

## Analyse de la maturation ovocytaire et de l'expression génique dans les cellules du cumulus chez des vaches laitières portant les haplotypes Fertil+ et Fertil- d'un QTL de fertilité situé sur le chromosome 3.

BRISARD D. (1), DESMARCHAIS A. (1), TOUZE JL (1), COYRAL-CASTEL S. (1, 2), NUTTINCK F. (3), DUPONT J. (1), UZBEKOVA S. (1)

(1) INRA, UMR 85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

(2) Institut de l'élevage, Département GIPSIE, 149 rue de Bercy 75595, Paris CEDEX 12, France

(3) ENVA UMR 1198 Biologie de la Reproduction et Développement, Jouy en Josas, France

**RESUME** - Notre précédente étude menée sur les génisses Fertil+ et Fertil- génotypées pour un QTL de fertilité femelle situé sur le chromosome 3 (QTL-Fert-F-BTA3) avait mis en évidence une différence de maturation ovocytaire *in vivo* ainsi qu'une différence de qualité embryonnaire *in vitro* entre ces deux haplotypes. Les cellules du cumulus (CC) qui entourent l'ovocyte jouent un rôle important dans l'acquisition de l'aptitude d'un gamète femelle à être fécondé et à soutenir le développement embryonnaire précoce en supportant le métabolisme ovocytaire. Ici, nous avons analysé les complexes ovocyte-cumulus (COC) immatures et matures de huit vaches Fertil+ et huit Fertil- en 3<sup>ème</sup> lactation collectés par Ovum Pick Up. Un arrêt précoce ou un retard de la maturation méiotique des ovocytes a été observé chez les Fertil- après maturation *in vivo* et *in vitro* comparés aux Fertil+. Nous n'avons observé aucune différence d'expression entre les deux haplotypes concernant 3 gènes du QTL-Fert-F-BTA3 dans les CC des ovocytes maturés *in vivo*. En revanche, des différences significatives d'expression de gènes des prostaglandines (PGE) synthases *PTGS2* et *PTGES1* ont été montrées entre les CC entourant les ovocytes maturés *in vivo* des vaches Fertil+ et Fertil-. Un gène du QTL, *PEX19*, ainsi qu'un gène lié à la qualité ovocytaire, *HAS2* de même que *PTGES1* sont moins exprimés dans les CC des Fertil- après maturation *in vitro* (MIV). Ces données suggèrent que les différences dans la régulation de synthèse des prostaglandines dans les follicules pré-ovulatoires altèrent la maturation ovocytaire et donc la fertilité entre ces deux haplotypes, et ouvrent de nouvelles perspectives pour comprendre les mécanismes moléculaires menant aux échecs précoces de la gestation chez les vaches Fertil-.

## Oocyte maturation and gene expression analysis in cumulus cells of dairy cows genotyped for the haplotypes Fertil+ and Fertil- of a fertility QTL located on chromosome 3.

BRISARD D. (1), DESMARCHAIS A. (1), TOUZE JL (1), COYRAL-CASTEL S. (1, 2), NUTTINCK F. (3), DUPONT J. (1), UZBEKOVA S. (1)

(1) INRA, UMR 85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 Nouzilly, France

**SUMMARY** – Our previous study featuring Fertil+ and Fertil- heifers, genotyped for one female fertility QTL located on chromosome 3 (QTL-F-Fert-BTA3), highlighted a difference in oocyte maturation *in vivo* and *in vitro* embryo quality between the two haplotypes. Cumulus cells (CC), which enclose the oocyte, play an important role in the acquisition of female gamete competence to be fertilized and to undergo early embryo development by supporting the oocyte metabolism. Here, immature and mature cumulus oocyte complexes (COC) recovered by Ovum Pick Up were analyzed from cows in third lactation (8 Fertil+, 8 Fertil-). A meiotic maturation delay of the oocytes was observed after *in vivo* and *in vitro* maturation in Fertil- cows compared to Fertil+ ones. Three genes included in the QTL-Fert-F-BTA3 had similar expression in CC of *in vivo* matured oocytes. Nevertheless, significant differences in *PTGS2* and *PTGES1* prostaglandin synthase gene expression were detected in CC from Fertil- *in vivo* matured preovulatory COC. After IVM, the expression of one gene from the QTL, *PEX19*, one gene involved in oocyte quality, *HAS2*, as well as *PTGES1* were shown to be decreased in Fertil- Cumulus Cells (CC). Taken together, these data suggest that differences in prostaglandin synthesis regulation of preovulatory follicles affect oocyte maturation and consequently fertility between these two haplotypes. New perspectives were introduced in order to understand molecular mechanisms related to early gestation failure in Fertil- cows.

## INTRODUCTION

Une étude menée sur des vaches génotypées Fertil+ ou Fertil- pour un QTL de fertilité femelle, QTL-Fert-F-BTA3, montre une diminution du taux de réussite 35 jours après la 1<sup>ère</sup> IA (insémination artificielle) due majoritairement aux échecs de gestation avant 21 jours chez les animaux Fertil- (Coyral-Castel et al., 2011). Les embryons produits par fécondation *in vitro* (FIV) issus des ovocytes de génisses Fertil- montrent une moindre qualité en termes du nombre moyen de cellules par blastocyste par rapport aux Fertil+ (Coyral-Castel et al., 2012). Ces différences suggèrent que la compétence au développement de l'ovocyte pourrait être à l'origine des échecs précoces de la gestation et donc de la moindre fertilité des animaux Fertil-. L'ovocyte acquiert l'aptitude à être fécondé et à soutenir le développement

embryonnaire précoce au cours de sa croissance, de la prématuration et de la maturation finale avant l'ovulation (Dieleman et al., 2002). Les cellules du cumulus (CC) qui l'entourent jouent un rôle important dans cette acquisition en supportant le métabolisme de l'ovocyte (Tanghe et al., 2002). Pourtant l'expression de 6 gènes du QTL-F-BTA3 ne diffère pas dans les CC des ovocytes pré-ovulatoires (PO) entre les génisses Fertil+ et Fertil- (Coyral-Castel et al., 2012). Les objectifs de cette étude sont : a) de voir comment se passe la maturation *in vivo* et *in vitro* des ovocytes de vaches Fertil+ et Fertil- en lactation et b) d'analyser si l'expression de gènes-candidats, appartenant au QTL ou liés au fonctionnement du cumulus et à la qualité ovocytaire, dans les CC correspondantes maturées *in vivo* ou *in vitro* diffèrent entre ces vaches.

## 1. MATERIEL ET METHODES

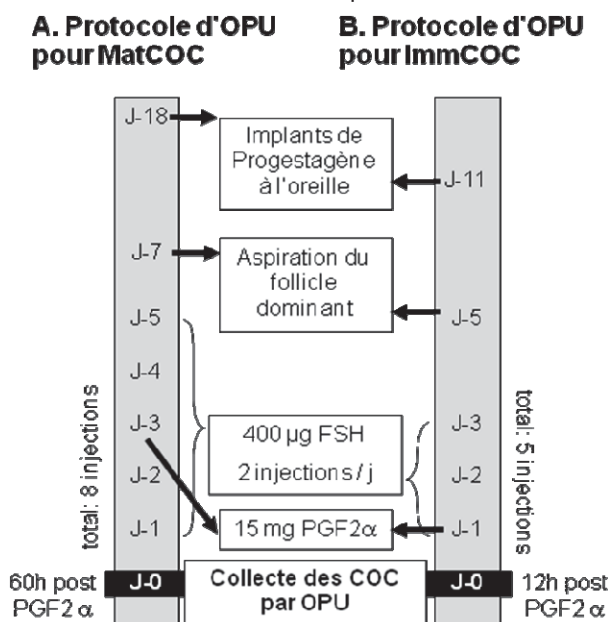
### 1.1. ANIMAUX

Les expériences ont été réalisées à l'Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière (UEPAO) de l'INRA de Nouzilly sur des vaches Prim'Holstein porteuses de l'haplotype homozygote Fertil+ et Fertil-, entre 80 et 120 jours après leur troisième vêlage.

### 1.2. STIMULATION OVARIENNE ET COLLECTE DE COMPLEXES OVOCYTES CUMULUS *IN VIVO*

Huit vaches de chaque haplotype ont été soumises au protocole d'hyperstimulation ovarienne afin d'obtenir des Complexes Ovocyte-Cumulus immatures (ImmCOC) d'une part et des COC matures (MatCOC) d'autre part. Les injections de Stimufol® (400 µg de FSH) ont été réalisées pendant 4 jours (MatCOC) ou 3 jours (ImmCOC). L'ovum Pick-up (OPU) a été réalisée soit 60h après l'injection de PGF2α (>10 mm ; MatCOC) soit 12h après (>6 mm ; ImmCOC).

**Figure 1 :** Protocoles de stimulation ovarienne appliqués afin d'obtenir les MatCOC et ImmCOC par OPU.



### 1.3. ANALYSE MORPHOLOGIQUE DES COC IMMATURES

Les ImmCOC obtenus des follicules >6 mm ont été classés en 3 catégories. La catégorie 1 correspond aux ovocytes avec un cytoplasme homogène et de nombreuses couches compactes de CC. La catégorie 2 correspond aux ovocytes entourés par des CC peu compactes ou un faible nombre de couches de CC ou des ovocytes dont le cytoplasme présente des granulations. Enfin, la catégorie 3 regroupe les ovocytes dénudés ou présentant moins de 2 couches de CC.

### 1.4. MATURATION *IN VITRO* (MIV)

a) Les ImmCOC issus des vaches Fertil+ et Fertil- sont lavés puis mis en maturation *in vitro* (MIV) pendant 24h par groupes de 5-10 COC dans des puits contenant 100µL de milieu de maturation TCM199 enrichi avec des hormones et des facteurs de croissance (Donnay et al., 2004).

### 1.5. COLLECTE DE CELLULES DE CUMULUS

Les CC sont séparées de l'ovocyte mécaniquement. Pour les MatCOC, les CC ont été prélevées à partir de chaque ovocyte individuel séparément. Pour les ImmCOC, les CC de chaque groupe ont été récupérées en pool après MIV. Les CC récupérées ont été conservées dans du TriZol® reagent (Invitrogen) jusqu'à l'extraction des ARN.

### 1.6. ANALYSE DES STADES MEIOTIQUES DES OVOCYTES

Une coloration au Hoechst (1µg/mL) des ovocytes provenant des MatCOC et ceux obtenus après MIV a permis de déterminer les stades méiotiques par fluorescence de leur ADN. Les ovocytes ont été classés en 3 groupes : 1) immatures (stades de vésicule germinale (VG), rupture de la VG (VGBD) ou pré-Méta I); 2) en transition entre la métaphase-I (MI) à télophase-I (MI-Anal-Telol); et 3) matures en Métaphase-II.

### 1.7. REVERSE TRANSCRIPTION ET PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL

Les extractions d'ARN à partir de CC des MatCOC individuels et des pools de CC après MIV ont été réalisées par TriZol® reagent. 150 ng d'ARN ont été convertis en ADNc en utilisant 100 ng de mix oligo-dT et d'hexamères par réaction. L'expression des gènes a été quantifiée par PCR en temps réel en utilisant le supermix SYBR Green (Bio-Rad) et 125 nM d'amorces spécifiques (Tableau 1) et un appareil MyiQ (BioRad). L'expression relative a été calculée pour chaque gène-candidat selon la méthode du 2<sup>-DDCt</sup>. Trois gènes de référence (*RPL19*, *PPIA*, *ACTB*) ont été utilisés afin de normaliser les valeurs obtenues.

**Tableau 1 :** Séquence des amorces utilisées pour la qPCR

Gene ID	Amorce	Séquence (5'-3')
<i>TAGLN2</i>	sens	ATCAACACCACTGACATCTT
	antisens	TCTGTAAGCCAATCACATTCT
<i>PEA15</i>	sens	GTTCAATGTCATATCTGTGTCT
	antisens	TCCATCACTCCTGTATCATC
<i>PEX19</i>	sens	GGGCCTTTTGCATCTAATCA
	antisens	CAGTTTGGGCTCAGAGAAGG
<i>PTGS2</i>	sens	AGGTGTATGTATGAGTGTAGGA
	antisens	GTGCTGGGCAAAGAATGCAA
<i>PTGES1</i>	sens	TGATGAACGGCCAGGTGCTC
	antisens	ATGCCACGGTGTGTACCATACGG
<i>HAS2</i>	sens	CGCCACCAAAGGAAACATATCG
	antisens	GGGCAAACACTGTTAGGCAGA
<i>RPL19</i>	sens	AATCGCCAATGCCAACTC
	antisens	CCCTTCGCTTACCTATACC
<i>PPIA</i>	sens	GCATACAGTCTGGCATCT
	antisens	TGTCCACAGTCAGCAATGGT
<i>ACTB</i>	sens	GCTGTCCCTGTATGCCTCTGG
	antisens	GAACCGCTCATTGCCGATGG

### 1.8. ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Prism (GraphPad). Un Test non paramétrique (Mann-Whitney) a été utilisé avec un seuil de 5% pour analyser les résultats de PCR.

Dans le but de comparer les stades méiotiques des ovocytes Fertil+ et Fertil- des tests du Chi-2 ont été réalisés.

## 2. RESULTATS

### 2.1. ANALYSE MORPHOLOGIQUE DES COC

Après analyse morphologique des ImmCOC aucune différence de distribution par catégorie entre les Fertil+ et Fertil- n'a été mise en évidence (Tableau 2), hormis un nombre de COC récoltés plus faible pour les individus Fertil-.

**Tableau 2 :** Catégories morphologiques des COC immatures collectés par OPU chez les vaches Fertil+ et les Fertil-

ImmCOC	% cat 1	% cat 2	% cat 3
Fertil+ (n=122)	50,0	22,1	27,9
Fertil- (n=77)	42,9	28,6	28,6

## 2.2. TAUX DE MATURATION DES OVOCYTES DES VACHES Fertil+ et Fertil-

### 2.2.1. Ovocytes maturés *in vitro*

Les ImmCOC collectés par OPU chez les vaches Fertil- et Fertil+ ont été mis en MIV et le stade méiotique de chaque ovocyte a été analysé après 24h. Les résultats montrent une distribution différente des stades méiotiques ( $p < 1.10^{-5}$ , Tableau 3) notamment un pourcentage plus important d'ovocytes immatures qui n'ont pas atteint le stade de Métaphase-I ( $p < 0,001$ ) et une diminution du pourcentage d'ovocytes en transition Méta-I/Méta-II ainsi qu'en Méta-II, entre Fertil- et Fertil+ ( $p < 0,05$ ).

**Tableau 3 :** Stades méiotiques des ovocytes après MIV des ImmCOC des vaches Fertil+ et Fertil-

ovocytes	Maturation <i>in vitro</i>		
	% immatures	% Metal-Anal-Telol	% Méta II
Fertil+ (n = 101)	5,9	15,8	78,2
Fertil- (n = 39)	33,3	7,7	59,0

### 2.2.2. Ovocytes maturés *in vivo*

Le nombre d'ovocytes collectés après ponction des follicules préovulatoires est équivalent entre les animaux Fertil+ (n=31) et Fertil- (n=28) (Table 4). Après coloration au Hoechst, une différence de distribution de stades méiotiques est montrée entre les groupes ( $p < 10^{-4}$ ). Plus d'ovocytes aux stades immatures ( $p < 0,01$ ) et moins au stade Méta-II ( $p = 0,07$ ) sont notés chez les vaches Fertil- comparées aux animaux Fertil+.

**Tableau 4 :** Distribution des stades méiotiques des ovocytes maturés *in vivo* des vaches Fertil+ et Fertil-

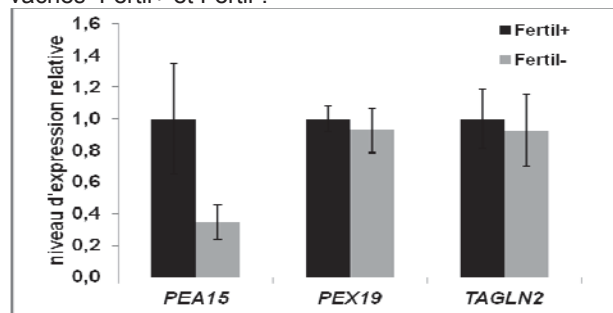
ovocytes	Maturation <i>in vivo</i>		
	% immatures	% Metal-Anal-Telol	% Méta II
Fertil+ (n = 31)	3,2	45,2	51,6
Fertil- (n = 28)	35,7	35,7	23,6

## 2.3. EXPRESSION GENIQUE DANS LES CELLULES DU CUMULUS CHEZ LES VACHES Fertil+ ET Fertil-

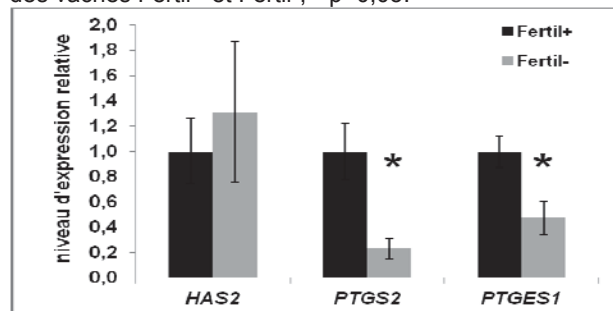
### 2.3.1. Analyse d'expression dans les CC provenant des ovocytes maturés *in vivo*

Trois gènes appartenant au QTL-Fert-F-BTA3 (*TAGLN2* – transgelin 2 ; *PEA15*, phosphoprotein enriched in astrocytes, *PEX19*, peroxisomal biogenesis factor 19) et 3 gènes liés au fonctionnement du cumulus ont été étudiés dans les CC issues de MatCOC individuels. Parmi eux, *HAS2* (hyaluronan synthase 2) est impliqué dans la formation de la matrice extracellulaire, et *PTGS2* et *PTGES1* participent à la régulation de la synthèse de prostaglandines. Aucun des gènes étudiés appartenant au QTL-Fert-F-BTA3 n'est exprimé de manière significativement différente entre les 2 groupes bien que l'expression de *PEA15* tende à être diminuée dans les CC des individus Fertil- (Figure 2). L'analyse de l'expression des gènes impliqués dans le fonctionnement, notamment l'expansion du cumulus, montre une diminution significative de l'expression de *PTGS2* et *PTGES1* dans les CC des COC issus des Fertil- ( $p < 0,05$ , Figure 3).

**Figure 2 :** Expression relative des gènes appartenant au QTL-Fert F-BTA3 dans les CC des MatCOC issus des vaches Fertil+ et Fertil-.



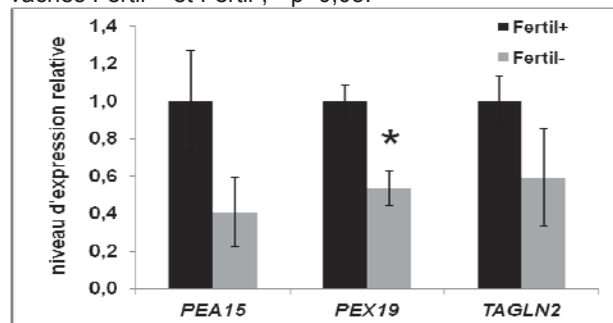
**Figure 3 :** Expression relative des gènes liés au fonctionnement du cumulus dans les CC de MatCOC issus des vaches Fertil+ et Fertil-, \*  $p < 0,05$ .



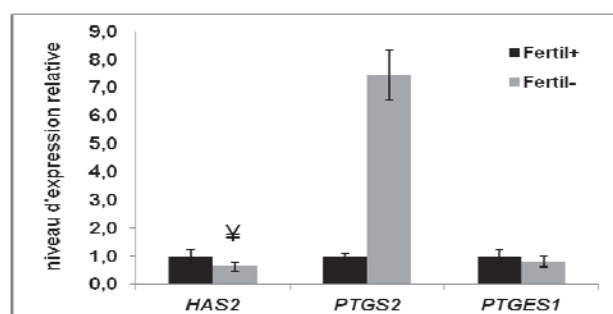
### 2.3.2. Analyse d'expression dans les CC après MIV

Parmi les gènes appartenant au QTL-Fert-F-BTA3, seul *PEX19* a montré une expression diminuée après MIV dans les pools de CC des COC issus des Fertil- par rapport aux Fertil+ ( $p < 0,05$ ; Figure 4). Les gènes impliqués dans l'expansion du cumulus ne semblent pas être affectés après MIV même si l'expression de *HAS2* tend à diminuer dans les CC des vaches Fertil- par rapport aux Fertil+ (Figure 5).

**Figure 4 :** Expression des gènes appartenant au QTL-Fert F-BTA3 dans les CC après MIV des ImmCOC issus des vaches Fertil+ et Fertil-, \*  $p < 0,05$ .



**Figure 5 :** Expression relative des gènes liés au fonctionnement du cumulus dans les CC après MIV des ImmCOC issus des vaches Fertil+ et Fertil-.  $\neq p < 0,09$



### 3. DISCUSSION

Dans notre étude, l'analyse des stades méiotiques des ovocytes collectés des follicules pré-ovulatoires chez les vaches Fertil+ et Fertil- en 3<sup>ème</sup> lactation a mis en évidence un arrêt ou un retard de la maturation confirmant les résultats obtenus chez les génisses porteuses du même haplotype (Coyral-Castel et al., 2012). De plus, une moindre qualité embryonnaire après MIV et FIV des ovocytes de génisses Fertil- (Coyral-Castel et al., 2012) corrobore les données obtenues dans notre étude puisqu'une altération de la maturation a été notée après MIV pour les vaches Fertil- pouvant être reliée à une moindre qualité ovocytaire. Il est intéressant de noter que tout comme dans l'étude menée sur les génisses aucune différence de qualité morphologique des COC immatures n'a été notée entre les haplotypes.

L'aptitude de l'ovocyte à soutenir le développement embryonnaire précoce est associée à l'expression de gènes dans les CC qui l'entourent (Assidi et al., 2008). Selon nos résultats, des différences d'expression des gènes appartenant au QTL-Fert-F-BTA3 dans les CC des ovocytes maturés *in vivo* ne semblent pas être associées aux problèmes de fertilité chez les vaches «Fertil-», comme chez les génisses (Coyral-Castel et al., 2012). Par contre, après MIV, une diminution de l'expression de *PEX19* appartenant au QTL-Fert-F-BTA3 a été notée dans les CC des Fertil-comparées aux Fertil+. Ce gène participe à la formation des peroxysomes qui sont impliqués dans la détoxification des cellules par dégradation du peroxyde d'hydrogène toxique et dans le catabolisme d'acides gras. En ce qui concerne les gènes associés au fonctionnement du cumulus, nous avons montré une diminution de l'expression de *PTGS2* et de *PTGES1* dans les CC des COC maturés *in vivo* provenant des vaches Fertil-. Après MIV, l'expression de *HAS2* dans les CC des vaches Fertil- tendait à diminuer. *HAS2* est un gène clé de la formation de la matrice extracellulaire connu pour jouer un rôle décisif dans l'expansion des CC (Sugiura et al., 2009). Sa sous-expression dans les CC après MIV chez la vache (Salhab et al., 2010) et après maturation *in vivo* chez la femme (Mckenzie et al., 2004) a déjà été observée et est associée à une moindre qualité ovocytaire.

*PTGS2* joue un rôle majeur dans l'expansion des CC ainsi que dans le processus de maturation ovocytaire (Eppig, 1981; Hizaki et al., 1999). L'expression de *PTGS2* et *PTGES1* augmente dans les CC bovines au cours de la maturation ovocytaire. Ils sont associés à la régulation de la synthèse de PGE2 (Nuttinck et al., 2008). De plus, des propriétés anti-apoptotiques ont été montrées pour ces 2 gènes (Choi et al., 2005; Bowolaksono et al., 2008). Une diminution de leur expression dans les CC des vaches Fertil-pourrait donc être liée à la moindre qualité ovocytaire observée, surtout que l'expression de *PTGS2* dans les CC est considérée comme un marqueur de la compétence ovocytaire au développement chez la vache (Assidi et al., 2008) comme chez la femme (Gebhardt et al., 2011).

La MIV en présence d'un inhibiteur spécifique de *PTGS2* (NS-398) induit un retard de maturation des ovocytes (Nuttinck et al., 2011), résultats que nous avons confirmé (non montré). Les auteurs ont également montré une altération de la phosphorylation des MAP kinases ERK1/2 dans les ovocytes 6h-8h après MIV et une diminution du nombre de blastomères dans les embryons de 7 jours post FIV après inhibition de *PTGS2* par 8 µM de NS-398. Ici, nous avons observé un retard ou un arrêt précoce de la méiose après maturation *in vitro* et *in vivo* des ovocytes issus des vaches Fertil- et l'altération de l'expression de *PTGS2* et *PTGES1* dans les CC correspondantes. Cela indique que la voie de synthèse des prostaglandines dans les cellules folliculaires peut être altérée chez les animaux portant l'haplotype Fertil- par rapport aux Fertil+.

De plus, la diminution du nombre de cellules dans les blastocystes obtenus après MIV et FIV chez les génisses Fertil- suggère que les mécanismes affectant la qualité

ovocytaire et embryonnaire des génisses et des vaches en 3<sup>ème</sup> lactation Fertil+ et Fertil- sont similaires et ont déjà lieu avant la conception.

### CONCLUSION

Le défaut de maturation menant à la moindre fertilité mise en évidence chez les génisses a été observé aussi chez les vaches Fertil- en 3<sup>ème</sup> lactation. L'expression dans les CC de gènes appartenant au QTL-Fert-F-BTA3 étudiés ici ne semble pas être impliquée dans cette différence après maturation *in vivo*, mais *PEX19* pourrait être un facteur limitant de la MIV dans les CC des vaches Fertil-. Il semble que la régulation de la méiose par *PTGS2* incluant la voie des MAP kinases dans l'ovocyte ainsi que la synthèse de PGE et l'induction d'apoptose dans les CC, soit impliquée dans les phénomènes observés.

Déterminer précisément quels sont les acteurs majeurs de ces voies, qui induisent la moindre aptitude de l'ovocyte au développement, pourrait permettre d'expliquer la différence de fertilité entre les deux haplotypes.

*Les auteurs souhaitent remercier le personnel de l'UEPAO pour leur aide dans les expérimentations. L'entretien d'animaux a été financé par Apisgene (projet FERTINUT). Le travail de laboratoire a été financé par ANR (projet Oscile, ANR-08-GENM-033).*

**Assidi, M., Dufort, I., Ali, A., Hamel, M., Algriany, O., Dielemann, S. and Sirard, M.A. 2008.** Biol Reprod, 79, 209-222.

**Bowolaksono, A., Nishimura, R., Hojo, T., Sakumoto, R., Acosta, T.J. and Okuda, K. 2008.** Biology of Reproduction, 79, 310-317.

**Choi, E.-M., Heo, J.-I., Oh, J.-Y., Kim, Y.-M., Ha, K.-S., Kim, J.-I. and Han, J.A. 2005.** Biochemical and Biophysical Research Communications, 328, 1107-1112.

**Coyral-Castel, S., Rame, C., Monniaux, D., Freret, S., Fabre-Nys, C., Fritz, S., Monget, P., et al. 2011.** Theriogenology.

**Coyral-Castel, S., Brisard, D., Touze, J.L., Dupont, M., Rame, C., Uzbekova, S. and Dupont, J. 2012.** Theriogenology.

**Dieleman, S.J., Hendriksen, P.J.M., Viuff, D., Thomsen, P.D., Hyttel, P., Knijn, H.M., Wrenzycki, C., et al. 2002.** Theriogenology, 57, 5-20.

**Donnay, I., Faerge, I., Grondahl, C., Verhaeghe, B., Sayoud, H., Ponderato, N., Galli, C., et al. 2004.** Theriogenology, 62, 1093-1107.

**Eppig, J.J. 1981.** Biology of Reproduction, 25, 191-195.

**Gebhardt, K.M., Feil, D.K., Dunning, K.R., Lane, M. and Russell, D.L. 2011.** Fertil Steril, 96, 47-52 e42.

**Hizaki, H., Segi, E., Sugimoto, Y., Hirose, M., Saji, T., Ushikubi, F., Matsuoka, T., et al. 1999.** Proceedings of the National Academy of Sciences, 96, 10501-10506.

**McKenzie, L.J., Pangas, S.A., Carson, S.A., Kovanci, E., Cisneros, P., Buster, J.E., Amato, P., et al. 2004.** Hum Reprod, 19, 2869-2874.

**Nuttinck, F., Marquant-Le Guienne, B., Clement, L., Renaud, P., Charpigny, G. and Grimard, B. 2008.** Reproduction, 135, 593-603.

**Nuttinck, F., Gall, L., Ruffini, S., Laffont, L., Clement, L., Renaud, P., Adenot, P., et al. 2011.** Biology of Reproduction, 84, 1248-1257.

**Salhab, M., Papillier, P., Perreau, C., Guyader-Joly, C., Dupont, J., Mermillod, P. and Uzbekova, S. 2010.** Reprod Fertil Dev, 22, 1206-1221.

**Sugiura, K., Su, Y.-Q. and Eppig, J.J. 2009.** Molecular Reproduction and Development, 76, 537-547.

**Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M. and de Kruijff, A. 2002.** Molecular Reproduction and Development, 61, 414-424.