43.** Santonocito M, Vento M, Guglielmino MR, et al. Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid: bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation. *Fertil Steril* 2014 ; 102 : 1751-61.
- 44.** Sadraie SH, Saito H, Kaneko T, Saito T, Hiroi M. Effects of aging on ovarian fecundity in terms of the incidence of apoptotic granulosa cells. *J Assist Reprod Genet* 2000 ; 17 : 168-73.
- 45.** Goswami D, Conway GS. Premature ovarian failure. *Hum Reprod Update* 2005 ; 11 : 391-410.
- 46.** Dang Y, Zhao S, Qin Y, Han T, Li W, Chen ZJ. MicroRNA-22-3p is down-regulated in the plasma of Han Chinese patients with premature ovarian failure. *Fertil Steril* 2015 ; 103 : 802-7.
- 47.** Hawkins SM, Matzuk MM. Oocyte-somatic cell communication and microRNA function in the ovary. *Ann Endocrinol* 2010 ; 71(3) : 144-8.
- 48.** Singh SK, Kagalwala MN, Parker-Thornburg J, Adams H, Majumder S. REST maintains selfrenewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 2008 ; 453 : 223-7.
- 49.** Zhao H, Rajkovic A. MicroRNAs and mammalian ovarian development. *Semin Reprod Med* 2008 ; 26 : 461-8.
- 50.** Pangas SA, Choi Y, Ballow DJ, et al. Oogenesis requires germ cell-specific transcriptional regulators Sohlh1 and Lhx8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 ; 103 : 8090-5.
- 51.** da Silveira JC, Veeramachaneni DN, Winger QA, Carnevale EM, Bouma GJ. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins : a possible new form of cell communication within the ovarian follicle. *Biol Reprod* 2012 ; 86 : 71.
- 52.** Schauer SN, Sontakke SD, Watson ED, Esteves CL, Donadeu FX. Involvement of miRNAs in equine follicle development. *Reproduction* 2013 ; 146 : 273-82.
- 53.** Donadeu FX, Schauer SN. Differential miRNA expression between equine ovulatory and anovulatory follicles. *Domest Anim Endocrinol* 2013 ; 45 : 122-5.

-
54. da Silveira JC, de Andrade GM, Nogueira MF, Meirelles FV, Perecin F. Involvement of miRNAs and cell-secreted vesicles in mammalian ovarian antral follicle development. *Reprod Sci* 2015 ; 22 (12) : 1474-83.
55. da Silveira JC, Winger QA, Bouma GJ, Carnevale EM. Effects of age on follicular fluid exosomal microRNAs and granulosa cell transforming growth factor- β signalling during follicle development in the mare. *Reprod Fertil Dev* 2015 ; 27(6) : 897-905.
56. Sang Q, Yao Z, Wang H, et al. Identification of microRNAs in human follicular fluid: characterization of microRNAs that govern steroidogenesis *in vitro* and are associated with polycystic ovary syndrome *in vivo*. *J Clin Endocrinol Metab* 2013 ; 98 : 3068-79.
57. Moreno JM, Núñez MJ, Quiñonero A, et al. Follicular fluid and mural granulosa cells microRNA profiles vary in *in vitro* fertilization patients depending on their age and oocyte maturation stage. *Fertil Steril* 2015 ; 104 : 1037-1046.e1.
58. Feng WG, Sui HS, Han ZB, et al. Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Theriogenology* 2007 ; 67 : 1339-50.
59. Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2014 ; 11 : 145-56.
60. Long W, Zhao C, Ji C, et al. Characterization of serum microRNAs profile of PCOS and identification of novel non-invasive biomarkers. *Cell Physiol Biochem* 2014 ; 33 : 1304-15.
61. Ding CF, Chen WQ, Zhu YT, Bo YL, Hu HM, Zheng RH. Circulating microRNAs in patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Fertil (Camb)* 2015 ; 18 : 22-9.
62. Roth LW, McCallie B, Alvero R, Schoolcraft WB, Minjarez D, Katz-Jaffe MG. Altered microRNA and gene expression in the follicular fluid of women with polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet* 2014 ; 31 : 355-62.
63. Scalici E, Traver S, Mullet T, et al. Circulating nucleic acids and *in vitro* fertilization. *Gynecol Obstet Fertil* 2014 ; 42 : 696-701.
64. Scalici E, Mullet T, Ferrières Hoa A, et al. Circulating nucleic acids and infertility. *Gynecol Obstet Fertil* 2015 ; 43 : 593-8.