

Titre:**« Néo-ovogenèse dans l’ovaire adulte : Mythe ou réalité ? »**

Title: Neo-oogenesis in the adult ovary : what do we know?

Sophie SUN¹, Céline PIMENTEL¹, Marina YEFIMOVA², Sylvie JAILLARD³; Célia RAVEL^{1,4}¹Univ Rennes, CHU Rennes, Service de Biologie de la Reproduction - CECOS, 35000, Rennes, France.²Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences, St-Petersbourg, Russie.³Univ Rennes, CHU Rennes, Laboratoire de Cytogénétique, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) – UMR_S 1085, 16 boulevard de Bulgarie, 35000, Rennes, France.⁴Univ Rennes, INSERM Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) – UMR_S 1085, 16 boulevard de Bulgarie, 35000, Rennes, France.

Auteur correspondant :

Pr C. Ravel Service de Biologie de la Reproduction-CECOS
Hôpital Sud, 16 Bd de Bulgarie 35 000 Rennes

celia.ravel@chu-rennes.fr tel : 0299265911 fax : 0299265912

Résumé :

Depuis plus d’une dizaine d’années, l’existence de cellules souches ovariennes pouvant contribuer à une néo-ovogenèse dans l’ovaire adulte est rapportée par certaines équipes. Cela remet en question des travaux plus anciens, selon lesquels le stock de cellules germinales présent dans l’ovaire des mammifères (à de rares exceptions) est fixé (et non renouvelable) autour de la naissance de la biologie féminine selon lequel les femelles des mammifères naissent avec un stock fixe et non renouvelé de cellules germinales. La possible présence de cellules souches germinales ayant une activité mitotique suggère la possibilité d’une ovogenèse post-natale potentielle. Ces cellules présentent à la fois des marqueurs de cellules germinales et de cellules souches en culture. Elles ont été isolées en utilisant différentes stratégies *in vitro* et leur capacité à se différencier en ovocytes *in vivo* a été démontrée puisqu’après réintroduction dans un environnement somatique ovarien, ces cellules génèrent des follicules capables de produire une progéniture viable chez les rongeurs. Toutefois, de nombreux scientifiques restent sceptiques et remettent en question la fiabilité des méthodes utilisées. Malgré le fait qu’il n’existe actuellement aucun consensus sur l’existence ni sur l’origine de ces cellules souches ovariennes, des entreprises commerciales proposent aujourd’hui d’utiliser leur potentiel de cellules souches pour traiter certains types d’infertilité humaine.

Abstract :

For more than a decade, the existence of ovarian stem cells that can contribute to neo-oogenesis in the adult ovary is reported by some teams, challenging the dogma according to which mammalian females are born with a fixed and non-renewed germinal cell pool. The presence of germinal stem cells with mitotic activity suggests the possibility of potential postnatal oogenesis. These cells have both germ-line and stem cell markers in culture. They have been isolated using different strategies and their ability to differentiate into oocytes has been demonstrated since after reintroduction in an ovarian somatic environment, these cells generate follicles capable of producing healthy offspring in rodents. However, many scientists remain skeptical and question the reliability of the methods used. Despite that there is no consensus on the origin of these ovarian stem cells, private companies are now proposing to use their stem cell potential to treat human infertility.

Mots Clés: cellules souches/ ovaires/ DDX4

Keywords: stem cell/ ovary/DDX4

INTRODUCTION

Depuis l'hypothèse émise en 1921 par Pearl et Shoppe [1] puis par les travaux de Zuckerman [2] dans les années cinquante, il a été bien établi que le stock des follicules primordiaux est fixé dès la fin du 7^{ème} mois de la vie intra-utérine. De nombreuses équipes ont conforté cette hypothèse [3-5].

Depuis plus de cinquante ans, cet aspect de la biologie ovarienne selon lequel les femelles des mammifères naissent avec un pool fixe et non renouvelé de cellules germinales n'avait pas été contesté. Chaque follicule primordial, d'un diamètre moyen de 35 μm , contient un ovocyte I bloqué en prophase de première division méiotique ; il est entouré par une seule assise de 3 à 4 cellules folliculeuses aplaties, séparées du stroma environnant par une lame basale. Les follicules entreront en croissance par vagues successives à partir du pool de follicules primordiaux, appelé réserve ovarienne (Figure 2). Cette dernière diminue avec l'âge en raison de l'entrée, en atresie ou en croissance, des follicules qui la composent, jusqu'à son épuisement au moment de la ménopause [6]. La morphologie et la taille des follicules en croissance évoluent avec leur stade de développement ; ils sont divisés en trois catégories : follicules primaires, secondaires et antraux. Au moment de la puberté, avec le démarrage de l'activité cyclique de l'hypothalamus et la sécrétion par l'adéno-hypophyse de FSH (Follicle Stimulating Hormone) et de LH (Luteinizing Hormone), la croissance des follicules peut être

menée à son terme qui est l'ovulation du follicule le plus volumineux : le follicule préovulatoire.

1) HYPOTHÈSE DE L'EXISTENCE D'UNE NÉO-OVOGENÈSE

Le concept de nouveaux ovocytes et follicules provenant des cellules de l'épithélium de surface dans l'ovaire post-natal de souris a été évoqué dès 1917 [7]. La prolifération de cellules germinales dans l'ovaire adulte de plusieurs espèces du monde animal conforte cette hypothèse. En effet, il existe une néo-ovogenèse chez les insectes, notamment la drosophile, chez les amphibiens (Axolotl, *Ambystoma mexicanum*), chez les poissons (Teleost medaka) chez plusieurs espèces de chauve-souris (*Artibeus jamaicensis*, *Glossophaga soricina*, *Sturnira lilium*) et même chez certains primates (*Loris tardigradus*, *Loris lydekkerianus*, *Nycticebus coucang*) [8-12].

En 2004, Johnson *et al.* [13] sont les premiers à décrire une néo-ovogenèse dans les ovaires de souris adultes en suggérant l'existence d'une population de cellules souches capables de générer des follicules ovariens après une déplétion chimio-induite. Suite à l'analyse histo-morphométrique de l'atrésie folliculaire dans l'ovaire de souris, les auteurs ont constaté que cette atrésie était si importante qu'elle devait théoriquement aboutir à une déplétion complète de la réserve ovarienne chez les jeunes souris adultes. Or la cinétique observée est beaucoup plus lente, et permet aux auteurs d'évoquer cette hypothèse de néo-ovogenèse. Ces données ont été confortées par les expériences d'un autre laboratoire [14] qui a pu également isoler des ovogonies à partir de tissu ovarien murin dissocié grâce à un anticorps spécifique dirigé contre DDX4 (DEAD-box protein 4, aussi appelé Mouse Vasa Homologue, MVH). Il s'agit d'une hélicase d'ARN spécifique des cellules germinales. Ce travail a permis la naissance de souris vivantes après injection de ces cellules dans des ovaires murins dépourvus de follicules. Pacchiarotti *et al.* [15] ont également isolé des ovogonies en utilisant un autre marqueur spécifique de la lignée germinale (Oct-4, uniquement présent dans les ovocytes pré-méiotiques) chez des souris transgéniques. Quelques années plus tard, Tilly et ses collègues [16,17] confirment l'identification et la caractérisation de ces cellules dans les ovaires humains. Ils réussissent à les trier en utilisant un anticorps polyclonal spécifique pour DDX4. White *et al.* [16] optimisent ainsi la sélection de ces cellules très rares mais ils démontrent également que, dans des conditions techniques appropriées, la production d'ovocytes compétents et fécondables à partir de cellules souches dans l'ovaire humain est possible (Figure 3).

2) POURQUOI LA COMMUNAUTE SCIENTIFIQUE RESTE-T-ELLE SCEPTIQUE ?

Malgré la publication de ces travaux, la communauté scientifique conteste l'existence de ces cellules souches car d'autres études viennent contredire ces résultats. Ainsi, dès 2012, Zhang *et al.* [18] démontrent, en utilisant une approche génétique endogène, que les cellules germinales des souris femelles post-natales ne se divisaient pas et donc ne pouvaient pas contribuer pas à la folliculogenèse de novo. Cette conclusion est ensuite confirmée l'année suivante par les travaux de Lei et Spradling [19]. Plusieurs laboratoires ont ~~donc~~ tenté de reproduire les travaux de J. Tilly sans succès, en reprenant les mêmes méthodologies :

a) La modélisation mathématique

En utilisant un modèle mathématique analysant la dynamique de la progression des follicules (primordial, primaire, secondaire), Bristol-Gould *et al.* [20] ont examiné si le pool initial de follicules est suffisant pour la fertilité adulte par sénescence reproductive chez les souris CD1. Les follicules de chaque stade ont été comptés du 6^{ème} au 12^{ème} jour post-natal et les données ont été ajustées par des séries d'équations différentielles représentant deux mécanismes : un pool initial de follicules primordiaux comme seule source folliculaire (modèle « pool fixe »), ou un pool initial de follicules primordiaux complété par des cellules souches germinales (modèle « cellules souches »). Les données expérimentales correspondent au modèle « pool fixe » et représentent avec précision le nombre maximum de follicules primaires observés à 4-6 mois. Le modèle « cellules souches », quant à lui, ne correspond pas du tout à la diminution observée des follicules au cours de la vie fertile de la souris. De plus, aucune cellule souche germinale n'a pu être identifiée par immunomarquage. Les auteurs en déduisent que l'ovaire est doté d'un pool fixe de follicules ovariens et ce pool semble suffisant pour assurer la fertilité de la souris adulte. L'équipe de Tilly aurait en fait conclu à l'existence d'une néo-ovogenèse dans l'ovaire de souris adulte en se basant sur un taux d'atrésie de la réserve ovarienne surestimé [21].

b) L'anticorps anti-DDX4

Au centre de la controverse se trouvent, d'une part, la localisation intracellulaire de la protéine DDX4 - qui a été reconnue comme étant cytoplasmique dans les cellules germinales – et d'autre part, la spécificité des anticorps utilisés. Dans un article publié en 2015, quatre laboratoires indépendants ont rapporté l'impossibilité de reproduire les résultats obtenus par l'équipe de J. Tilly [22]. Le tri cellulaire a été réalisé par cytométrie en flux pour séparer les

populations DDX4-positives et DDX4-négatives à partir de fragments dissociés d'ovaires humains. Aucune des populations cellulaires, qu'elles soient positives ou négatives pour DDX4, n'a exprimé d'ARNm DDX4 détectable. Cette stratégie d'immuno-sélection basée sur l'anticorps anti- DDX4 a même permis d'isoler des cellules positives à DDX4 à partir de tissus non ovariens : le foie, la rate et les reins alors que cette protéine est décrite comme spécifique des cellules germinales.. Lorsque les cellules d'origine ovarienne positives pour DDX4 ont été mises en culture, marquées par un fluorochrome pour suivre leur évolution *in vivo*, puis ré-injectées dans des ovaires de souris ou humains, Zhang *et al.* n'ont observé aucune nouvelle formation folliculaire contenant des ovocytes dérivés de cellules souches. La spécificité de la méthode d'isolement cellulaire, qui repose sur la détection par un anticorps d'un épitope de surface cellulaire DDX4 dans des cellules germinales humaines et de souris est ainsi remise en question [23]. En accord avec les résultats de Zhang *et al.* [22], Hernandez *et al.* [24] n'ont pu obtenir aucune preuve d'expression d'ARNm ou de protéine DDX4. Ces deux études soulèvent la question de la conformation protéique de DDX4 qui pourrait être responsable de la faible efficacité du tri des cellules souches initialement observées en utilisant des anticorps spécifiques à DDX4 [25].

3) LA CONTROVERSE N'EST PAS FINIE:

Woods et Tilly fournissent de nouveaux résultats qui soutiennent leurs revendications originales et contestent la pureté et l'incohérence des rendements qui peuvent expliquer l'absence de détection de DDX4 (ARNm et protéines) [26]. Par spectrométrie de masse du tissu ovarien de souris et de babouin, ils montrent l'existence d'un variant de surface cellulaire de DDX4, arguant que les méthodes utilisées par Hernandez *et al* [24] pour générer des peptides étaient inadéquates expliquant ainsi l'absence de détection de DDX4. Très récemment, ils ont présenté un modèle de souris transgéniques qui confirme l'existence de cellules souches [27]. Ils ont réalisé une ablation réversible et ciblée des cellules germinales préméiotiques en cours de différenciation dans des ovaires de souris adultes. Le modèle utilisé est un modèle de souris transgénique exprimant un gène suicide HSVtk (herpes simplex virus thymidine kinase). La mort cellulaire est induite par l'exposition au ganciclovir (GCV). Après 21 jours d'exposition à cette drogue, le pool d'ovocytes diminue de façon drastique mais ils observent une régénération du pool d'ovocytes. Pour prouver que ces ovocytes générés à l'âge adulte sont bien fonctionnels, ils suivent le devenir *in vivo* des ovocytes nouvellement formés grâce à l'activation d'un gène rapporteur fluorescent dans les cellules exprimant Stra8 (marqueur spécifique des cellules germinales). L'induction de ce système à

l'âge adulte a produit une mosaïque d'ovocytes non marqués (préexistants) et marqués (nouvellement formés). Ces ovocytes marqués ont été fécondés, donnant naissance à des souriceaux, ce qui a permis d'observer la transmission du transgène à la génération suivante et de confirmer que sa localisation était bien au niveau de l'ovaire [27]. Ces résultats suggèrent, selon les auteurs, que les ovocytes générés pendant la vie adulte contribuent directement à la fonction ovarienne et à la fertilité naturelle chez les mammifères.

4) POURQUOI CES CELLULES SONT-ELLES RESTEES IGNOREES DEPUIS SI LONGTEMPS ?

Il semblerait tout d'abord que ces ovogonies ~~CSO~~ soient extrêmement rares. White *et al.* [16] rapportent qu'elles ne représentent que 0,014% de toutes les cellules des ovaires de souris. La variation entre les valeurs rapportées par différents groupes est susceptible de refléter les méthodes d'isolement très différentes utilisées. Cela explique peut-être aussi le délai entre la découverte initiale supposée de ces cellules et leur isolement à partir du cortex ovarien. De plus, l'amélioration des technologies permet d'entreprendre de nouvelles études qui produisent des preuves compatibles avec l'existence de cellules souches dans les ovaires adultes humains et de souris, qui peuvent être cultivées *in vitro*.

La gamétogenèse humaine diffère évidemment de celle de la souris, en particulier l'ovogenèse. Les cellules germinales femelles chez la souris se développent plus ou moins de façon synchrone avec une brève vague méiotique antéro-postérieure, tandis que dans l'embryon humain, les cellules germinales se développent de façon asynchrone et radiale. De plus, l'expression des marqueurs diffère. La différence la plus caractéristique est l'expression de Sox2, un des quatre facteurs nécessaires pour reprogrammer les cellules somatiques en cellules pluripotentes induites [28]. En effet, si les cellules germinales de souris expriment Sox2, les cellules germinales humaines semblent ne pas l'exprimer. On ne sait pas à l'heure actuelle quel est le facteur, probablement un autre membre de la famille Sox, qui remplace cette fonction de Sox2 dans les cellules germinales humaines. SOX 17 serait un bon candidat [29].

5) UTILISATION DE CES CELLULES EN THERAPEUTIQUE HUMAINE

Le traitement "AUGMENTSM" (Autologous Germline Mitochondrial ENergy Transfert) est actuellement proposé en traitement adjuvant de Fécondation *in vitro* (FIV) avec micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) dans l'ovocyte (Figure 1). Il consiste au transfert de mitochondries issues de cellules baptisées «EggPCSM» (correspondant aux

cellules souches ovariennes censées exprimer DDX4)) dans le cytoplasme de l'ovocyte lors de la microinjection et serait un moyen d'améliorer la qualité ovocytaire des patientes en échec de FIV [30]. L'argument majeur repose sur l'altération liée à l'âge de la production énergétique nécessaire au bon fonctionnement ovocytaire en raison d'un dysfonctionnement mitochondrial [31]. Il s'agirait ainsi d'améliorer le niveau d'énergie intracellulaire en injectant des mitochondries prélevées dans des cellules jeunes qui ont gardé leur potentiel de cellules souches [32]. Deux articles rapportent une amélioration significative des taux de grossesses chez des patientes ayant eu plusieurs échecs de FIV/ICSI, mais les effectifs restent très petits, sans aucun suivi au long cours [33,34]. La technique du transfert cytoplasmique a pourtant déjà été utilisée il y a quelques années et a permis la naissance d'une vingtaine de bébés [35]. Barritt *et al.* [36] ont réalisé un transfert ovoplasmique, donc de mitochondries, d'ovocytes de donneuses dans des ovocytes matures de patientes ayant échoué plusieurs cycles de FIV en raison d'un développement embryonnaire médiocre, permettant l'obtention de grossesses et de naissances vivantes. Plusieurs des bébés testés se sont révélés être hétéroplasmiques, c'est-à-dire avoir de l'ADN mitochondrial (ADNmt) dérivé de la mère et de la donneuse de cytoplasme [35].

À l'heure actuelle, peu de centres dans le monde proposent le traitement AUGMENTSM (Canada, Dubai, Turquie). En Europe, une étude expérimentale randomisée a été réalisée en Espagne sur 59 patientes infertiles âgées de 42 ans ou moins et n'a montré aucun bénéfice en terme de grossesse ou de taux de naissances vivantes [37]. Il est intéressant de noter que les équipes cliniques qui pratiquent cette technique « sous-traitent » l'isolement des cellules souches ovariennes éventuelles à une entreprise privée [37]. Pour le moment, la communauté médicale reste sceptique car l'efficacité de cette technique n'est pas prouvée et la sécurité n'est pas garantie. En effet, il s'agit d'une procédure invasive, nécessitant un prélèvement chirurgical de cortex ovarien. L'impact et les conséquences de l'adjonction de mitochondries de cellules présentant des stades de développement et de différenciation différentes n'ont pas été explorés. Le taux optimal de mitochondries n'est absolument pas défini. Il a d'ailleurs été montré chez la souris qu'un taux trop important de mitochondries pouvait être toxique pour la cellule [38]. Les modifications épigénétiques éventuelles liées à la micromanipulation ou une éventuelle incompatibilité d'ADN mitochondrial n'ont pas non plus été évaluées. D'ailleurs, ces cellules souches différenciées sont souvent décrites anormales, d'où la dénomination «ovocytes like ».

6) L'ÉPITHELIUM DE SURFACE OVARIEN: SOURCE POTENTIELLE DE CELLULES SOUCHES ?

L'épithélium de surface ovarien, constitué d'une assise de cellules cubiques, a été proposé très tôt comme source potentielle de cellules souches, ou même de follicules primordiaux, dans les ovaires adultes et a donc été appelé épithélium «germinatif» par les histologistes [39]. . Sous ce dernier, le cortex ovarien est composé d'une couche mal délimitée de tissu conjonctif dense, appelée albuginée, et d'une zone de cellules conjonctives fusiformes disposées en tourbillons qui renferme les follicules ovariens à différents stades de leur croissance. La portion centrale de l'ovaire, la médulla, constituée de tissu conjonctif lâche, contient des vaisseaux sanguins dont des artères spiralées, des vaisseaux lymphatiques et des .

Il pourrait y avoir d'autres populations de cellules souches potentiellement cellules progénitrices d'ovocytes. En 2005, Bukovsky *et al.* [40] décrivent le développement *in vitro* de cellules présentant la morphologie d'un ovocyte dans des cultures d'épithélium de surface. Ils ont raclé—ce dernier sur des fragments de cortex ovarien prélevés chez des femmes ménopausées, mis en culture les cellules obtenues et ont observé le développement de cellules de type ovocyte *in vitro*. Ces cellules ont effectivement exprimé certains des marqueurs spécifiques ovocytaires, révélés par immunocytochimie. Ces cellules présentent des processus spécifiques à l'ovocyte : rupture de la vésicule germinative, expulsion d'un globule polaire et expression de surface des protéines de la zone pellucide [41]. Il a également été proposé que des précurseurs d'ovocytes puissent se développer à partir de cryptes d'épithélium de surface ovarienne et de cellules de granulosa provenant de cordons épithéliaux contenant des cellules souches. Ce principe a été suggéré comme base pour l'ovogenèse *de novo* et le renouvellement folliculaire dans les ovaires mammaliens post-nataux [42].

Conclusion

Les mécanismes physiopathologiques pouvant entraîner une insuffisance ovarienne sont nombreux [43]. La possibilité d'isoler et de cultiver des cellules souches pourrait permettre de pallier cette insuffisance, c'est le challenge scientifique actuel et les avancées dans ce domaine sont fulgurantes : Des ovogonies ont été isolées à partir d'ovaires de rongeurs adultes et humains, ces cellules présentant à la fois des marqueurs de cellules germinales et de cellules souches en culture. Après réintroduction dans un environnement somatique ovarien, ces cellules génèrent des follicules capables de produire une progéniture saine chez les rongeurs, et il existe des preuves que des cellules humaines sont capables de former des structures de type ovocyte dans un modèle de xénotransplant. Toutefois, leur rôle

physiologique *in situ* dans l'ovaire n'est pas clairement établi et il n'y a aucune preuve qu'elles contribuent au pool de follicules primordiaux et donc aux stades ultérieurs du développement folliculaire. Ces cellules peuvent être utiles pour établir des modèles d'étude de différenciation des cellules germinales humaines et de leurs interactions avec les cellules somatiques ovariennes. La production d'ovocytes humains à partir de cellules souches *in vitro* reste encore une perspective lointaine. Bien que certaines entreprises commerciales proposent la possibilité d'utiliser de potentielles cellules souches pour traiter certains types d'infertilité humaine, il n'existe actuellement aucun consensus sur leur existence, leur origine et leur fonctionnalité.

Accepted Manuscript

REFERENCES

1. Pearl R, Schoppe WF. Studies on the physiology of reproduction in the domestic fowl. XVIII. Further observations on the anatomical basis of fecundity. *J Exp Zool* 1921;34:100-18.
2. Zuckerman S. The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Prog Horm Res* 1951;6:63-108.
3. Borum K. Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. *Exp Cell Res* 1961;24:495-507.
4. McLaren A. Meiosis and differentiation of mouse germ cells. *Symp Soc Exp Biol* 1984;38:7-23.
5. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996 ;17:121-55.
6. Gougeon A, Ecochard R, Thalabard JC. Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. *Biol Reprod* 1994;50:653-63.
7. Kingery HM. Oogenesis in the white mouse. *J Morphol* 1917;30:261-315.
8. Xie T, Kawase E, Kirilly D, Wong MD. Intimate relationships with their neighbors: tales of stem cells in *Drosophila* reproductive systems. *Dev Dyn* 2005;232:775-90.
9. Nakamura S, Kobayashi K, Nishimura T, Higashijima S, Tanaka M. Identification of germline stem cells in the ovary of the teleost medaka. *Science* 2010;328:1561-3.
- 10- Duke KL. Ovogenetic activity of the fetal-type in the ovary of the adult slow loris *Nycticebus coucang*, *Folia Primatol* (Basel) 1967;7:150-154.
- 11- David GF, Anand Kumar TC, Baker TG. Uptake of tritiated thymidine by primordial germinal cells in the ovaries of the adult slender loris. *J Reprod Fertil* 1974;41:447-451.
12. Antonio-Rubio NR, Porrás-Gómez TJ, Moreno-Mendoza N. Identification of cortical germ cells in adult ovaries from three phyllostomid bats: *Artibeus jamaicensis*, *Glossophaga soricina* and *Sturnira lilium*. *Reprod Fertil Dev* 2013;25:82 5-36.
13. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 2004;428:145-50.
14. Zou K, Yuan Z, Yang Z, Luo H, Sun K, et al. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol* 2009;11:631-6.

15. Pacchiarotti J, Maki C, Ramos T, Marh J, Howerton K, et al. Differentiation potential of germ line stem cells derived from the postnatal mouse ovary. *Differentiation* 2010;79:159-70.
16. White Y, Woods DC, Takai Y, Ishihara O, Seki H, et al. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nat Med* 2012;18:413-21.
17. Woods DC, Tilly JL. Isolation, characterization and propagation of mitotically active germ cells from adult mouse and human ovaries. *Nat Protoc* 2013;8:966-88.
18. Zhang H, Zheng W, Shen Y, Adhikari D, Ueno H, et al. Experimental evidence showing that no mitotically active female germline progenitors exist in postnatal mouse ovaries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:12580-5.
19. Lei L, Spradling AC. Female mice lack adult germ-line stem cells but sustain oogenesis using stable primordial follicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:8585-90.
20. Bristol-Gould SK, Kreeger PK, Selkirk CG, Kilen SM, Mayo 355 KE, et al. Fate of the initial follicle pool: empirical and mathematical evidence supporting its sufficiency for adult fertility. *Dev Biol* 2006;298:149-54.
21. Byskov AG, Faddy MJ, Lemmen JG, Andersen CY. Eggs forever? *Differentiation*. 2005;73:438-46.
22. Zhang H, Panula S, Petropoulos S, Edsgård D, Busayavalasa K, et al. Adult human and mouse ovaries lack DDX4-expressing functional oogonial stem cells. *Nat Med* 2015;21:1116-8.
23. Albertini DF, Gleicher N. A detour in the quest for oogonial stem cells: methods matter. *Nat Med* 2015;21:1126-7.
24. Hernandez SF, Vahidi NA, Park S, Weitzel RP, Tisdale J, et al. Characterization of extracellular DDX4- or Ddx4-positive ovarian cells. *Nat Med* 2015;21:1114-6.
- 25- Telfer EE, Albertini DF. The quest for human ovarian stem cells. *Nat Med* 2012;18:353-4.
26. Woods DC, Tilly JL. Woods and Tilly reply. *Nat Med* 2015;21:1118-21.
27. Wang N, Satirapod C, Ohguchi Y, Park ES, Woods DC, et al. Genetic studies in mice directly link oocytes produced during adulthood to ovarian function and natural fertility. *Sci Rep* 2017;7:10011.
28. Yamanaka S. Ekiden to iPS Cells. *Nat Med* 2009;15:1145-8.
29. Irie N, Weinberger L, Tang WW, Kobayashi T, Viukov S, et al. SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate. *Cell* 2015;160:253-68.

30. Woods DC, Tilly JL. Autologous Germline Mitochondrial Energy Transfer (AUGMENT) in Human Assisted Reproduction. *Semin Reprod Med* 2015;33:410-21.
31. Hsieh RH, Au HK, Yeh TS, Chang SJ, Cheng YF, et al. Decreased expression of mitochondrial genes in human unfertilized oocytes and arrested embryos. *Fertil Steril* 2004;81 Suppl 1:912-8.
32. Woods DC, Khrapko K, Tilly JL. Influence of Maternal Aging on Mitochondrial Heterogeneity, Inheritance, and Function in Oocytes and Preimplantation Embryos. *Genes (Basel)* 2018;9. pii: E265.
33. Oktay K, Baltaci V, Sonmezer M, Turan V, Unsal E, 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;22:1612-7.
34. Fakhri MH, Shmoury M, Szeptycki J, de la Cruz DB, Lux C, et al. The AUGMENTSM Treatment: Physician Reported Outcomes of the Initial Global Patient Experience. *JFIV Reprod Med Genet* 2015;3:154.
35. Cohen J, Scott R, Alikani M, Schimmel T, Munné S, et al. Ooplasmic transfer in mature human oocytes. *Mol Hum Reprod* 1998;4:269-80.
36. Barritt JA, Brenner CA, Malter HE, Cohen J. Mitochondria in human offspring derived from ooplasmic transplantation. *Hum Reprod* 2001;16:513-6.
37. Labarta E, de Los Santos MJ, Herraiz S, Escribá MJ, Marzal A, Buigues A, Pellicer A. 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;pii: S0015-0282(18)32082-X.
38. Ylikallio E, Tyynismaa H, Tsutsui H, Ide T, Suomalainen A. High mitochondrial DNA copy number has detrimental effects in mice. *Hum Mol Genet* 2010;19:2695-705.
39. Ludwig KS. [On the question of primordial 420 follicles from the germinal epithelium during puberty in the human ovary]. *Experientia* 1965;21:469-71.
40. Bukovsky A, Svetlikova M, Caudle MR. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:17.
41. Bukovsky A, Gupta SK, Virant-Klun I, Upadhyaya NB, Copas P, et al. Study origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human and rat ovaries. *Methods Mol Biol* 2008;450:233-65.
42. Bhartiya D, Shaikh A, Anand S, Patel H, Kapoor S, et al. Endogenous, very small embryonic-like stem cells: critical review, therapeutic potential and a look ahead. *Hum Reprod Update* 2016;23:41-76.

43. Ravel C, Kazdar N, Leveque J. [Ovarian failure: New treatments in perspective?]. *Gynecol Obstet Fertil.* 2016;44:56-62.

Accepted Manuscript

REFERENCES

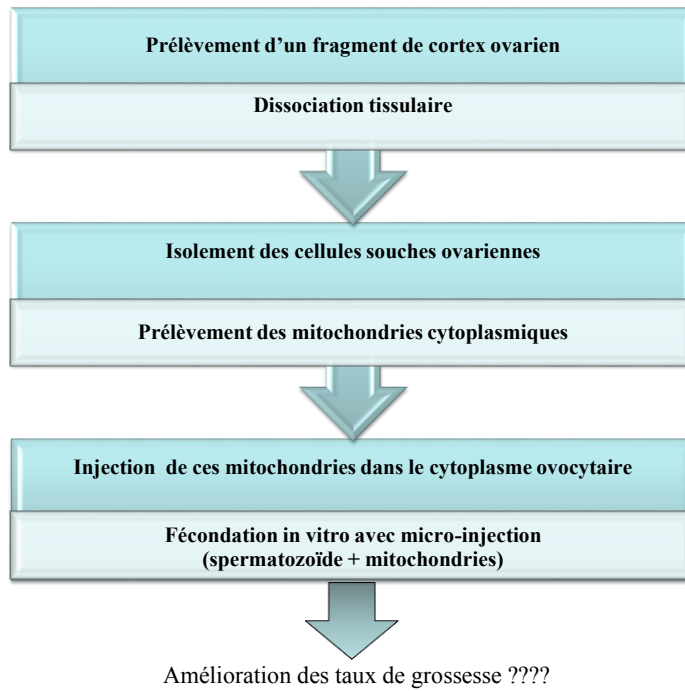
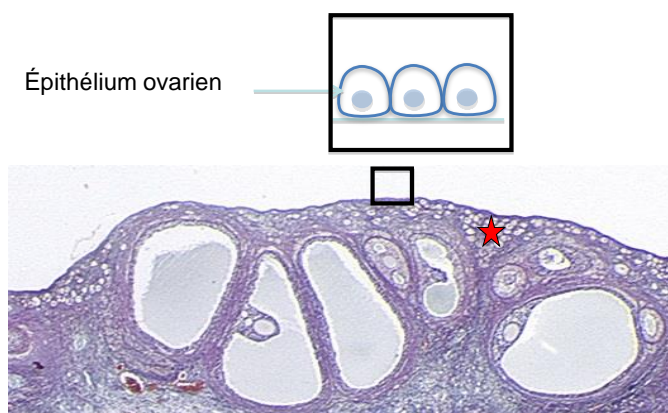
Figure 1 : Modalités de mise en œuvre du traitement AUMENTSM

Figure 2 : Histologie d'une coupe d'ovaire : visualisation de la réserve ovarienne.



★ follicules primordiaux (réserve ovarienne)

Figure 3 : Mise en évidence de la présence de cellules souches dans l'ovaire par l'équipe de J. Tilly.

