



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



FACULTÉ
DE PHARMACIE

UNIVERSITE DE LORRAINE
2021

FACULTE DE PHARMACIE

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 3 septembre 2021, sur un sujet dédié à :

**La longueur des télomères dans les cellules de la granulosa et
dans les leucocytes ; un marqueur de fertilité féminine ?
Revue systématique de la littérature**

pour obtenir

le Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie

par Anne Julie FATTET-SEGURA

née le 12 août 1993

Membres du Jury

Président : M. le Professeur Jean-Louis MERLIN, Professeur des Universités–Praticien Hospitalier

Juges : Mme. le Docteur Isabelle KOSCINSKI, Maître de conférences–Praticien Hospitalier
M. le Professeur Athanase BENETOS, Professeur des Universités–Praticien Hospitalier
M. le Docteur Mikhaël AGOPIANTZ, Maître de conférences – Praticien Hospitalier
M. le Docteur Nicolas MONNIN, Pharmacien Biologiste

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2020-2021

DOYEN

Raphaël DUVAL

Vice-Doyen

Julien PERRIN

Directrice des études

Marie SOCHA

Conseil de la Pédagogie

Présidente, Brigitte LEININGER-MULLER

Vice-Présidente, Alexandrine LAMBERT

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Présidente, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Igor CLAROT

Vice-Président, Raphaël DUVAL

Commission de la Recherche

Présidente, Caroline GAUCHER

Chargés de Mission

Communication

Innovation pédagogique

Référente ADE

Référente dotation sur projet (DSP)

Référent vie associative

Aline BONTEMPS

Alexandrine LAMBERT

Virginie PICHON

Marie-Paule SAUDER

Arnaud PALLOTTA

Responsabilités

Filière Officine

Filière Industrie

Filière Hôpital

Pharma Plus ENSIC

Pharma Plus ENSAIA

Pharma Plus ENSGSI

Cellule de Formation Continue et Individuelle

Commission d'agrément des maîtres de stage

ERASMUS

Caroline PERRIN-SARRADO

Julien GRAVOULET

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Marie SOCHA

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Xavier BELLANGER

Igor CLAROT

Luc FERRARI

François DUPUIS

Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Francine PAULUS

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Pierre LEROY

Philippe MAINCENT

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Jean-Claude BLOCK

Pierre DIXNEUF

Chantal FINANCE

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Pierre LABRUDE

Vincent LOPPINET

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

François BONNEAUX

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Alain NICOLAS
Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

Dominique DECOLIN
Marie-Claude FUZELLIER
Françoise HINZELIN
Marie-Hélène LIVERTOUX
Bernard MIGNOT
Blandine MOREAU
Dominique NOTTER
Francine PAULUS
Christine PERDIAKIS
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Gabriel TROCKLE
Maria WELLMAN-ROUSSEAU
Colette ZINUTTI

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

Section CNU *

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Nathalie THILLY	81	Santé publique et Epidémiologie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique, Audioprothèse
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Hématologie, Biologie cellulaire
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND	87	Eau, Santé, Environnement
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Alexandre HARLE	82	Biologie cellulaire oncologique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Loïc REPPPEL	82	Biothérapie
Marie SOCHA	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Xavier BELLANGER ^H	87	Parasitologie, Mycologie médicale
Emmanuelle BENOIT ^H	86	Communication et Santé
Isabelle BERTRAND ^H	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN ^H	86	Chimie thérapeutique

ENSEIGNANTS (suite)	Section CNU *	Discipline d'enseignement
Cédric BOURA ^H	86	Physiologie
Sandrine CAPIZZI	87	Parasitologie
Antoine CAROF	85	Informatique
Frédérique CHANGEY	87	Microbiologie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Natacha DREUMONT ^H	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Florence DUMARCAY ^H	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS ^H	86	Pharmacologie
Reine EL OMAR	86	Physiologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER ^H	86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD ^H	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT ^H	86	Toxicologie, Sécurité sanitaire
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD ^H	86/01	Droit en Santé
Christophe MERLIN ^H	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER ^H	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Arnaud PALLOTTA	85	Bioanalyse du médicament
Marianne PARENT	85	Pharmacie galénique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL ^H	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET ^H	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Guillaume SAUTREY	85	Chimie analytique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Sabrina TOUCHET	86	Pharmacochimie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER ^H	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT ^H	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIQOU ^H	87	Biochimie et Biologie moléculaire

PROFESSEUR ASSOCIE

Julien GRAVOULET	86	Pharmacie clinique
------------------	----	--------------------

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

^H Maître de conférences titulaire HDR

* Disciplines du Conseil National des Universités :

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruite dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens

De coopérer avec les autres professionnels de santé

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS
EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT
ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR
AUTEUR ».

Remerciements

A Monsieur le Professeur Jean-Louis Merlin, Président du jury,

Pour l'honneur que vous me faites en acceptant de présider ce jury et en jugeant mon travail, pour votre enseignement à la Faculté, je vous remercie et je vous exprime ma plus profonde gratitude.

A Madame le Docteur Isabelle Koscinski, Directrice de Thèse et Membre du jury,

Pour avoir mené la direction de cette Thèse qui me passionne, pour votre implication et le temps que vous y avez consacré. Pour votre enseignement, votre disponibilité et votre aide précieuse, soyez assurée de mon indéfectible reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Athanase Benetos, Membre du jury,

Par votre présence, vous me faites l'honneur de juger mon travail et je vous en remercie. Pour vos connaissances sur le sujet et tous vos travaux, soyez assuré de mon plus profond respect.

A Monsieur le Docteur Mikaël Agopiantz, Membre du jury,

Je te remercie de participer à l'aboutissement de ce travail. Pour la confiance que tu m'as toujours accordée, ton dynamisme et toutes tes idées, je suis heureuse de te compter parmi les membres de mon jury.

A Monsieur le Docteur Nicolas Monnin, Membre du jury,

Pour ton aide dans la réalisation de ce travail et tes précieux conseils, merci d'avoir accepté de juger cette thèse. Pour ta présence depuis le premier jour, pour tes enseignements tant professionnels que personnels et pour ton amitié, les mots ne suffisent pas à t'exprimer ma reconnaissance.

A mes amis et co-internes,

Aux Pharmas, Océane, Lauranne, Louise, Orlane et Gabriel,

Pour toutes ces années à partager ensemble les bancs de la Faculté, mais aussi pour toutes nos soirées et nos fous rires, pour votre présence depuis tant d'années et pour encore tant d'autres.

A toutes les personnes connues lors de mon internat et devenues des amis si chers à mon cœur, Matthieu et Guigui pour notre trio inséparable, **Sophie, Clem, Adèle et Mélissa** pour votre éternelle bonne humeur et votre spontanéité, **Tom, Stéphanie et Marine**, pour votre colloc' complètement déjantée.

A mes co-internes d'un semestre, Stan et Margaux pour la Team Bulle et la chèvre, **Emine** pour ta passion des dossiers, aux gynécos **Louise, Perle, Pauline et Charlotte**, sans vous, mes semestres n'auraient pas été si cools.

A tous les internes qui sont passés en Hémato pendant la réalisation de mon étude, je vous remercie pour votre aide dans la récupération des tubes de NF.

A tous les internes qui sont passés en Bactério pendant que j'étais interne en AMP, je m'excuse de vous avoir harcelé pour récupérer les résultats de spermocultures.

A toute l'équipe du Centre d'AMP de Clamart,

Nelly, Laetitia, Anne, Olivier, Vincent, Ilan, Claire, Bruno, Stéphane, Justine, Noémie, Cathie, Benoit, Sophie, Blandine, Christine, Dominique, Mylène, ...

Malgré la distance avec mes proches, les grèves des transports et le covid, vous m'avez permis de passer un semestre d'exception. J'ai tellement appris à vos côtés et vous influencerez à jamais ma pratique professionnelle, mais également ma vie personnelle au travers des belles rencontres que j'ai pu faire.

A toute l'équipe du Centre d'AMP de Nancy, pour ces années de travail mais aussi de bons moments, assurément mes meilleurs semestres d'interne.

A Catherine pour ta confiance et ton enseignement, **A Caroline** pour ta transmission de *Themis*, de ton bureau et de tes clés,

Aux techniciennes : Florence, Mélanie, Brigitte, Songül, Sylvie, mais aussi **Camille**, pour nos restos, nos soirées bowling ou escape game ...

Vous avez énormément influencé la façon dont j'exercerai mon métier plus tard et la biologiste que je vais devenir. La rigueur, le sens du travail et la précision sont autant de qualités que vous m'avez transmises.

Aux gynécologues, Mikaël, Delphine, Cathy, Nadia, Julien, Jocelyn, Marine, pour la confiance que vous m'accordez dès que vous me demandez un avis et pour tout ce que vous m'avez enseigné durant mon semestre clinique, merci.

Aux sages-femmes, Marie, Catherine et Isabelle, pour tout le travail que vous effectuez et parce que je vous harcèle avec les check-list, merci de toujours avoir le sourire.

Mais également à **Marie-Odile, Yona, Rachel, Coco, Nadia ...**

A ma famille,

A mon Père,

Pour le Papa extraordinaire que tu es, tu as toujours eu mon plus profond respect et mon éternelle admiration. Merci de m'avoir transmis ta rigueur, ton côté scientifique mais aussi toutes tes valeurs. Tu m'as toujours soutenue et tu as toujours tout fait pour que je puisse réaliser mes rêves et atteindre mes objectifs. Pour ta présence lors des 2 jours les plus stressants de ma vie, pour m'avoir fait mon programme de révision de l'internat, pour me forcer à bouger mes fesses et pour une infinité d'autres choses ... il n'existe pas de mots assez forts donc je te dis « Merci ». Tu as fait de moi la personne que je suis aujourd'hui.

A ma Mère,

Pour tout ce que tu m'as appris, pour ta présence et ton amour. Pour m'avoir transmis tant de traits de ta personnalité : ton amour des livres et ta passion pour les voyages. Pour m'avoir appris les tables de multiplication et le vélo, pour avoir parcouru le Mexique en Duo Mère-Fille et avoir changé mes pansements quotidiennement. Pour ton soutien sans faille durant mes études et tes encouragements permanents, pour toute la confiance que tu as en moi et en mes capacités. J'espère te rendre fière.

A ma petite sœur Romane,

Je suis ta première fan, merci pour ton humour et tous nos fous rires. Mais au delà de ça, je suis extrêmement fière de la femme que tu es devenue et de ton parcours professionnel et personnel. Malgré quelques petites engueulades de sœurs, je sais à quel point on tient l'une à l'autre.

A ma famille, cousines, cousins, tantes, oncle ... et à toutes les pièces rapportées,

Merci pour tous ces Noël's, tous ces Anniversaires et pour tous les supers moments passés et à venir.

A ma belle-famille,

Je vous remercie de m'avoir chaleureusement accueillie parmi vous, et merci pour votre soutien.

A mon beau-frère Paul,

Tu fais pour moi la plus belle des choses en rendant ma sœur heureuse. Merci pour ta bonne humeur et ta bienveillance et merci d'aider Clem à battre ses records en course à pied.

A toutes les personnes qui nous ont quittés,

Loin des yeux mais pas loin du cœur. Je vous dédie ce travail.

A mon Chéri,

A Clément, mon Meilleur Ami, mon Mari, l'Amour de ma Vie,

Avec toi les instants seront toujours trop courts et les mots toujours insuffisants pour t'exprimer ce que je ressens. Tu partages ma vie depuis plus de 12 ans, et pourtant je m'étonne encore de t'aimer un peu plus chaque jour.

Tu m'as toujours encouragée dans tout ce que j'ai entrepris, tu as fait preuve d'un soutien et d'un amour sans faille dans tous les moments de notre vie. Depuis notre fameuse partie de ping-pong et ce nouvel an si particulier ... en passant par les bancs de la faculté et à travers le Monde ... jusqu'à notre maison, tu as comblé ma vie de souvenirs tous plus extraordinaires les uns que les autres.

Ton éternelle bonne humeur, ta gentillesse, ta bienveillance et ton magnifique sourire font de toi la personne la plus exceptionnelle que j'ai rencontrée. A jamais à toi, à jamais à moi, à jamais à nous. Je t'aime, tout simplement.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	I
TABLE DES FIGURES.....	IV
TABLE DES TABLEAUX.....	VIII
I. Introduction	1
II. L'insuffisance ovarienne prématurée, dans le contexte international	3
II.1. Physiopathologie.....	3
II.1.1. Ovogenèse et folliculogenèse	3
II.1.1.1. Migration et spécification des cellules germinales primordiales	3
II.1.1.2. Formation des follicules primordiaux.....	4
II.1.2. Folliculogenèse durant le cycle menstruel.....	6
II.1.2.1. La folliculogenèse pré-antrale	6
II.1.2.2. Sélection du follicule dominant.....	8
II.1.2.3. Ovulation	8
II.1.2.4. Modifications ovocytaires pendant la maturation folliculaire	9
II.1.3. Évolution du pool folliculaire	11
II.2. Épidémiologie	12
II.3. Étiologies de l'IOP.....	13
II.3.1. Étiologies génétiques	13
II.3.1.1. Causes cytogénétiques	13
II.3.1.2. Causes moléculaires	14
II.3.2. Étiologies auto-immunes	15
II.3.3. Étiologies infectieuses, iatrogénie et autres causes.....	15
II.4. Symptômes	15
II.5. Diagnostic	16
II.6. Prise en charge	18
II.7. Suivi médical	19
II.8. Conclusion	20
III. Les télomères	21
III.1. Définition	21
III.2. Historique de découverte	21
III.3. Structure	22
III.3.1. ADN télomérique	22
III.3.2. Nucléosomes.....	24
III.3.3. Complexe Shelterin	24
III.3.3.1. TRF1 et TRF2.....	25
III.3.3.2. POT 1 et TPP1	26
III.3.3.3. TIN2	26
III.3.3.4. RAP1	27

III.3.4. Complexe CST	27
III.3.4.1. CDC13/CTC1	27
III.3.4.2. STN1/OBFC1-TEN1.....	28
III.3.5. Régions sous télomériques	28
III.4. Fonctions	28
III.4.1. « End replication problem »	29
III.4.2. La limite d'Hayflick	31
III.4.3. La protection télomérique	32
III.4.3.1. Répression de la voie Ataxia-Telangiectasia-mutated (ATM).....	32
III.4.3.2. Répression de la voie Ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR)	33
III.4.3.3. Répression de PARP1 (« Poly(ADP-ribose) polymerase 1 »).....	33
III.4.3.4. Inhibition de la jonction classique d'extrémités non homologues (c-NHEJ)	33
III.4.3.5. Inhibition de la jonction alternative d'extrémités non homologues (alt-NHEJ)	33
III.4.3.6. Inhibition de la réparation par recombinaison homologue (HDR)	34
III.4.3.7. Répression de l'hyper-résection de l'extrémité 5'	34
III.5. Mécanismes de maintien de la longueur des télomères.....	34
III.5.1. La Télomérase	34
III.5.1.1. Structure	34
III.5.1.2. Fonction	35
III.5.1.3. Réactivation de la télomérase	36
III.5.1.4. Méthodes de mesure	36
III.5.2. « Alternative lengthening of telomeres » (ALT)	37
III.6. Méthodes de mesure de la longueur des télomères.....	39
III.6.1. Q-PCR (« Quantitative polymerase chain reaction »)	39
III.6.2. Analyse TRF (« Terminal restriction fragment »).....	40
III.6.3. Méthodes utilisant la Q-FISH (« Quantitative fluorescence in situ hybridization »)	41
III.6.4. STELA (« Single telomere length analysis »)	42
III.6.5. TeSLA (« Telomere shortest length assay »)	42
III.7. Longueur des télomères	42
III.7.1. Génétique des télomères.....	42
III.7.2. Dynamique des télomères	43
III.7.3. In utero	44
III.7.4. Dans les cellules somatiques.....	45
I.1.2. Dans les spermatozoïdes.....	45
III.7.5. Dans les ovocytes	46
III.7.6. Dans l'embryon	47
III.8. Facteurs affectant la longueur des télomères	50
III.8.1. Le stress oxydatif.....	51
III.8.2. Les facteurs environnementaux.....	52
IV. Pathologies liées à la perturbation de l'homéostasie télomérique	54
IV.1. Pathologies somatiques	54
IV.1.1. Syndromes des télomères courts ou « Short telomere syndromes » (STSs)	54
IV.1.2. Pathologies cardiovasculaires	55
IV.1.3. Diabète de type 2.....	56

IV.1.4. Maladies neurodégénératives	57
IV.1.5. Cancer	57
IV.1.6. Mortalité humaine toutes causes confondues	58
IV.2. Fertilité / Infertilité	59
IV.2.1. Télomères et Reproduction chez l'animal :	59
IV.2.2. Longueur des télomères et fertilité masculine	61
IV.2.3. Longueur des télomères et fertilité féminine	63
IV.2.3.1. Télomères et durée de vie reproductive	64
IV.2.3.2. Syndrome des ovaires polykystiques	64
IV.2.3.3. Endométriose	65
IV.2.3.4. Insuffisance ovarienne prématurée	66
IV.2.3.5. Implantation endométriale de l'embryon	67
IV.2.3.6. Aneuploïdie	68
IV.2.3.7. Fausses couches récurrentes	68
IV.2.3.8. Complications lors de la grossesse	69
IV.2.3.9. Impact des facteurs environnementaux durant la grossesse	71
IV.3. Conclusion	72
V. Télomères et prise en charge en AMP	74
V.1. Télomères dans les spermatozoïdes	74
V.2. Télomères dans les ovocytes	75
V.3. Télomères dans les cellules de la granulosa	75
V.4. Conclusion	78
VI. Les télomères : un biomarqueur de fertilité féminine ?	80
VI.1. Introduction de la revue systématique de la littérature	80
VI.1.1. Activité mitotique gonadique	80
VI.1.2. Les cellules de la granulosa dans la maturation folliculaire	81
VI.1.2.1. Rappels de physiologie	81
VI.1.2.2. Rôle des cellules de la granulosa dans la croissance ovocytaire	83
VI.1.2.3. Rôle des cellules de la granulosa dans la régulation de la maturation méiotique	83
VI.1.3. Longueur des télomères dans les leucocytes : un bon témoin de la longueur des télomères dans le corps entier ?	85
VI.2. Matériels et méthodes	87
VI.3. Résultats de la revue systématique de la littérature	88
VI.3.1. Longueur des télomères	88
VI.3.1.1. Sujets	88
VI.3.1.2. Méthode de mesure	88
VI.3.1.3. Résultats	89
VI.3.2. Activité télomérase	89
VI.3.2.1. Sujets	89
VI.3.2.2. Méthode de mesure	90
VI.3.2.3. Résultats	91
VI.4. Synthèse de la revue systématique de la littérature	91

VI.5. Discussion	92
VI.5.1. Longueur des télomères et activité télomérase dans les cellules de la granulosa	92
VI.5.2. Longueur des télomères dans les leucocytes.....	92
<i>VII. Ouverture : régulation épigénétique de la longueur des télomères et de la télomérase.</i>	96
<i>VIII. Conclusion</i>	98
<i>REFERENCES</i>	99
<i>ANNEXES</i>	113
Annexe 1 : Telomere length in granulosa cells and leukocytes: a potential marker of female fertility? A systematic review of the literature. Fattet, AJ <i>et al.</i>	113
Annexe 2 : Ovarian telomerase and female fertility. Fattet, AJ. <i>et al.</i>	122

LISTE DES ABBREVIATIONS

8-OHdG : 8-dihydrodéoxyguanosine
AC : Adénylate Cyclase
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ALT : « Alternative Lengthening of Telomeres »
AMH : Hormone Antimüllérienne
AMP : Assistance Médicale à la Procréation
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARN : Acide Ribonucléique
AT : Activité Télomérase
ATM : « Ataxia Telangiectasia Mutated »
ATR : « Ataxia telangiectasia and Rad3-related »
AVC : Accident Vasculaire Cérébral
BFGF : « Basic Fibroblast Growth Factor »
BMP : « Bone Morphogenetic Protein »
CDK1 : « Cyclindependent kinase 1 »
CFA : Compte Folliculaire Antral
CLK-2 : « CDC-Like Kinase 2 »
CREB protein : « C-AMP Response Element-binding protein »
CST : Complexe Shelterin
CTC1 : « Conserved Telomere Component 1 »
DDR : « DNA Damage Response »
DMO : Densité Minérale Osseuse
EGF : « Epidermal Growth Factor »
EGFR : « Epidermal Growth Factor »
ELISA : « Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay »
ERK : « Extracellular signal-Regulated protein Kinases »
ESHRE : « European Society of Human Reproduction and Embryology »
FIGLA : « Factor in the germline α »
FIV : Fécondation *In Vitro*
FLIP : « Flice-like inhibitory protein »
FMR : « Fragile X Mental Retardation »
FOXL2 : « Forhead box L2 »
FSH : Hormone Folliculostimulante
FSHR : Récepteur à la FSH
GAR1 : « Glycine and Arginine Rich protein »
GC : Guanine Cytosine
GDF 9 : « Growth differentiation factor 9 »
GMPC : Guanosine MonoPhosphate cyclique
GnRH : « Gonadotrophin Releasing Hormon »
HDR : Recombinaison homologue
hRAP1 : « human Repressor Activator Protein 1 »

hTERT : « human Telomerase reverse transcriptase »
ICSI : Injection Intra-cytoplasmique de Spermatozoïde
IM : ovocyte immature
IMC : Indice de Masse Corporelle
IOP : Insuffisance Ovarienne Prématuration
kb : kilobase
KGF : « Keratinocyte Growth Factor »
LDL : « Low Density Lipoprotein »
LH : Hormone Lutéinisante
LIF : « Leukemia Inhibiting Factor »
MAP : « Mitogen-Activated Protein »
MCM : « MiniChromosome Maintenance protein complexe »
MEN1 : « Multiple Endocrine Neoplasia type 1 »
MPF : « Maturation-Promoting Factor »
MRE11A : « Meiotic Recombination 11 homolog A »
MRN : Mre11/Rad50/Nbs1
mTORC1 : « mammalian Target Of Rapamycin Complex 1 »
NF-κB : « Nuclear Factor-kappa B »
NGF : « Nerve Growth Factor »
NHEJ : Jonction non homologue des extrémités
NHP2 : « Non-Histone chromosom Protein component 2 »
NTRK : « Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase »
NOP10 : « Nuclear Protein 10 »
NOBOX : « Newborn Ovary Homeobox »
NPPC : « Natriuretic peptide precursor type C »
NT : Neutrophine
PARP-1 : « Poly ADP-ribose polymerase 1 »
pb : paire de base
PCB : Polychlorobiphényles
PCR : « Polymerase Chain Reaction »
PDE3A : Phosphodiesterase 3
pmol/L : picomole par Litre
PI3K : « PhosphoInositide 3-Kinase »
PKA : « Protein Kinase A »
POI : « Primary Ovarian Insufficiency »
POT : « Protection of Telomere protein »
PRISMA : « Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses »
Q-FISH : « Quantitative fluorescence *in situ* hybridization »
Q-PCR : « Quantitative polymerase chain reaction »
Q-TRAP : « Quantitative-Telomeric Repeat Amplification Protocol »
RAP1 : « Repressor and Activator Protein 1 »
RCIU : Retard de Croissance Intra-Utérin
RD : « Recruitment domain »
RECQL5 : « RECQ like helicase 5 »

ROS : « Reactive Oxygen Species »
RPM : Rupture Prématinée des Membranes
SET : « Single Embryo Transfer »
SIRT6 : Sirtuin 6
SMAD : « *Small* (worm phenotype) and *MAD* family (Mothers Against Decapentaplegic) »
SNP : « Single Nucleotide Polymorphism »
SOPK : Syndrome des Ovaires Polykystiques
STAG : « Stromal Antigen 3 »
STBP : « Sperm-specific Telomere-Binding Proteins »
STeLA : « Single telomere length analysis »
STS : « Short Telomere Syndromes »
SYCE1 : « Synaptonemal Complex Central Element Protein 1 »
T-circles : « Telomeric-circles »
T-SCE : « Telomeric-sister chromatids exchange »
TA : Thymine Adénine
TBP : « Telomere Binding Protein »
TCAB1 : « Telomerase Cajal Body protein 1 »
TERC : « Telomerase RNA Component »
TERRA : « Telomeric repeat-containing RNAs »
TERT : « Telomerase Reverse Transcriptase »
TeSLA : « Telomere Shortest Length Assay »
TGF- β : « Transforming Growth Factor β »
THOR : « *TERT* hypermethylated oncological region »
THS : Traitement Hormonal Substitutif
TIF : « Telomere dysfunctional induced foci »
TIN2 : « TRF1-interacting nuclear protein 2 »
TL : Longueur des Télomères
TNKS : Tankyrase
TPP1 : « Tripeptidyl-peptidase 1 »
TRAP : « Telomeric Repeat Amplification Protocol »
TRF : « Telomeric Repeat-binding Factor »
UI/L : Unité Internationale par Litre
VG : Vésicule Germinale
XIAP : « X-linked inhibitor of apoptosis »
ZP : Zone Pellucide

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Rôle de la voie de signalisation PI3K dans la survie, l'activation et la perte des follicules primordiaux	5
Figure 2 : Cascade de signalisation mTORC1-KITL des cellules de la granulosa des follicules primordiaux (PfGCs) régulant la voie KIT-PI3K de l'ovocyte	5
Figure 3 : Schéma représentant les facteurs impliqués dans la croissance du follicule primordial au follicule pré-antral	6
Figure 4 : Distribution probable des connexines 43, 45 et 37 au niveau des gap junctions entre l'ovocyte et les cellules du cumulus basée sur des données obtenues chez la souris en microscopie électronique	7
Figure 5 : Effets de la FSH et de la LH sur les cellules de la granulosa et de la thèque respectivement	8
Figure 6 : Voies de signalisation qui régulent l'arrêt et la reprise de la méiose ovocytaire avant (a) et après (b) le pic de LH	10
Figure 7 : Photos au microscope des différents stades de maturation d'un ovocyte : (A) Vésicule germinative (VG), (B) Ovocyte en métaphase I, (C) Ovocyte en métaphase II	10
Figure 8 : Schéma représentatif des différentes étapes de la folliculogenèse ovarienne et des principaux facteurs et voies de signalisation impliqués dans ce processus. (PGCs) Cellules germinales primordiales, (PMF) Follicules primordiaux	11
Figure 9 : Évolution au cours de la vie du pool de cellules germinales	11
Figure 10 : Représentation de la réserve en follicules et des concentrations en hormones ovariennes et hypothalamo-hypophysaires chez une femme jeune en bonne santé (à gauche) et chez une femme en IOP (à droite)	12
Figure 11 : Schéma représentant la localisation chromosomique des gènes probablement associés à l'IOP	14
Figure 12 : FISH sur les séquences télomériques des chromosomes humains en métaphase : visualisation des télomères (à gauche) et pourcentage de fluorescence pour chaque chromosome (à droite)	22
Figure 13 : Les étapes dans la découverte de la biologie des télomères d'après Herrmann <i>et al.</i>	22
Figure 14 : Représentation schématique des télomères et des régions sous télomériques (en vert)	23

Figure 15 : Conformation tridimensionnelle des télomères	23
Figure 16 : Quartet de guanine avec un cation central (à gauche) formant un G-quadruplex selon différentes lignes de pliage (à droite).....	23
Figure 17 : Représentation schématique de la structure de la chromatine et de la distribution des histones au niveau des télomères	24
Figure 18 : Structure d'un télomère humain	24
Figure 19 : Représentation des liaisons ADN/protéine et protéine/protéine dans le complexe Shelterin	25
Figure 20 : Représentation du complexe CST par rapport au télomère et au complexe Shelterin	27
Figure 21 : Structure de la protéine CDC13 avec ses différents sites de liaison	28
Figure 22 : Représentation schématique de la réplication du brin sens ("leading strand") et du brin anti-sens ("lagging strand")	29
Figure 23 : Génération du surplomb 3' simple brin sur le télomère : représentation schématique des 3 étapes étudiées chez la souris	30
Figure 24 : Structure de la télomérase	35
Figure 25 : Protocole historique d'amplification des répétitions télomériques (TRAP)	37
Figure 26 : Représentation schématique des 2 modèles d'allongement alternatif des télomères : (a) T-SCE inégal et (b) Réplication d'ADN dépendante d'une recombinaison homologe ...	38
Figure 27 : Principe de la méthode de mesure des télomères par Q-PCR	39
Figure 28 : (a) Méthodologie de la méthode TRF et (b) exemple de résultats de longueurs de télomères dans des cellules humaines de cancer du sein	40
Figure 29 : Q-FISH télomériques réalisées sur des cellules en interphase et en métaphase ...	41
Figure 30 : Dynamique télomérique au cours du développement humain	44
Figure 31 : Facteurs affectant la longueur des télomères lors des premières étapes du développement d'après Chahine <i>et al.</i>	50
Figure 32 : Facteurs provoquant un raccourcissement des télomères.....	51
Figure 33 : Mécanismes potentiels de l'influence des nutriments sur la longueur des télomères : flèche continue = stimule / flèche en pointillés = provoque si déficit / barre = inhibe	53
Figure 34 : Proportion de patients survivants au cours du temps en fonction de la longueur de leurs télomères	58
Figure 35 : Risque de mortalité toute cause chez les 64 637 participants de l'étude en fonction de la longueur de leurs télomères	58

Figure 36 : Morphologie de zygotes (A,PN) avec davantage de zygotes à 1 seul PN chez les Tr-/-, d'embryons clivés (A,24h) avec un taux de fragmentation supérieur chez les TR-/-, et de blastocystes (B) de souris (TR-/-) <i>versus</i> témoins (WT)	60
Figure 37 : Longueur des télomères dans les spermatozoïdes de patients avec normozoospermie <i>versus</i> ceux de patients avec oligozoospermie	62
Figure 38 : Impact du statut télomérique sur le potentiel de fertilité masculine	63
Figure 39 : Corrélation entre la durée de vie reproductive (RLS) et la longueur des télomères dans les leucocytes	64
Figure 40 : Comparaison de la longueur relative des télomères dans les leucocytes (A) et des les cellules de la granulosa (B) chez des contrôles <i>versus</i> femmes avec SOPK (PCOS)	65
Figure 41 : (A) Longueur moyenne des télomères au niveau de l'endomètre chez des contrôles <i>versus</i> patientes endométriosiques durant la fenêtre d'implantation (WOI) et à la fin de la phase lutéale (LLP)	66
Figure 42 : Longueur des télomères au niveau de l'endomètre : (A) en fonction de la phase du cycle menstruel (B) en fonction des taux sanguins en progestérone	67
Figure 43 : Activité télomérase endométriale lors de la fenêtre d'implantation dans les cas de sac gestationnel vide, de fausse couche, d'échec d'implantation récurrents <i>versus</i> des contrôles fertiles	68
Figure 44 : Longueur des télomères dans les leucocytes de femmes ayant des fausses couches récurrentes <i>versus</i> contrôles	69
Figure 45 : Longueur des télomères dans le placenta en cas de naissance à terme ("Term birth"), de naissance prématurée sans rupture des membranes ("PTB with no ROM"), de naissance prématurée avec rupture des membranes (pROM) et de mortinaissance (SB)	70
Figure 46 : Homéostasie télomérique placentaire entre RCIU (IUGR) et contrôles : (A) Longueur des télomères , (B) Activité télomérase, (C) Phénomène de capture télomérique (149)	70
Figure 47 : Homéostasie des télomères placentaires chez des patientes diabétiques (en noir) <i>versus</i> contrôles (en blanc) (A) Longueur des télomères , (B) Activité télomérase, (C) Phénomène de capture télomérique	71
Figure 48 : Implication des anomalies des télomères dans les problèmes de fertilité féminine	72
Figure 49 : Comparaison de la maturité ovocytaire et de la longueur des télomères chez les femmes de moins de 38 ans et chez celles de plus de 38 ans	76

Figure 50 : Comparaison de la fécondation des ovocytes en fonction de la longueur des télomères chez les femmes de moins de 38 ans et chez celles de plus de 38 ans	76
Figure 51 : Comparaison entre le développement embryonnaire à J2 et à J3 en fonction de la longueur des télomères chez les moins de 38 ans et chez les plus de 38 ans	77
Figure 52 : Résultats des études de Wang et Chen de 2011 (à gauche) : groupe A n=17, groupe B n=16, groupe C n=14, groupe C= 9, et de l'étude de 2014 (à droite) retrouvant une augmentation des taux de grossesses avec l'augmentation de l'activité télomérase dans les cellules de la granulosa.....	78
Figure 53 : Folliculogenèse humaine et nombre de cellules de la granulosa	81
Figure 54 : Schéma récapitulatif de la maturation du follicule d'après Collado <i>et al.</i>	82
Figure 55 : Projections transzonales (TZP) des cellules de la granulosa au travers de la zone pellucide et formation de jonctions adhérentes et/ou de GAP jonctions avec la membrane plasmique de l'ovocyte	83
Figure 56 : Schéma représentatif des mécanismes moléculaires à l'origine de l'inhibition de la reprise de la méiose ovocytaire	84
Figure 57 : Schéma représentatif des mécanismes moléculaires impliqués dans la reprise de la méiose ovocytaire.....	84
Figure 58 : Longueur des télomères dans les leucocytes (LTL) et dans les spermatozoïdes (STL) à gauche ; Corrélation entre la longueur des télomères dans les leucocytes et dans les spermatozoïdes à droite	86
Figure 59 : Longueur des télomères dans les leucocytes et dans les cumulus en fonction de l'âge	86
Figure 60 : Diagramme PRISMA pour l'identification et la sélection des études.....	87
Figure 61 : Exemple de résultats d'activité télomérase obtenus après protocole TRAPeze et révélation	90
Figure 62 : "353 CpG epigenetic clock" dans les cellules du sang et du cumulus pour prédire l'âge chronologique	96

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Prévalence de l'insuffisance ovarienne prématurée en fonction de l'ethnie	13
Tableau II : Résumé des conséquences à long terme de l'insuffisance ovarienne prématurée, d'après Podfigurna –Stoppa <i>et al.</i> J Endocrinol Invest 2016	16
Tableau III : Tableau récapitulatif des voies de réparation de l'ADN qui sont inhibées par le complexe Shelterin, la sous-unité impliquée et le mécanisme d'action	32
Tableau IV : Résumé de l'évolution de la longueur des télomères et de l'activité télomérase dans les cellules humaines	49
Tableau V : Syndromes des télomères courts, gènes associés et mode de transmission	55
Tableau VI : Caractéristiques des sujets en IOP et des contrôles dans les différentes études .	88
Tableau VII : Résultats de la longueur des télomères	89
Tableau VIII : Caractéristiques des sujets étudiés.....	89
Tableau IX : Résultats de la mesure de l'activité télomérase	91
Tableau X : Tableau de synthèse des différentes études (cases grisées pour les études retrouvant des télomères plus longs chez les femmes IOP).....	91

I. Introduction

Depuis une trentaine d'années, dans la plupart des pays industrialisés, les femmes deviennent mères à un âge de plus en plus avancé, alors même qu'elles ont conscience de la diminution de la fertilité avec l'âge. Ainsi beaucoup seraient favorables à une préservation de fertilité dite « de sécurité » afin de s'assurer de pouvoir disposer d'un stock d'ovocytes de femme « jeune » pour pouvoir devenir mère le jour où elle le décideront (1).

A l'image de l'Espagne, beaucoup de pays européens pratiquent des autoconservations ovocytaires hors raisons médicales. En France, la loi de Bioéthique de 2011 interdisait à une femme d'avoir recours à la congélation de ses propres ovocytes, en dehors de deux situations : avant traitement susceptible d'altérer la fertilité et pour les donneuses d'ovocytes sans enfants. La préservation de fertilité à visée sociétale était l'un des principaux sujets débattus lors de la révision de la loi de Bioéthique en 2019. Le 29 juin 2021 a eu lieu à l'Assemblée Nationale le vote définitif du projet de loi de Bioéthique qui rend possible, pour les femmes comme pour les hommes, l'autoconservation des gamètes, en dehors de tout motif médical.

La fertilité féminine est fortement corrélée à la quantité et à la qualité des follicules ovariens. Le pool de follicules primordiaux est établi durant la vie fœtale et résulte d'une prolifération intensive des ovogonies et des cellules somatiques qui les entourent. L'atrésie folliculaire commence avant la naissance et se termine à la ménopause. La qualité des follicules est corrélée à leur capacité à ovuler un ovocyte fécondable qui donnera un embryon et aboutira à la naissance d'un enfant en bonne santé. La folliculogénèse implique une prolifération intense des cellules de la granulosa durant la maturation folliculaire. La quantité et la qualité des follicules est largement dépendante de la capacité des cellules folliculaires à proliférer ; ainsi, une anomalie dans la prolifération de ces cellules pourrait résulter dans une altération de la qualité folliculaire et/ou de la survie folliculaire menant finalement à un raccourcissement de la vie reproductive (2).

De nos jours, le diagnostic d'insuffisance ovarienne prématurée (IOP) est en constante augmentation. Les taux en hormone antimüllérienne (AMH) ainsi que le compte folliculaire antral (CFA) constituent des éléments partiellement prédictifs du résultat en Assistance Médicale à la Procréation (AMP) chez les patientes qui consultent pour infertilité, mais il n'existe pas de marqueur qui permettrait d'alerter une femme jeune du risque de développer une IOP (3).

Dans ce contexte, il serait intéressant de disposer d'un nouveau marqueur de fertilité féminine, prédictif de la survenue d'une IOP. Au cours des dix dernières années, plusieurs études ont suggéré que la longueur des télomères (LT) pourrait être corrélée à la durée de la vie reproductive et ainsi ; des télomères courts pourraient être un marqueur du risque de développer une insuffisance ovarienne prématurée.

L'étude de la littérature réalisée pour cette thèse d'exercice est également à l'origine des deux publications suivantes :

- Telomere length in granulosa cells and leukocytes: a potential marker of female fertility? A systematic review of the literature. Fattet, AJ., Toupance, S., Thornton, S.N., Monnin N., Guéant J-L., Benetos A., Koscinski I. . *J Ovarian Res* 13,96(2020). <https://doi.org/10.1186/s13048-020-00702-y>
- Ovarian telomerase and female fertility. Fattet, AJ., Toupance, S., Thornton, S.N., Benetos A., Guéant J-L., Koscinski I. *Biomedicines* 2021, 9(7), 842. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070842>

Ainsi, via la mesure de la longueur des télomères, il serait possible de mieux identifier les patientes à risque de développer cette pathologie et de leur conseiller de réaliser une préservation de leur fertilité.

II. L'insuffisance ovarienne prématurée, dans le contexte international

Le premier cas rapporté d'insuffisance ovarienne prématurée a été décrit en 1942 par Fuller Albright, un endocrinologue américain. C'est un syndrome clinique caractérisé par une perte de la fonction ovarienne avant 40 ans, qui se manifeste par une oligoménorrhée ou une aménorrhée, avec des taux élevés en gonadotrophines et des taux faibles en estradiol (3).

A l'heure actuelle, il n'existe pas de test permettant de prédire le risque pour une femme de développer une IOP, à l'exception de la recherche de quelques mutations connues pour être à l'origine de cette pathologie (voir p.14 et figure 11). Il n'existe également pas de mesures préventives vis à vis de l'insuffisance ovarienne prématurée idiopathique, en dehors de l'option palliative que constitue la préservation de fertilité (3).

II.1. Physiopathologie

La présence de cycles ovulatoires mensuels est essentielle pour la santé et la reproduction chez la femme adulte. Outre la production de gamètes féminins, la fonction ovarienne est vitale pour la synthèse d'hormones sexuelles. Celles-ci sont nécessaires au développement puis au maintien dans un état fonctionnel du tractus génital, ainsi qu'à la minéralisation osseuse, au bon fonctionnement de l'appareil cardiovasculaire, etc. L'unité fonctionnelle de l'ovaire est le follicule (4).

II.1.1. Ovogenèse et folliculogenèse

II.1.1.1. Migration et spécification des cellules germinales primordiales

Originaires de la partie antérieure de l'épiblaste, les cellules germinales primordiales (CGP) migrent en dehors de l'embryon à la 3^{ème} semaine de développement jusqu'à la racine de l'allantoïde, à l'écart des facteurs de différenciation de la gastrulation. Les CGP regagnent la partie interne de l'embryon en migrant dans le mésoderme extra puis intra-embryonnaire, le mésentère primitif postérieur, pour rejoindre les crêtes génitales. Lorsqu'elles atteignent la gonade primitive, leur activité transcriptionnelle change : des gènes de pluripotence sont réprimés et l'expression de gènes spécifiques du sexe sont activés. Ainsi, chez la femme, les CGP se différencient en ovogonies. Une fois différenciées, elles prolifèrent avec une cytodierèse incomplète, créant ainsi des *syncytia* de cellules connectées par des ponts intercellulaires au travers desquels les organites et les mitochondries peuvent transiter. Les ovogonies entament une méiose mais sont bloquées au stade diplotène de la première division (2).

II.1.1.2. Formation des follicules primordiaux

Une couche mince de cellules somatiques aplaties (pré granulosa) entoure chaque ovocyte lors de ce processus. Plusieurs facteurs et voies de signalisation interviennent dans la formation du follicule (2) :

- Le facteur de transcription FIGLA (« Factor in the germline α ») : pour l'initiation de la formation du follicule
- Le facteur de transcription FOXL2 (« Forkhead box L2 ») : pour le développement des cellules de la pré granulosa autour de l'ovocyte
- Des membres de la superfamille du TGF- β : l'activine A qui augmente le nombre de follicules primordiaux, l'AMH qui inhibe leur formation, Gremlin un antagoniste du BMP qui affecte l'assemblage des follicules
- Des neurotrophines (NTs) et leur récepteur tyrosine kinase (NTRK) comme le NGF (« Nerve growth factor ») et son récepteur NTRK1 dont l'absence est associée à une diminution du pool folliculaire
- La voie de signalisation KIT/KITL dont l'inhibition provoque une augmentation du nombre d'ovocytes
- La voie de signalisation Notch : les ligands Jagged1 et 2 sont exprimés dans les cellules germinales et leurs récepteurs Notch 1 et 2 dans les cellules de la pré-granulosa et sont nécessaires à la folliculogénèse
- Des hormones stéroïdiennes avec une action inhibitrice des estrogènes et de la progestérone sur la folliculogénèse

Malgré des études contradictoires (5), la théorie consensuelle actuelle soutient que les cellules germinales féminines ne se multiplient pas ni ne se différencient après la naissance et que les follicules primordiaux constitués *in utero* constituent le pool initial représentant la réserve ovarienne (2).

Trois destins sont possibles pour les follicules primordiaux : (1) rester quiescent, (2) être activé et rejoindre le pool de follicules en croissance et ensuite entrer en atresie ou être ovulé (3) s'atresier à l'état quiescent. La plupart des follicules primordiaux restent dormants et seulement une petite sous-population est activée à chaque cycle menstruel. La transition du follicule primordial au follicule primaire est marquée par des changements de la morphologie des cellules folliculaires qui deviennent cubiques et une initiation de la maturation ovocytaire (2,6).

Plusieurs études ont mis en évidence des signaux inhibiteurs provenant de l'ovocyte lui-même, mais également des cellules somatiques de la granulosa permettant de maintenir le pool de follicules primordiaux dans un état de quiescence (2).

Tout d'abord, certains signaux inhibiteurs intra ovocytaires bloquent l'activation du follicule primordial. Le plus important identifié inhibe la voie PI3K -AKT dont le niveau d'activation influence le destin des follicules. Une sur activation de cette voie entraine une activation du follicule primordial alors qu'une inhibition totale de la cascade PI3K mène à son atresie. Une signalisation PI3K optimale maintient le follicule primordial en quiescence (Figure 1) (2,6).

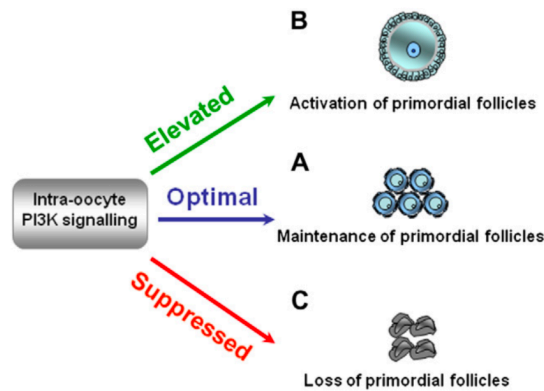


Figure 1 : Rôle de la voie de signalisation PI3K dans la survie, l'activation et la perte des follicules primordiaux (6)

D'autres études ont mis en évidence des signaux provenant cette fois des cellules de la granulosa. Par exemple, l'inhibition de la voie mTORC1 bloque leur différenciation, maintenant ainsi le follicule en quiescence. En revanche, une activation de la voie mTORC1 mène à la synthèse de KITL qui stimule la voie KIT-PI3K au niveau de l'ovocyte et induit l'activation du follicule primordial (Figure 2) (7).

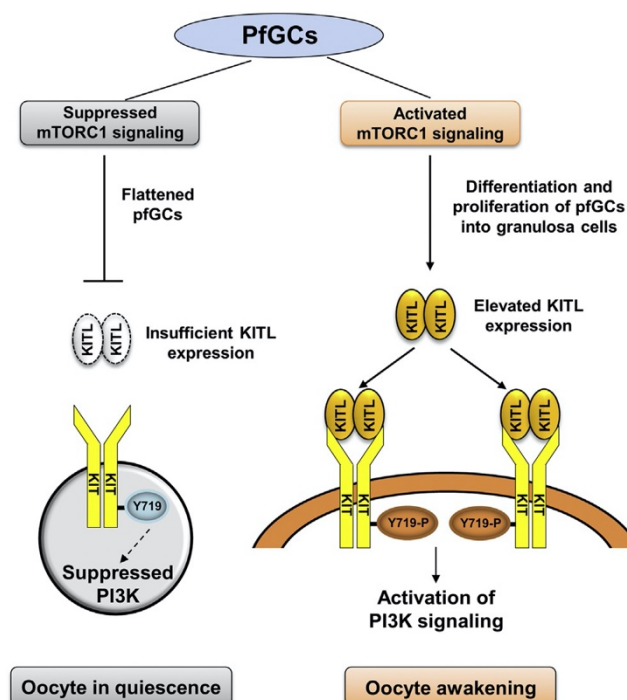


Figure 2 : Cascade de signalisation mTORC1-KITL des cellules de la granulosa des follicules primordiaux (PfGCs) régulant la voie KIT-PI3K de l'ovocyte (7)

D'autres facteurs paracrines sont également impliqués comme le LIF (« Leukemia inhibiting factor »), BFGF (« Basic fibroblast growth factor »), KGF (« Keratinocyte growth factor ») etc. Un autre facteur important qui inhibe l'activation des follicules primordiaux est l'AMH exprimée par les cellules de la granulosa des follicules en croissance (2).

II.1.2. Folliculogenèse durant le cycle menstruel

II.1.2.1. La folliculogenèse pré-antrale

A chaque cycle, des follicules issus du pool quiescent sont recrutés. La transition du follicule primordial au follicule primaire est caractérisée par un changement morphologique des cellules de la granulosa qui passent d'aplaties à cubiques, le volume de l'ovocyte étant lui, peu augmenté. Puis, lors du développement en follicule secondaire, le volume du follicule croît davantage ainsi que celui de l'ovocyte dans une moindre mesure. Les cellules de la granulosa prolifèrent et une couche de cellules de la thèque apparaît pour former la membrane basale autour du follicule. Ces étapes de croissance folliculaire sont dépendantes des gonadotrophines mais requièrent également une communication bidirectionnelle entre l'ovocyte et les cellules somatiques folliculaires (2).

La plupart des molécules impliquées dans cette signalisation font partie de la super famille du TGF- β et se lient à des récepteurs kinases qui initient la translocation nucléaire de protéines SMAD activant ainsi la transcription de gènes cibles. En fonction de la voie de signalisation, on peut diviser ces protéines en 2 groupes : les BMPs qui activent SMAD1-5-8 et activines/ TGF- β s/GDF9 qui activent SMAD 2-3. Ces molécules sont produites par différents types cellulaires : les cellules de la granulosa produisent les activines, les cellules thécales BMP4 et 7, le TGF- β est produit par les deux et les ovocytes expriment GDF9 et BMP15. Le TGF- β stimule la prolifération des cellules de la granulosa et la croissance du follicule ainsi que la production de progestérone et la synthèse des estrogènes induite par la FSH. Le GDF9 et le BMP15 permettent la différenciation des cellules de la thèque et leur absence bloque le follicule au stade primaire (Figure 3) (8).

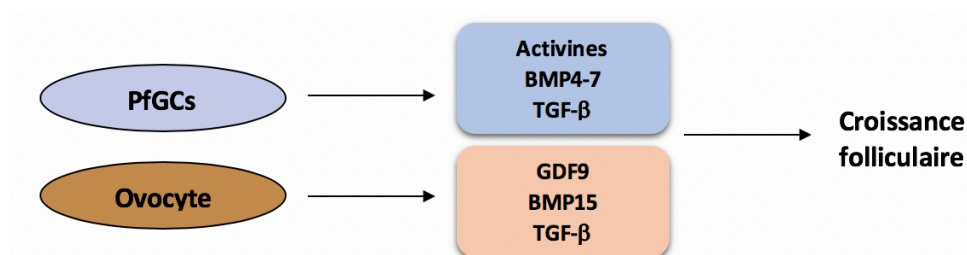


Figure 3 : Schéma représentant les facteurs impliqués dans la croissance du follicule primordial au follicule pré-antral

Cette signalisation paracrine utilise les jonctions communicantes entre cellules folliculeuses et ovocyte, les « jonctions GAP ». Ces jonctions sont formées de connexines organisées en canaux intercellulaires. La connexine 37 est présumée comme étant la seule apportée par l'ovocyte (9).

La connexine 43 est essentielle pour les communications des cellules folliculaires entre elles et au travers de la zone pellucide (ZP) avec l'ovocyte en association hétérotypique avec la connexine 37. Ces interactions sont observables au niveau des microvillosités ovocytaires (mv), à la surface de l'ovocyte ou dans des invaginations de la membrane plasmique. La connexine 45 est un constituant mineur de certaines jonctions gap. D'autres connexines sont associées mais leur localisation doit être encore précisée (Figure 4) (9).

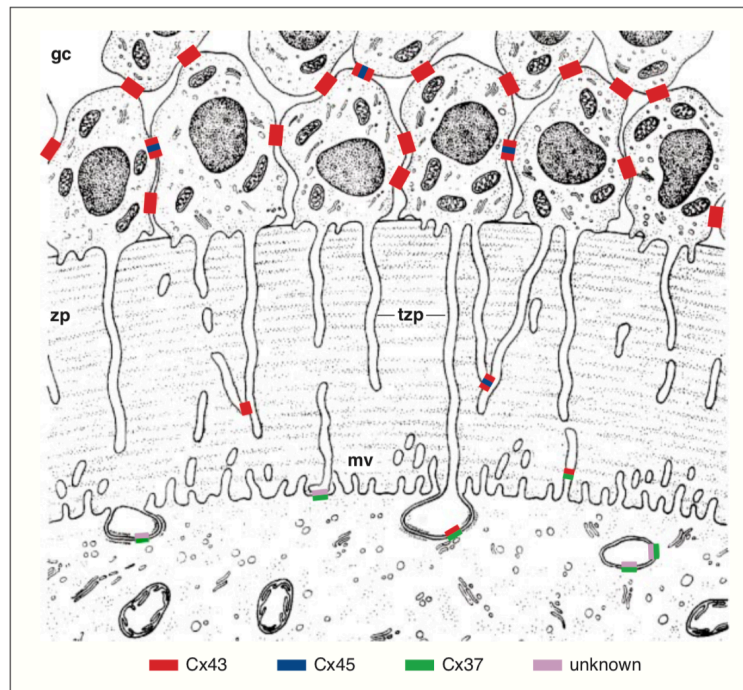


Figure 4 : Distribution probable des connexines 43, 45 et 37 au niveau des gap junctions entre l'ovocyte et les cellules du cumulus basée sur des données obtenues chez la souris en microscopie électronique (9)

Le follicule primaire devient secondaire lorsque les cellules folliculeuses prolifèrent et forment plusieurs couches de granulosa autour de l'ovocyte, toujours bloqué au stade diplotène de première division méiotique (10).

Dans l'épaisseur de la granulosa, de petites cavités liquidiennes appelées Corps de Call et Exner, se forment puis confluent pour n'en former qu'une seule, appelée antrum : le follicule devient ainsi le follicule antral. L'antrum sépare ainsi deux types cellulaires différents dans les cellules de la granulosa ; les cellules du cumulus adjacentes à l'ovocyte et les cellules murales périphériques qui délimitent le follicule et constituent la principale source d'hormones stéroïdiennes (10).

A ce stade, la croissance du follicule est stimulée par les gonadotrophines pituitaires, la FSH et la LH. La FSH stimule la prolifération des cellules de la granulosa, leur production d'estradiol et leur expression du récepteur à la LH. Par sa liaison à son récepteur couplé à une protéine G (FSHR), la FSH stimule la production d'AMPc par l'adénylate cyclase. L'AMPc active la PKA qui passe du cytoplasme au noyau de la cellule où elle phosphoryle et active le facteur de transcription CREB (« cAMP-response element-binding protein ») qui active l'expression de plusieurs gènes dont celui de l'aromatase et celui du récepteur à la LH (Figure 5) (10).

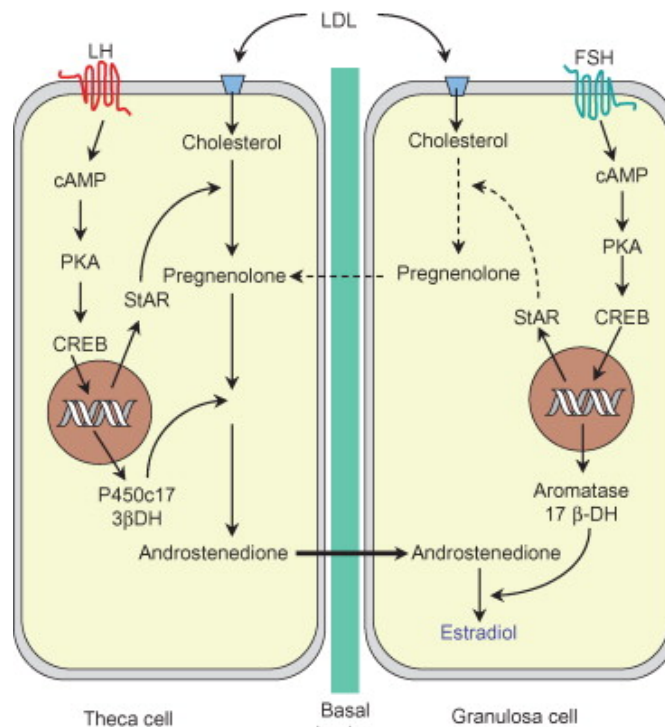


Figure 5 : Effets de la FSH et de la LH sur les cellules de la granulosa et de la thèque respectivement (11)

II.1.2.2. *Sélection du follicule dominant*

La plupart des follicules antraux vont dégénérer et chaque mois, seulement l'un d'entre eux se développera jusqu'au stade pré-ovulatoire. Ce dernier est celui dont les cellules murales exprimeront les premières le plus de récepteurs à la LH. Le follicule dominant peut ainsi répondre au pic de LH pré-ovulatoire. Il est aussi celui qui produit le plus d'estrogènes, à l'origine d'un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de FSH (12).

Sous l'influence de la FSH, les cellules de la granulosa expriment des facteurs anti-apoptotiques comme l'« X-linked inhibitor of apoptosis » (XIAP) et FLIP (« Flice-like inhibitory protein »). En l'absence de FSH, ces cellules expriment le récepteur d'apoptose FASR et son ligand FASL. Grâce à l'acquisition précoce et importante de récepteurs à LH, le follicule dominant est capable de continuer à croître malgré la baisse de la FSH (due en partie au rétrocontrôle exercé par l'œstradiol sur la sécrétion de FSH). Les autres follicules ne sont pas capables de le faire (12).

II.1.2.3. *Ovulation*

La production d'estrogènes par les cellules de la granulosa du follicule dominant augmente, ce qui provoque une accélération des pulses de GnRH (« Gonadotropin releasing hormone ») au niveau de l'hypothalamus et déclenche une sécrétion brève et massive de LH. Ce pic hormonal engendre une séquence d'événements aboutissant à l'ovulation du follicule dominant. La liaison de la LH à son récepteur couplé à une protéine G entraîne, dans les cellules folliculeuses, l'activation de 3 voies essentielles pour l'ovulation : AC/cAMP/PKA, PI3K/AKT et RAS. De plus, les cellules folliculeuses sécrètent des facteurs EGF-like aboutissant au clivage protéolytique de la matrice extracellulaire permettant la rupture de la paroi folliculaire (13).

La liaison des facteurs EGF-like à leur récepteur, l'EGFR, active celui-ci et initie la voie ERK1/2 qui induit l'expression de gènes cibles responsables de l'expansion du cumulus, la stéroïdogénèse, la maturation ovocytaire et l'ovulation (13).

Ces événements comprennent :

- La levée de l'inhibition folliculaire sur l'ovocyte et la reprise de la méiose ovocytaire : l'ovocyte termine sa première division méiotique et enchaîne immédiatement avec la deuxième division pour se bloquer en métaphase de deuxième division méiotique
- L'expansion du cumulus, la rupture des jonctions entre cellules de la granulosa périphérique et cellules du cumulus oophorus
- L'augmentation du volume de l'antrum
- La libération du complexe cumulo-ovocytaire contenant l'ovocyte en métaphase de deuxième division méiotique

II.1.2.4. *Modifications ovocytaires pendant la maturation folliculaire*

Les ovogonies des follicules primordiaux ont débuté leur prophase de première division méiotique et sont bloquées au stade diplotène. A ce stade, les ovocytes sont morphologiquement caractérisés par un large noyau appelé vésicule germinative (VG). Durant le processus de croissance folliculaire, l'ovocyte grossit en taille mais reste au stade de VG. Cet arrêt en prophase de 1^{ère} méiose est dû à la faible activité du MPF (« Maturation-promoting factor ») composé de CDK1 (« Cyclindependent kinase 1 ») et de la cycline B. Ce complexe régule la transition G2/M du cycle cellulaire. La répression de l'activité du MPF est due à la forte concentration cytoplasmique ovocytaire en AMPc (14).

Cet AMPc est produit essentiellement par les cellules folliculeuses et fournit à l'ovocyte au travers des jonctions GAP, mais une production par l'ovocyte lui-même est également évoquée. Les concentrations en AMPc sont également maintenues à un taux élevé par l'inhibition de la PDE3A, normalement responsable de sa dégradation. Le NPPC (« Natriuretic peptide precursor type C »), synthétisé par les cellules murales de la granulosa, stimule la guanylate cyclase de NPR2 (« Natriuretic peptide receptor 2 ») des cellules du cumulus. Le GMPc ainsi synthétisé transite par les jonctions gap et inhibe la phosphodiesterase 3A. L'activation de CDK1 dépend donc de la réduction de l'AMPc intra-ovocytaire. Le pic de LH mène à la déstructuration des connexines, ce qui met fin au transit dans les jonctions gap, et donc à l'entrée de l'AMPc et du GMPc dans l'ovocyte. L'hydrolyse du second messager par la PDE3A reprend, la PKA est inactivée par la baisse des concentrations en AMPc et elle n'inhibe plus la phosphatase Cdc25B qui déphosphoryle CDK1 et l'active (Figure 6) (14).

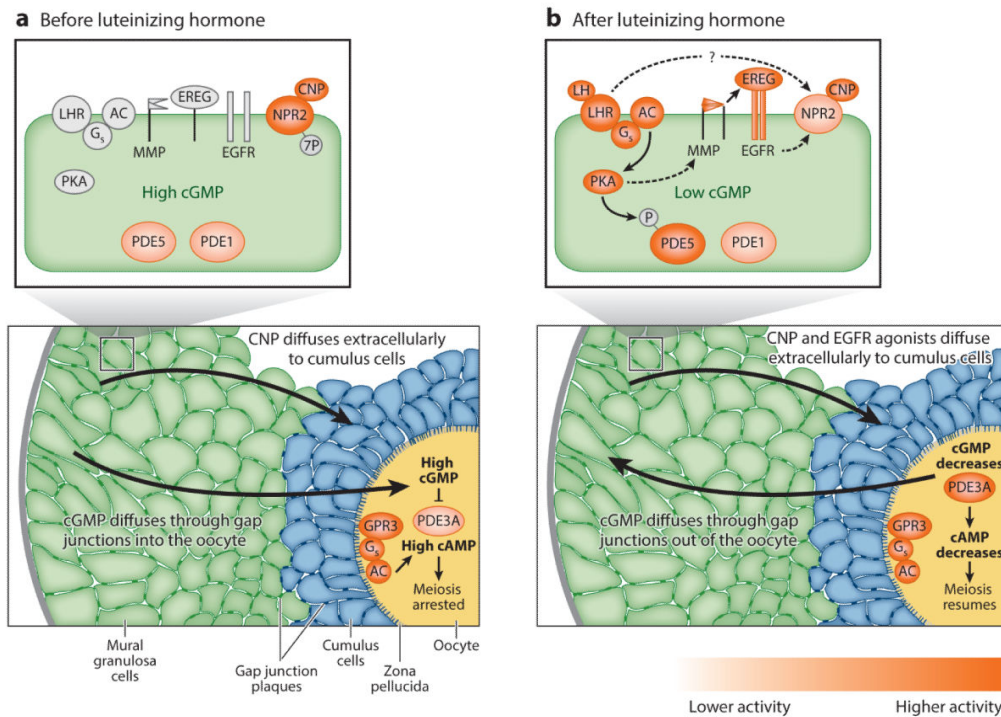


Figure 6 : Voies de signalisation qui régulent l'arrêt et la reprise de la méiose ovocytaire avant (a) et après (b) le pic de LH (14)

Chez les femmes en âge de procréer, à chaque cycle, un ovocyte reprend sa méiose, expulse son premier globule polaire et entame une deuxième méiose jusqu'en métaphase (Figure 7). A ce stade, la méiose est de nouveau arrêtée et ne s'achèvera que s'il y a fécondation et donc expulsion du deuxième globule polaire (2).

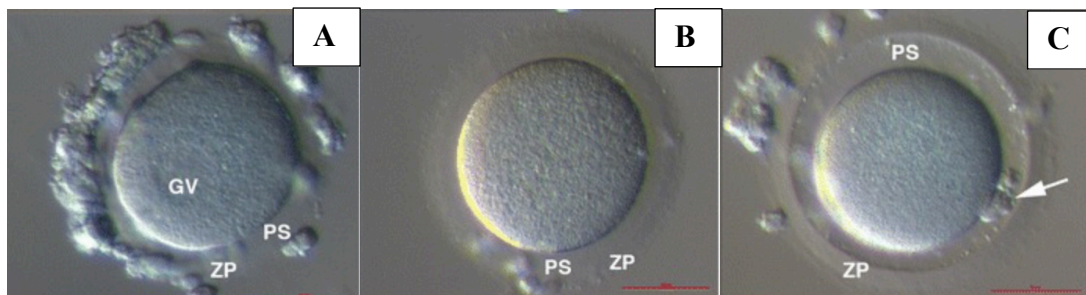


Figure 7 : Photos au microscope des différents stades de maturation d'un ovocyte : (A) Vésicule germinative (VG), (B) Ovocyte en métaphase I, (C) Ovocyte en métaphase II (15)

Une fois que l'ovocyte a été ovulé, les cellules restantes de la granulosa et de la thèque subissent une différenciation terminale pour former le corps jaune. Ce corps jaune est essentiel au maintien de la grossesse, principalement via sa sécrétion de progestérone. S'il n'y a pas de fécondation, le corps jaune dégénère (2).

La folliculogenèse est résumée dans la Figure 8 ainsi que les diverses voies de signalisation impliquées à chacune des étapes.

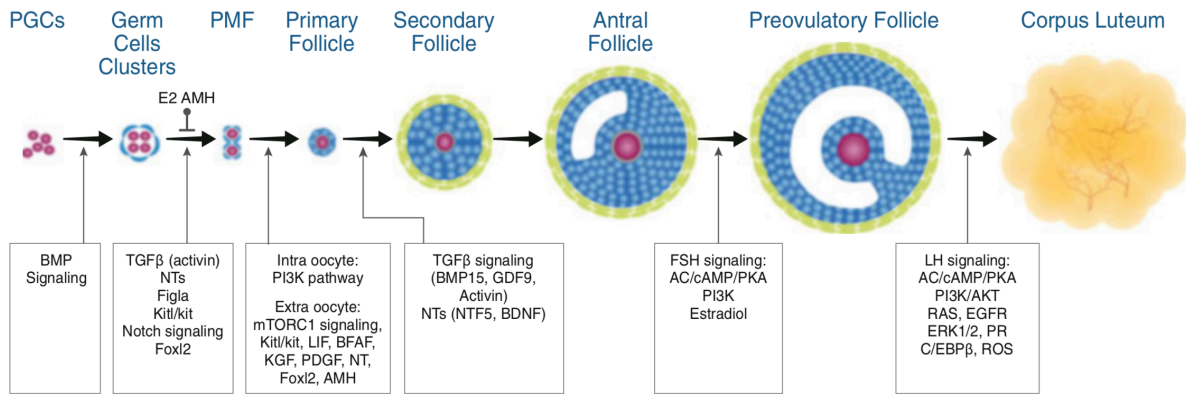


Figure 8 : Schéma représentatif des différentes étapes de la folliculogénèse ovarienne et des principaux facteurs et voies de signalisation impliqués dans ce processus. (PGCs) Cellules germinales primordiales, (PMF) Follicules primordiaux (2)

II.1.3. Évolution du pool folliculaire

Lorsqu'à la 3^{ème} semaine de gestation, elles migrent de l'épiblaste à la région allantoïdienne, les CGP sont approximativement une centaine. Lorsqu'à partir de la sixième semaine de gestation, elles rejoignent les gonades indifférenciées, elles prolifèrent massivement et passent ainsi de 10 000 à 600 000 de la 6^{ème} à la 8^{ème} semaine. Grâce à leur forte activité mitotique, on dénombre environ 6 millions de cellules germinales à la 20^{ème} semaine. Le nombre de follicules ovariens atteint donc son maximum à 5 mois *in utero* puis décline progressivement en raison de l'arrêt des mitoses ovogoniales et de l'atrésie massive de follicules primordiaux. Sur le million de cellules germinales présentes à la naissance, il en restera seulement 300 000 à 400 000 à la puberté. Cette diminution, continue et physiologique, du nombre de follicules se poursuit ensuite tout au long de la vie. La plupart des follicules entrent donc en atrésie et moins d'1% (300) vont être ovulés avant la ménopause qui survient dès lors qu'il reste moins de 1000 follicules environ dans les ovaires (Figure 9) (8).

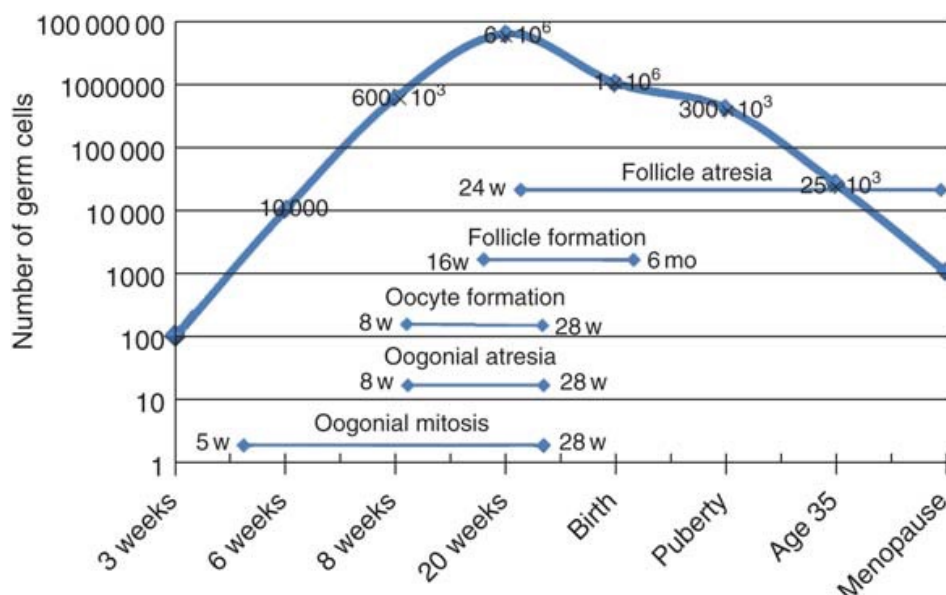


Figure 9 : Évolution au cours de la vie du pool de cellules germinales (8)

Lorsqu'il survient vers 50 ans, le déclin de la fonction ovarienne chez la femme est un phénomène physiologique : il s'agit de la ménopause. En revanche, l'insuffisance ovarienne prématurée est caractérisée par une déplétion folliculaire (primaire ou secondaire) ou par un blocage de la maturation folliculaire avant 40 ans (4).

La Figure 10 représente l'influence du pool de follicules sur les concentrations en hormones ovariennes et hypothalamo-hypophysaires. Sur le plan hormonal, les patientes souffrant d'IOP présentent une élévation des gonadotrophines sécrétées par l'hypophyse (LH et FSH) associée à de faibles taux d'estradiol, d'inhibine B et d'AMH. Il s'agit donc d'un hypogonadisme hypergonadotrope par levée du feedback négatif, principalement de l'inhibine B mais aussi de l'estradiol, sur l'hypophyse et l'hypothalamus respectivement (4,16).

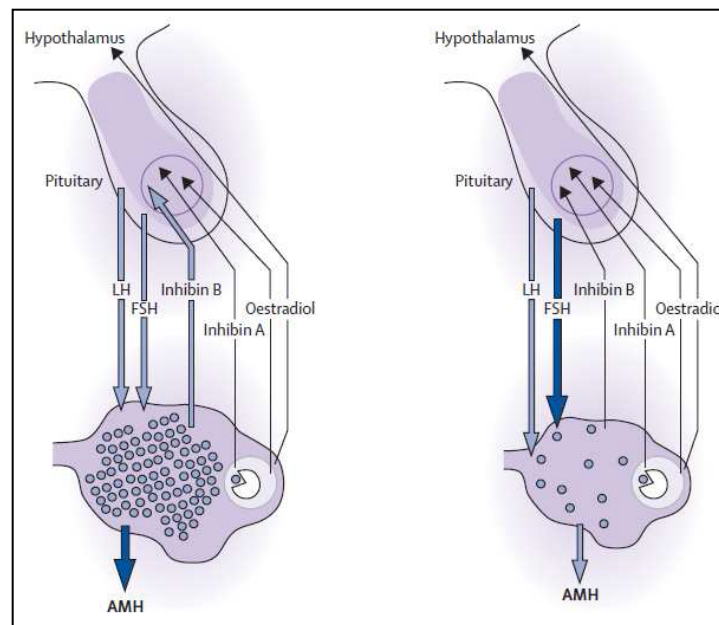


Figure 10 : Représentation de la réserve en follicules et des concentrations en hormones ovariennes et hypothalamo-hypophysaires chez une femme jeune en bonne santé (à gauche) et chez une femme en IOP (à droite)
(16)

II.2. Épidémiologie

La prévalence de l'IOP chez les femmes de moins de 40 ans est d'environ 1%. Elle est estimée à 1/1 000 pour les moins de 30 ans et à 1/10 000 chez celles de moins de 20 ans (17). 10 à 28% des femmes en aménorrhée primaire présentent une IOP contre 4 à 18% de celles en aménorrhée secondaire. Cependant, la prévalence varie en fonction des caractéristiques de la population comme par exemple l'ethnie. En effet, la fréquence est plus élevée chez les caucasiennes et les africaines que chez les patientes asiatiques (Tableau I) (4,18).

Tableau I : Prévalence de l'insuffisance ovarienne prématurée en fonction de l'ethnie

	Population				
	Caucasienne	Noire	Hispanique	Chinoise	Japonaise
Prévalence	1,0	1,4	1,4	0,5	0,14

II.3. Étiologies de l'IOP

L'étiologie de cette pathologie reste inexpliquée dans 90% des cas (19). Néanmoins, chez certaines patientes souffrant d'IOP, des anomalies génétiques, des troubles métaboliques, une auto-immunité, l'iattrogénie, des infections ou des facteurs environnementaux ont été définis comme des causes sous-jacentes de ce syndrome (20).

II.3.1. Étiologies génétiques

II.3.1.1. Causes cytogénétiques

Les anomalies chromosomiques sont des causes bien établies d'insuffisance ovarienne prématurée (10 à 13% des IOP), soit le deuxième plus grand groupe de patientes souffrant d'IOP (après l'IOP idiopathique) (20) (21).

Le chromosome X est connu pour son rôle essentiel dans le maintien et le fonctionnement ovariens. Ainsi, les femmes présentant une monosomie X (45,X0) appelée syndrome de Turner, mais également dans une moindre mesure celles présentant une trisomie X (47,XXX) ou encore des formes mosaïques (45,X0/46,XX et 45,X0/47,XXX) sont prédisposées à développer une insuffisance ovarienne prématurée (22). Les perturbations de la fertilité chez les femmes atteintes du syndrome de Turner (45, X0) résultent de la perte du chromosome X qui mène à une dysgénésie ovarienne et une atrophie folliculaire accélérée. L'haplo-insuffisance de gènes essentiels du chromosome X ou des anomalies de méiose non spécifiques pourraient expliquer l'atrophie accélérée des ovocytes 45,X0 (21).

Des délétions au niveau du chromosome X ou des translocations X-autosome sont également responsables de la survenue d'une IOP. L'analyse des dysfonctionnements ovariens chez des patientes présentant une translocations X-autosome, a permis de délimiter une région critique de Xq13-Xq21 (*POI2*) à Xq23-Xq27 (*POI1*) (21). Par ailleurs, la prémutation *FMR-1* (syndrome de l'X fragile) est la seconde cause génétique la plus fréquente d'insuffisance ovarienne prématurée (20,23). L'expansion des répétitions du trinuéotide (CGG)_n dans la région régulatrice du gène *FMR1* entraîne une IOP syndromique. Chez les femmes atteintes, le nombre de répétitions est supérieur à 200, la mutation est alors dite complète. Le stade de prémutation, correspondant à un nombre de répétitions CCG compris entre 55 et 199, est associé à une insuffisance ovarienne prématurée dans 20% des cas (22).

Enfin, des cas sporadiques d'IOP dus à des translocations autosomiques, robertsoniennes et réciproques, ont été décrits (21).

Les points de cassures chromosomiques engendrent vraisemblablement une haplo-insuffisance ou interrompent des gènes pivots dans ces régions entraînant un mauvais appariement méiotique. Cependant, aucune région autosomique ne semble préférentiellement impliquée (21).

II.3.1.2. *Causes moléculaires*

Les connaissances des bases moléculaires de l'IOP ne cessent d'augmenter et plus de 70 gènes sont considérés comme étant associés à la survenue de cette pathologie. Beaucoup de gènes sont impliqués du fait de leurs rôles dans le développement et/ou dans le fonctionnement ovarien. Par exemple, des mutations touchant les gènes codant pour les protéines BMP15 ou GDF9 peuvent bloquer la folliculogénèse et engendrer une insuffisance ovarienne prématurée. Des mutations de certains facteurs de transcription associés à la maturation ovocytaire, comme *NOBOX* ou *FIGLA* ont également été décrites (22).

Cependant, la plupart des gènes candidats identifiés sont impliqués dans les phénomènes de méiose et de réparation de l'ADN. En effet, une défaillance de ces systèmes se traduit par une apoptose cellulaire associée à un vieillissement accéléré (24). Par exemple, certains coenzymes comme *STAG3* et *SYCE1* sont essentiels à la formation du complexe synaptonémique au cours de la division cellulaire et les mutations de ces gènes induisent une infertilité. De même, les protéines *MCM8* et *MCM9* sont cruciales pour l'étape de recombinaison homologe lors de la division méiotique et leur absence ou anomalie favorise les erreurs au cours du processus de méiose (22).

Les principaux gènes potentiellement impliqués dans la survenue d'une insuffisance ovarienne prématurée d'origine génétique sont résumés dans la Figure 11.

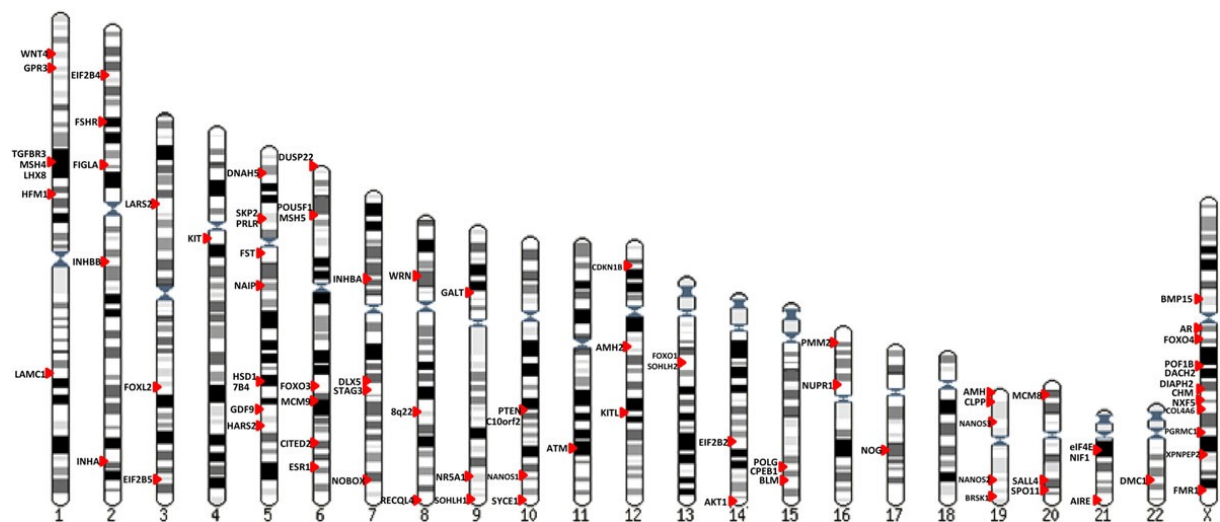


Figure 11 : Schéma représentant la localisation chromosomique des gènes probablement associés à l'IOP (21)

II.3.2. Étiologies auto-immunes

10 à 30% des cas d'IOP peuvent être expliqués par différents mécanismes auto-immuns, comprenant une dysrégulation immunitaire systémique comme dans la polyendocrinopathie auto-immune. Ainsi, l'IOP peut être associée au terrain auto-immun, personnel ou familial, comme la maladie de Crohn, la polyarthrite rhumatoïde ou la maladie de Basedow. Des études ont notamment mis en évidence des auto-anticorps dirigés contre des antigènes ovariens et une importante stimulation de l'immunité cellulaire engendrant une oophorite lymphocytaire (25). Elle peut également être une manifestation isolée de l'auto-immunité (20).

II.3.3. Étiologies infectieuses, iatrogénie et autres causes

Une insuffisance ovarienne peut survenir à la suite d'une chirurgie pelvienne, d'une ovariectomie ou d'une exposition à un agent toxique comme une chimiothérapie ou une radiothérapie (26). De même, la tuberculose, la varicelle, la malaria ou encore les oreillons peuvent également être à l'origine d'une IOP via un phénomène inflammatoire au niveau de l'ovaire (20,27).

II.4. Symptômes

On distingue trois stades dans l'IOP : occulte, biochimique et clinique (24). Les patientes en phase occulte présentent une fécondité diminuée, des cycles réguliers et des valeurs normales de FSH. Lorsque l'IOP évolue vers la phase biochimique, les cycles sont réguliers mais les taux de FSH commencent à augmenter. La plupart des patientes en phase clinique d'IOP souffrent d'aménorrhée ou d'irrégularités de cycles associées à une FSH élevée (28).

On distingue deux types de présentation clinique d'IOP selon qu'il existe un développement pubertaire spontané initié ou non chez la patiente.

Lorsqu'une fille est atteinte d'IOP avant sa puberté, elle présente un développement pubertaire absent ou incomplet ainsi qu'une aménorrhée primaire. Ces patientes ne présentent généralement pas de symptômes de carence œstrogénique (4).

Par ailleurs, environ 76% des patientes atteintes d'insuffisance ovarienne prématurée ont eu une puberté normale avec des cycles réguliers puis elles ont présenté une aménorrhée secondaire généralement associée à des troubles climatiques témoignant de la privation œstrogénique (20). Parmi ceux-ci, on peut citer ceux qui sont habituellement décrits chez les femmes ménopausées : bouffées de chaleur, sueurs nocturnes, dyspareunie, sécheresse vaginale, troubles du sommeil et de l'humeur, baisse de la concentration, sécheresse oculaire et baisse de la libido. La carence œstrogénique peut également engendrer une baisse des fonctions cognitives avec le temps (3).

Le fait que ces symptômes soient moins fréquents dans les cas d'aménorrhée primaire suggère qu'ils sont essentiellement dus à une cessation de la sécrétion d'œstrogènes plutôt qu'à un déficit. Ils peuvent être transitoires ou intermittents et de sévérité et tolérance variables (20).

L'insuffisance ovarienne, via la carence œstrogénique, engendre une réduction de la densité minérale osseuse et donc une augmentation du risque d'ostéopénie, d'ostéoporose et de fracture en vieillissant. De nombreuses études ont démontré qu'une femme en IOP a 1,5 à 3 fois plus de risque de fracture qu'une femme ménopausée après 50 ans (19).

Les patientes IOP non traitées ont un risque accru de développer des pathologies cardiovasculaires et présentent un sur-risque de mortalité toutes causes confondues (19).

Le déficit en œstrogènes chez les femmes en insuffisance ovarienne engendre également des perturbations du profil lipidique et des modifications du revêtement endothélial. Ces modifications augmentent le risque de survenue de pathologies cardiovasculaires, de syndrome métabolique et donc la mortalité (19).

Cette pathologie a un impact négatif indéniable sur le bien-être psychologique des patientes qui rapportent une baisse de l'estime de soi, des troubles anxieux voire un syndrome dépressif, notamment à cause des difficultés pour tomber enceinte (19,20).

Les conséquences à long terme de la carence œstrogénique sont résumées dans le Tableau II.

Tableau II : Résumé des conséquences à long terme de l'insuffisance ovarienne prématurée, d'après Podfigurna –Stoppa *et al.* J Endocrinol Invest 2016 (29)

Troubles cognitifs	• Troubles de la mémoire, de la concentration, augmentation du risque de démence
Auto-immunité	• Augmentation du risque de survenue d'une pathologie auto-immune, notamment thyroïdienne
Système cardiovasculaire	• Altération des fonctions endothéliales, augmentation des triglycérides, du cholestérol et du LDL
Os	• Ostéopénie, ostéoporose, augmentation du risque de fracture
Hormones	• Hypoestrogénie, infertilité
Symptômes urogénitaux	• Sécheresse vaginale, irritations, démangeaisons, troubles sexuels
Mortalité : sur-risque	

II.5. Diagnostic

L'insuffisance ovarienne prématurée est de diagnostic clinique, suspecté devant une aménorrhée ou une oligospanioménorrhée avant l'âge de 40 ans. L'IOP est confirmée biologiquement par une élévation du taux de FSH à deux reprises (3).

Bien que la précision dans la définition de l'IOP soit insuffisante, le groupe de travail de l'ESHRE recommande les critères diagnostiques suivants (3) :

- Oligo/aménorrhée d'au moins 4 mois
- FSH > 25 UI/L à deux reprises avec au moins 4 semaines d'intervalle

La valeur discriminative du seuil de la FSH confirmant l'IOP varie en fonction des auteurs de 25 à 40 UI/L.

Après le diagnostic, les dosages suivants sont généralement réalisés (16) :

- AMH : effondrée
- LH : élevée mais élévation moins marquée que pour la FSH
- Estradiol : effondré

L'hormone antimüllérienne (AMH) est une glycoprotéine produite par les cellules de la granulosa des follicules primordiaux. Elle sert de marqueur de la ménopause chez les femmes en âge de procréer et sa concentration est fortement corrélée au pool de follicules antraux. Ainsi, même si l'AMH constitue un marqueur de la réserve ovarienne à un temps T, elle n'est cependant pas un marqueur prédictif du risque de survenue d'une insuffisance ovarienne prématurée puisqu'elle est produite par les cellules folliculaires (30).

L'AMH peut être interprétée uniquement en association avec la FSH et les taux d'œstrogènes (20). Ces derniers peuvent être perturbés par la prise concomitante d'hormones et ne doivent donc être dosés que chez des patientes ne prenant pas de traitement hormonal, y compris les contraceptifs oraux. Des taux en estradiol inférieurs à 50 pg/mL signent une hypoestrogénie (3,31).

Les taux d'inhibine B varient significativement entre deux cycles menstruels et ce marqueur ne permet pas de prédire une faible réponse à une stimulation ovarienne, c'est pourquoi le dosage de l'inhibine B n'est pas recommandé (3,31).

Devant une IOP non iatrogénique, le diagnostic étiologique nécessite de réaliser le bilan complémentaire suivant (3,31) :

- Génétique :
 - Caryotype
 - Recherche de la prémutation de l'X-Fragile
 - Recherche d'une anomalie génétique spécifique en fonction des arguments cliniques et amnestiques

- Immunologique :
 - Recherche d'anticorps anti-surrénales (anticorps anti 21-hydroxylase)
 - Recherche d'anticorps anti-thyroïde (anticorps anti thyroperoxydase et anti thyroglobuline)
- Endocrinien :
 - β -hCG
 - TSH
 - Cortisol
 - Prolactine
 - Glycémie à jeun
- De l'imagerie :
 - Échographie pelvienne

La plupart du temps, la cause d'IOP n'est pas identifiée et on parle alors d'IOP inexpliquée ou idiopathique (3,31).

II.6. Prise en charge

Les femmes présentant une IOP doivent prendre des mesures préventives afin de réduire leurs facteurs de risque de pathologies cardiovasculaires et osseuses. Ainsi, l'arrêt du tabac, une activité sportive régulière et un IMC normal sont recommandés (19).

Afin de protéger leur capital osseux, il leur est conseillé d'adopter un régime alimentaire équilibré contenant la quantité recommandée de calcium (minimum 1 000 mg/j) et de vitamine D (concentration en vitamine D plasmatique > 30 ng/mL). Une supplémentation en vitamine D et calcium peut s'avérer nécessaire chez les femmes ayant des apports quotidiens insuffisants et/ou une densité minérale osseuse (DMO) basse (19).

Chez les femmes atteintes d'IOP, un traitement hormonal systémique permet de traiter les symptômes dus au déficit en œstrogènes et d'atténuer les répercussions sur la santé à long terme, s'il n'y a aucune contre-indication au traitement. Il peut être administré par voie transdermique ou per os, si possible jusqu'au moins l'âge physiologique de la ménopause.

Le traitement hormonal est indiqué pour réduire le risque d'ostéoporose, de maladie cardiovasculaire, l'atrophie uro-génitale, la baisse des fonctions cognitives et pour améliorer la qualité de vie des femmes souffrant d'insuffisance ovarienne (19).

Une prise quotidienne d'œstrogènes est recommandée afin de mimer les taux physiologiques et d'obtenir une disparition des symptômes. Si le 17- β estradiol est préféré à l'éthinylestradiol, la dose optimale à administrer fait l'objet de controverses. Certaines études proposent des doses de 100 μ g tandis que d'autres ont démontré qu'une administration quotidienne de 75 μ g d'estradiol était suffisante pour mimer les taux physiologiques. Le principal objectif est d'utiliser la dose efficace minimale d'œstrogènes afin de limiter la survenue d'effets indésirables tels que la survenue d'un événement thrombo-embolique ou d'une cancer œstrogène-dépendant (19).

L'addition d'un traitement cyclique par progestérone à raison de 12 jours minimum par mois permet d'éviter l'hyperplasie de l'endomètre, et donc limite le risque de cancer de l'endomètre (31).

L'application locale d'œstrogènes est efficace pour traiter les symptômes génito-urinaires, en supplément du Traitement Hormonal Substitutif (THS) qui peut être insuffisant à lui tout seul (19).

L'instauration d'un THS réduit significativement le risque de fracture. Contrairement au traitement de l'ostéopénie ou de l'ostéoporose chez les femmes post ménopause, pour lesquelles un traitement par biphosphonates est instauré en première intention, chez les patientes IOP, la préservation du capital osseux est permise par le traitement hormonal. Le THS est à privilégier par rapport aux biphosphonates. En effet, ces derniers sont tératogènes et sont donc à éviter chez des femmes qui pourraient spontanément démarrer une grossesse ou avoir recours au don d'ovocytes et à la FIV du fait de leur demi-vie d'environ 10 ans (19).

Plusieurs études ont démontré que la prise d'un traitement hormonal permettait de rétablir les fonctions endothéliales, de réduire l'épaisseur de la *media* et de l'*intima* des artères, la pression artérielle, l'angiotensine et la créatinine (19).

Actuellement, aucune prise en charge ne permet d'améliorer la fonction ovarienne et les taux de grossesses chez les patientes IOP. Mais, en raison de la possible reprise transitoire, spontanée de la fonction ovarienne, on estime entre 5 et 10% la fréquence de survenue d'une grossesse spontanée chez des patientes souffrant d'IOP idiopathique et désirant un enfant (31).

La préservation de fertilité peut être proposée si l'on arrive à suffisamment stimuler la patiente pour obtenir des ovocytes matures lors de la ponction ovarienne. L'AMP avec recours au don d'ovocytes, ainsi que l'adoption restent des options qui peuvent permettre à ces femmes d'avoir un enfant (32).

II.7. Suivi médical

La DMO doit être mesurée lorsque le diagnostic d'IOP est posé, particulièrement s'il existe des facteurs de risque associés. La mesure doit être répétée régulièrement mais il n'existe pas de recommandation sur la fréquence de cette surveillance (31).

Il est nécessaire de surveiller annuellement la pression artérielle, le poids, la consommation de tabac et d'autres critères si nécessaire (31).

Un dosage des lipides sanguins est recommandé tous les 5 ans en prévention du risque cardiovasculaire (31).

L'instauration d'un THS nécessite un suivi annuel avec un examen clinique et une vérification de la bonne compliance au traitement. Il n'est pas recommandé de surveiller le taux d'estradiol dans le sang pour monitorer le traitement hormonal (3).

Une surveillance de la fonction thyroïdienne peut être réalisée tous les 1 à 2 ans. En effet, environ 20% des patientes atteintes d'IOP idiopathique développeront une hypothyroïdie, le plus souvent une thyroïdite d'Hashimoto (31).

Lorsque le diagnostic d'IOP est posé, les patientes sont souvent peu préparées à apprendre une telle nouvelle et à comprendre les conséquences comme l'altération de leur fertilité et la nécessité d'un recours à un traitement hormonal à long terme. La dénomination de cette pathologie avec les termes « ménopause précoce » peut être blessante pour une jeune femme et le terme « insuffisance » est souvent le mieux accepté par les patientes car il reflète la possibilité d'une reprise intermittente de la fonction ovarienne. Par ailleurs, l'accompagnement psychologique de ces patientes est crucial dans la mesure où elles rapportent fréquemment une mauvaise estime de soi et une détresse émotionnelle après l'annonce du diagnostic (3,31).

II.8. Conclusion

La prise en charge des patientes IOP est essentiellement symptomatique par méconnaissance des mécanismes en jeux dans l'IOP.

La génétique de l'insuffisance ovarienne prématurée présente beaucoup de zones d'ombre que les programmes de séquençage extensif du génome humain lèveront progressivement.

En attendant, les marqueurs diagnostiques actuellement utilisés tels que l'AMH, l'inhibine B ou la FSH, ont une faible valeur prédictive puisqu'ils ne sont impactés que lorsque l'IOP est déjà installée et que la réserve ovarienne est très largement diminuée.

Les Guidelines de l'ESHRE (*European Society of Human Reproduction and Embryology*) concluent sur un certain nombre de sujets de recherche en cours, dont la pertinence des marqueurs biochimiques actuels (par exemple la FSH ou l'AMH) dans le diagnostic de l'insuffisance ovarienne prématurée mais ne retiennent aucun traitement ni aucune intervention spécifique en raison d'un niveau de preuve insuffisant (3).

III. Les télomères

III.1. Définition

Le terme « télomère » est issu des mots grecs « *telos* » qui signifie « fin » et « *meros* » qui veut dire « segment ». Les télomères sont des complexes multifonctionnels ADN – protéines, conservés au cours de l'évolution, situés aux extrémités des chromosomes eucaryotes. Ce sont des structures hétérochromatiques composées de répétitions d'une séquence hexanucléotidique non codante et riche en guanine : 5'-TTAGGG-3' (33).

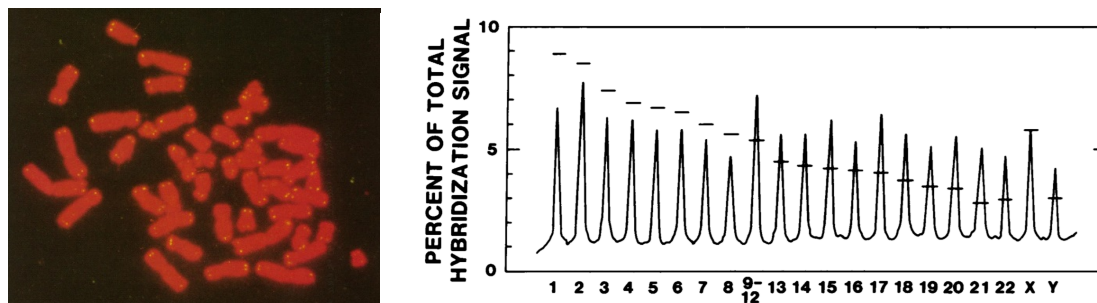
III.2. Historique de découverte

Les télomères ont été décrits pour la première fois il y a 70 ans par Hermann Muller, un généticien nord-américain, durant ses travaux sur la drosophile (33). Il a observé que les extrémités des chromosomes chez les mouches ne se liaient pas entre elles ou avec des extrémités issues de la cassure d'un chromosome ; à l'inverse des extrémités de cassures qui sont capables de se lier les unes aux autres. Il existerait donc une structure particulière au niveau des extrémités naturelles des chromosomes (34).

En 1971, Alekseï Olovnikov émet la « théorie des télomères » ou « théorie de la marginotomie » qu'il décrit comme « la synthèse de répliques plus courtes que le modèle ». Il énonce ainsi que la transcription complète de la chaîne polynucléotidique lors du processus de duplication de l'ADN d'une cellule somatique est impossible, engendrant un raccourcissement progressif des télomères (35). Dans le même temps, James Watson décrit le problème de complétion ou « End replication problem » (voir p.29 , « End replication problem ») (36).

A la fin des années 70, Elizabeth Blackburn a identifié la séquence d'ADN télomérique dans un protozoaire cilié, *Tetrahymena thermophila*, et a observé que le nombre de répétitions est variable entre les espèces et également entre les molécules d'ADN (37). En 1989, elle a également publié le premier article à propos de la télomérase et de son fonctionnement (38).

En 1988, Moyzis *et al.* sont partis du postulat que des séquences hautement répétitives sont conservées au cours de l'évolution car elles possèdent une fonction cellulaire particulière. Ils ont donc voulu démontrer que les télomères étaient également présents à l'extrémité des chromosomes humains. Ils ont pour cela utilisé la FISH (« Fluorescent *in situ* hybridization ») afin de démontrer que les télomères sont présents sur chaque chromosome (Figure 12) (39).



En 2009, Elizabeth Blackburn, Carol Greider et Jack Szostak ont reçu le prix Nobel de médecine et de physiologie pour leurs travaux sur les télomères et la télomérase (38).

Les différentes étapes dans la découverte de la biologie des télomères sont résumées dans la Figure 13 (38).

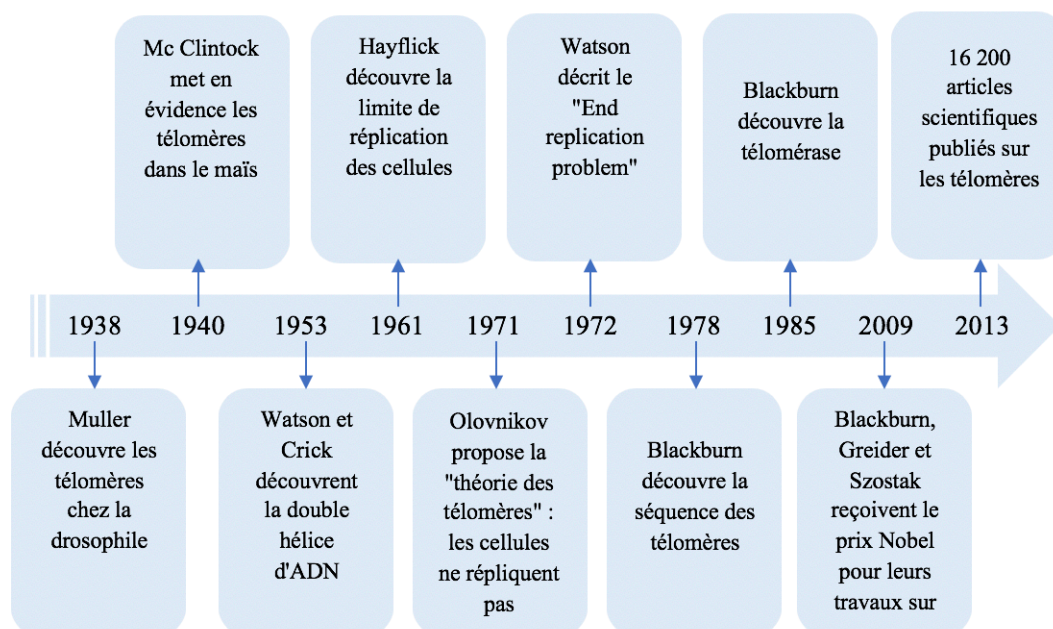


Figure 13 : Les étapes dans la découverte de la biologie des télomères d'après Herrmann *et al.* (38)

III.3. Structure

III.3.1. ADN télomérique

Les télomères sont donc des régions particulières, situées à l'extrémité des chromosomes, avec des séquences d'ADN qui leur sont propres, associées à des protéines spécifiques afin de permettre le maintien de l'intégrité du génome (33). Structuellement, la région télomérique est composée d'une partie double brin et d'une partie simple brin. La région double brin représente la majeure partie du télomère, tandis que la région simple brin existe sous la forme d'une extension d'environ 100 nucléotides à l'extrémité 3' du brin riche en guanine (Figure 14) (40).

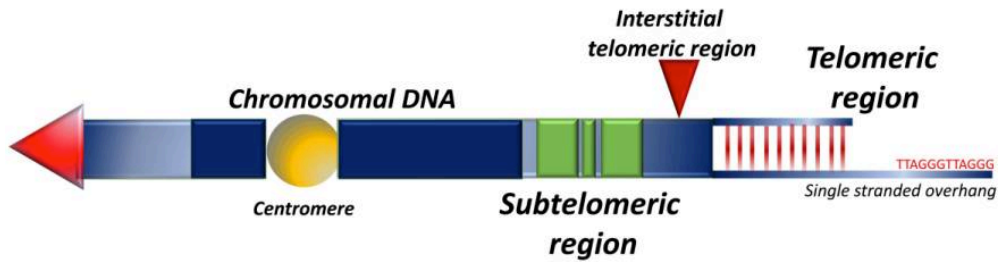


Figure 14 : Représentation schématique des télomères et des régions sous télomériques (en vert) (41)

L'extrémité du télomère permet de former une structure appelée « boucle T » pour boucle télomérique. Pour obtenir cette conformation tridimensionnelle, la région simple brin riche en guanine envahit la région double brin de l'ADN télomérique et forme la « boucle D » pour boucle de déplacement (Figure 15). Cette structure permet de masquer l'extrémité chromosomique de l'induction de la réponse aux dommages de l'ADN (DDR) en l'empêchant d'être reconnue comme une cassure du double brin et également de limiter l'accès de la télomérase (40).

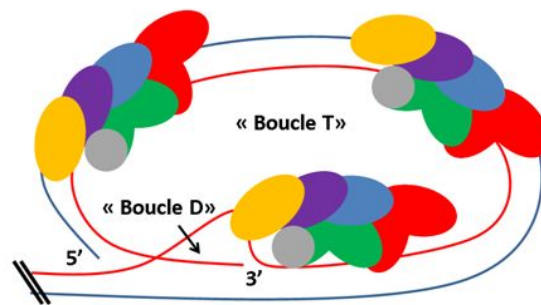


Figure 15 : Conformation tridimensionnelle des télomères (40)

Le fait que les télomères soient des séquences riches en guanine favorise la formation de structures tertiaires appelées G-Quadruplex au travers d'appariements de type Hoogsteen. Des liaisons hydrogènes se forment entre les quatre résidus guanine situés sur un même plan et l'ensemble est stabilisé par un cation monovalent au centre de la tétrade (potassium ou sodium) (Figure 16). Cette conformation interfère avec l'allongement des télomères et entrave la dégradation de l'ADN par les exonucléases, ce qui en fait un mécanisme de régulation de la longueur des télomères (40,42,43).

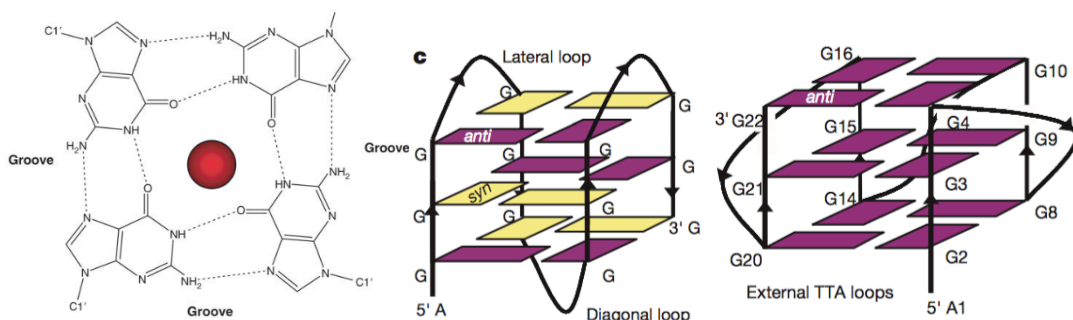


Figure 16 : Quartet de guanine avec un cation central (à gauche (43)) formant un G-quadruplex selon différentes lignes de pliage (à droite (42))

III.3.2. Nucléosomes

Les télomères sont organisés au sein de nucléosomes composés d'octamères d'histones et stabilisés par des interactions protéine-protéine et protéine-ADN entre les sous-unités histoniques et les séquences télomériques. Les télomères sont des régions d'hétérochromatine composées d'histones spécifiques afin de permettre le maintien de l'intégrité structurale télomérique (Figure 17). La perte de ces histones entraîne une ouverture de la chromatine, une fonction télomérique défectueuse et une instabilité chromosomique. Elles interviennent dans le « capping » des télomères, leur transcription et la recombinaison homologue. La structure de l'hétérochromatine fait taire la transcription des gènes voisins, c'est ce qu'on appelle l'effet de position des télomères. Il implique la protéine RAP1, qui elle-même recrute la protéine SIRT6. Cette dernière favorise l'hypoacétylation des histones et donc une répression transcriptionnelle des gènes voisins (41).

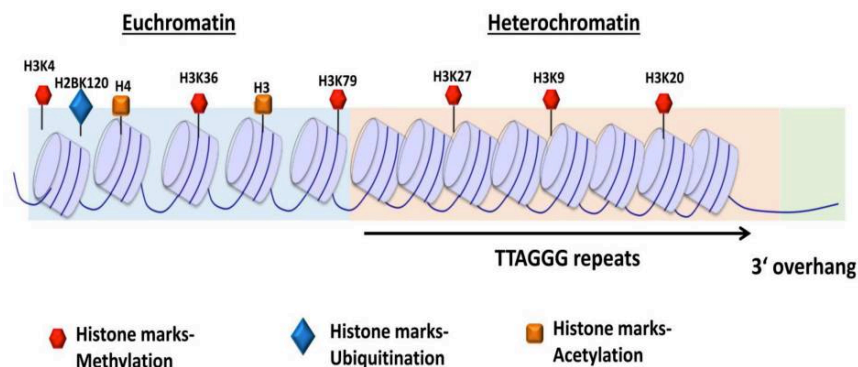


Figure 17 : Représentation schématique de la structure de la chromatine et de la distribution des histones au niveau des télomères (41)

III.3.3. Complexe Shelterin

Les télomères sont liés à des protéines spécifiques appelées « Telomere Binding Proteins » (TBP). Ces dernières forment le complexe Shelterin afin de protéger l'extrémité des chromosomes (Figure 18) (40). Il y aurait un complexe toutes les 100 paires de bases au niveau du télomère (44).

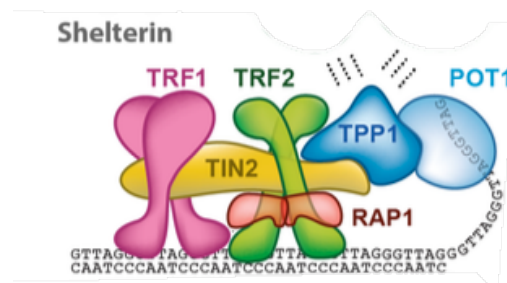


Figure 18 : Structure d'un télomère humain (44)

Six différentes protéines s'associent : TRF1 et TRF2 (« Telomeric repeat-binding factor 1 et 2 »), RAP1 (« Repressor and activator protein 1 »), TIN2 (« TRF1-interacting nuclear protein 2 »), POT1 (« Protection of telomeres 1 ») et TPP1 (44).

Ce complexe stable est formé grâce à de fortes interactions protéine-protéine entre les sous-unités et ne requiert pas d'ADN. Il peut être divisé en deux parties en fonction de son association à la partie simple brin ou double brin du télomère. Ainsi, la partie liant le double brin d'ADN regroupe TRF1, TRF2, RAP1 et TIN2. Seuls TRF1 et TRF2 lient directement l'ADN télomérique grâce à leur domaine Myb. RAP1 interagit étroitement avec TRF2. Quant à TIN2, elle relie TRF1, TRF2 et TPP1. La partie du complexe Shelterin liant l'ADN simple brin est composée de l'hétérodimère POT1 et TPP1. POT1 est directement lié au télomère via son domaine OB (44).

La Figure 19 est une représentation des différentes interactions entre les protéines du complexe Shelterin et le télomère.

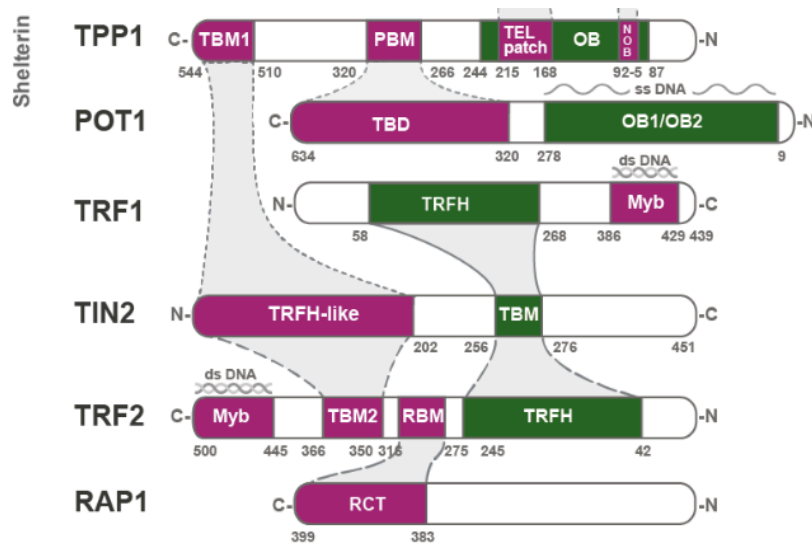


Figure 19 : Représentation des liaisons ADN/protéine et protéine/protéine dans le complexe Shelterin (44)

L'élimination partielle des TBP permet à la télomérase d'accéder aux télomères pour les rallonger. L'élimination totale des TBP entraîne le raccourcissement des télomères du fait de l'activation des voies de réparation de l'ADN. Ces protéines permettent donc de recruter les protéines de réparation de l'ADN, de stabiliser les chromosomes et de bloquer l'accès à la télomérase ; c'est pourquoi ce sont des protéines qui régulent négativement la longueur des télomères (33).

III.3.3.1. *TRF1 et TRF2*

Les télomères sont construits à partir de nucléosomes qui lient un certain nombre de protéines spécifiques aux télomères dont deux sont bien caractérisées : TRF1 et TRF2. Chez l'Homme, TRF1 et TRF2 reconnaissent la même séquence de bases sur le télomère (33). Ces deux protéines sont structurellement similaires et se lient toutes deux à l'ADN double brin en reconnaissant la séquence répétitive 5'-TTAGGG-3' via leur domaine Myb se situant à leur extrémité C-terminale. Elles partagent également un domaine TRFH leur permettant de se lier à TIN2 (40).

TRF1 et TRF2 sont toutes deux nécessaires à la régulation de la longueur des télomères. Ainsi, la boucle T, qui est maintenue par TRF1 et TRF2, est très dynamique et est ouverte lors de la réplication de l'ADN pour permettre l'accès à l'ADN polymérase (33).

Elles sont aussi essentielles à la protection des télomères car la suppression de l'une ou l'autre entraîne l'activation de la réponse aux dommages de l'ADN, cependant, TRF1 et TRF2 jouent des rôles très différents dans la réplication des télomères et leur protection (40).

TRF1 joue un rôle majeur dans le maintien de la longueur du télomère et aide à la formation de la boucle T en provoquant un appariement des télomères. TRF1 promeut la réplication et son élimination entraîne le blocage de la fourche de réplication (40). Elle inhibe aussi l'élongation des télomères en empêchant l'accès à la télomérase. Des expériences montrent que la surexpression de cette protéine entraîne le raccourcissement des télomères et son inactivation les allonge (33).

TRF2 se trouve principalement dans la boucle T du télomère et agit dans la stabilisation de la boucle D. Elle assure le maintien de l'extrémité d'ADN simple brin et empêche sa dégradation en évitant la fusion des chromosomes bout à bout et l'activation de la voie ATM (« Ataxia Telangiectasia Mutated ») de réparation des dommages de l'ADN (33).

III.3.3.2. POT1 et TPP1

POT1 et TPP1 forment un hétérodimère et régulent ensemble l'activité de la télomérase et l'accès à la partie simple brin du télomère. Bien que TPP1 ne se lie pas directement à l'ADN, elle augmente l'affinité de liaison de POT1 pour l'ADN télomérique. L'une des fonctions clé de POT1-TPP1 est d'empêcher l'activation de la réponse aux dommages de l'ADN médiée par la protéine kinase ATR (40).

POT1 et TPP1 influencent également la longueur des télomères via la régulation de l'activité de la télomérase mais elles semblent avoir des activités opposées. POT1 peut séquestrer l'extrémité 3', la rendant ainsi inaccessible à la télomérase, tandis que TPP1 participe au recrutement de cette enzyme et stimule son activité (40).

III.3.3.3. TIN2

TIN2 joue un rôle clé dans la stabilisation du complexe Shelterin et l'association de ses composants au sein du télomère. Bien que TRF1 et TRF2 se lient indépendamment l'une de l'autre à l'ADN télomérique et avec une forte affinité, la déplétion de TIN2 entraîne une forte diminution de ces protéines sur le télomère. De plus, l'interaction TIN2-TPP1 permet la liaison POT1-TPP1 avec l'ADN (40).

TIN2 joue également un rôle important dans le maintien de l'intégrité des chromosomes par le biais d'interactions avec d'autres protéines. Par exemple, via son interaction avec une cohésine, elle permet la cohésion des chromatides sœurs entre elles. Des mutations de *TIN2* ont été retrouvées chez des patients avec des télomères courts (40).

III.3.3.4. *RAP1*

La protéine RAP1 diffère des cinq autres protéines en étant la seule sous-unité du complexe qui n'est pas essentielle chez la souris. Sa suppression entraîne une augmentation des recombinaisons au niveau des télomères mais ne provoque pas de fusion des chromosomes. Cette observation suggère qu'elle fonctionne indépendamment de TRF2 malgré leur liaison. Cependant, dans l'espèce humaine, la situation semble différente, l'association RAP1-TRF2 empêchant la fusion des chromosomes bout à bout (40).

III.3.4. Complexe CST

Bien que le complexe Shelterin soit le plus important système de protéines télomériques, un autre complexe a été identifié. Il est connu sous le nom de CST et regroupe les protéines CTC1 (« Conserved Telomere Component 1 »), STN1 et TEN1 (Figure 20). Ce complexe trimérique se situe spécifiquement au niveau de l'ADN télomérique simple brin et est impliqué dans la régulation de la longueur des télomères. De même que le complexe Shelterin, il permet d'éviter la liaison de la protéine RPA au télomère et donc l'activation de la réponse aux dommages de l'ADN. Il joue également un rôle clé dans la réplication des télomères en coordonnant le recrutement de la télomérase et de l'ADN polymérase pour permettre l'allongement des chromosomes et en dépliant les structures du G-quadruplex (40,41).

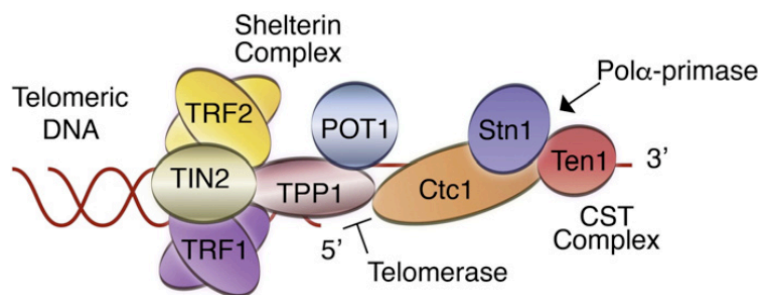


Figure 20 : Représentation du complexe CST par rapport au télomère et au complexe Shelterin (45)

III.3.4.1. *CDC13/CTC1*

CDC13, l'homologue chez la levure de CTC1 humaine (Figure 21) a fait l'objet de davantage d'études que CTC1 avec laquelle elle présente de fortes similarités structurales. Grâce à ses 4 domaines OB, CDC13 peut se lier à l'ADN, former des homodimères et se lier à la Polα primase. La phosphorylation de son domaine RD (« Recruitment Domain ») permet la liaison à la protéine Est1 qui recrute ensuite la télomérase. Cette protéine est donc importante pour réguler l'accès de la télomérase et également pour l'amorçage de l'ADN polymérase aux télomères. CDC13 est liée à STN1 via 2 de ses domaines RD et OB4 (45).

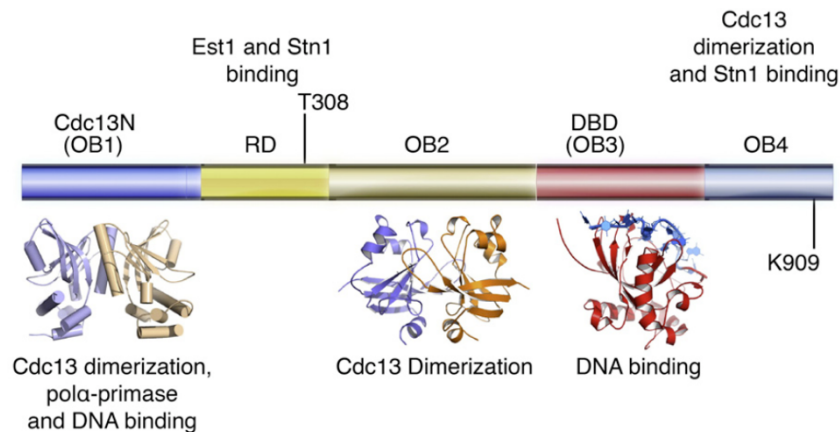


Figure 21 : Structure de la protéine CDC13 avec ses différents sites de liaison (45)

III.3.4.2. STN1/OBFC1-TEN1

Les données concernant ces protéines dans l'espèce humaine sont très limitées. STN1 a été identifiée chez la souris ainsi que chez l'Homme. C'est OBFC1. TEN1 ne semble pas être liée à l'acide nucléique simple brin, à l'inverse de STN1 qui sert également au recrutement de l'ADN polymérase. Il persiste des questions quant au rôle de TEN1 dans la biologie des télomères, mais il a été démontré qu'elle permet d'améliorer l'affinité de CTC1 pour l'ADN. Elle pourrait également agir comme un block stérique qui protégerait l'extrémité télomérique (45). Il a aussi été démontré que STN1 interagit avec TPP1, suggérant une possible coordination entre les deux complexes (40).

III.3.5. Régions sous télomériques

Ces régions sont des régions composées de chromatine transcriptionnellement active entourées d'hétérochromatine et contenant des sites d'initiation de la transcription pour les TERRA (« Telomeric repeat-containing RNAs »). La transcription des TERRA s'initie donc au niveau de cette région sous télomérique vers les télomères et ces composants servent au maintien et à la protection des extrémités chromosomiques. Les séquences homologues sub-télomériques empêchent également l'hétérochromatine de se propager dans les régions voisines pour empêcher la répression des gènes (41).

III.4. Fonctions

A chaque division cellulaire, une partie de l'extrémité terminale des chromosomes est perdue du fait de l'incapacité de l'ADN polymérase à synthétiser les bases à l'extrémité 5' du brin, en raison d'un problème de réplication finale. Par conséquent, les télomères, qui sont des répétitions d'hexanucléotides non codantes, sont synthétisés à l'extrémité des chromosomes afin d'empêcher la reconnaissance de l'extrémité chromosomique comme une cassure du double brin d'ADN (33).

III.4.1. « End replication problem »

L'information génétique des organismes eucaryotes est contenue dans les chromosomes. La disposition linéaire de l'information génétique sur les chromosomes fournit certains avantages évolutifs, tels que des recombinaisons, des remaniements chromosomiques aléatoires au cours de la reproduction sexuée, mais elle a aussi des inconvénients, comme la dégradation nucléolytique et la mauvaise répllication des extrémités libres du chromosome (33).

A chaque division cellulaire, la répllication incomplète des extrémités chromosomiques par l'ADN polymérase entraîne un raccourcissement progressif des télomères et est connue sous le nom de « end replication problem » (33). Durant la répllication de l'ADN, chaque brin d'ADN sert de modèle pour la génération d'un nouveau brin complémentaire. L'ADN polymérase, grâce à une amorce unique d'ARN, initie la synthèse d'un nouveau brin dans le sens 5' vers 3' (vers la fourche de répllication) : le brin sens (41).

En revanche, la synthèse du brin anti-sens de 5' à 3' nécessite de recruter plusieurs amorces qui s'allongent en courts fragments d'Okazaki en s'éloignant de la fourche de répllication. Ensuite, les amorces sont dégradées et les lacunes sont complétées par la polymérase puis liées pour former un brin continu. Cependant, la lacune laissée par la dégradation de l'amorce à l'extrémité 5' ne peut être complétée, ce qui entraîne la perte d'un court segment d'ADN (environ 250 nucléotides) au niveau de ce brin anti-sens. C'est cette perte de nucléotides à l'extrémité chromosomique qui conduit à l'obtention de télomères avec une partie terminale simple brin (Figure 22) (41).

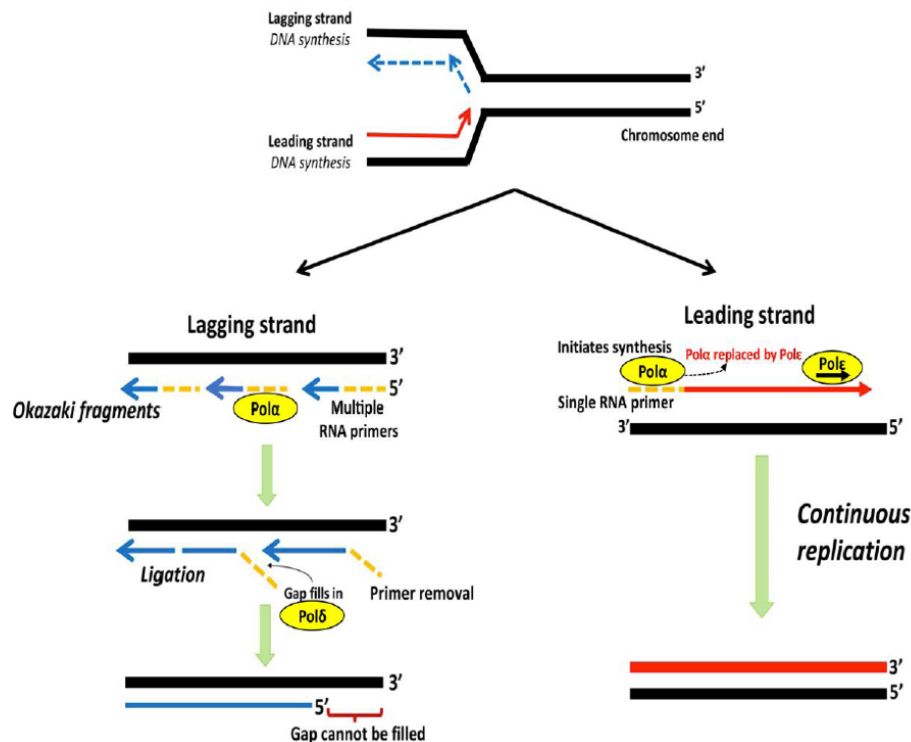


Figure 22 : Représentation schématique de la répllication du brin sens ("leading strand") et du brin anti-sens ("lagging strand") (41)

En revanche, du fait de la structure des télomères, le bras 5' initial est plus court que le brin 3'. Ainsi le télomère issu de la réplication continue du brin sens est plus court que le télomère initial. Par ailleurs, ce brin continu plus court possède une extrémité franche puisqu'il n'y a pas de problème de réplication. Il est donc nécessaire de rétablir la queue 3' sortante au niveau de ce télomère. Cette résection fait intervenir des enzymes permettant de digérer l'un des deux brins d'ADN (46). Chez la souris, la formation de ce surplomb 3' simple brin se déroule en 3 étapes (Figure 23) (47) :

- Étape 1
 - Au niveau du brin anti-sens, l'extrémité 3' simple brin est synthétisée par élimination de l'amorce d'ARN, POT1 peut se lier à cette extrémité et inhibe Apollo
 - Au niveau du brin sens, il n'y a pas d'extrémité simple brin, POT1 ne peut pas se lier au télomère donc Apollo est activée et élimine des nucléotides en 5'
- Étape 2 : la deuxième nucléase Exo1 agit à la fois que le brin sens et le brin anti-sens et agrandit fortement la partie simple brin de façon transitoire
- Étape 3 : Le complexe CST se fixe et permet de recruter l'ADN polymérase pour allonger cette extrémité 5' et la séquence CCAATC-5' est ainsi retrouvée dans 80% des télomères humains (48)

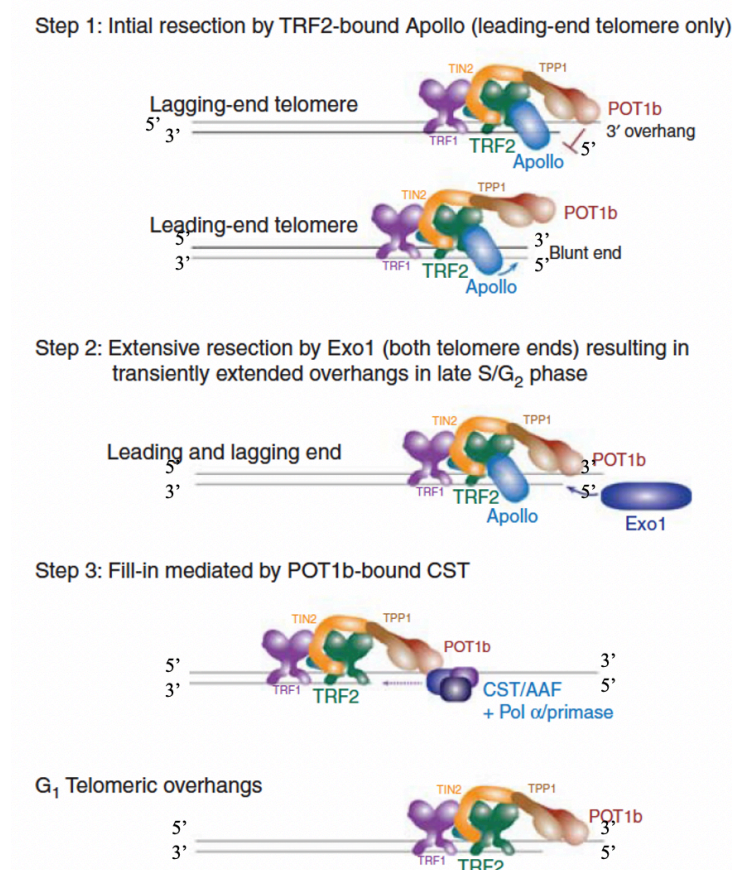


Figure 23 : Génération du surplomb 3' simple brin sur le télomère : représentation schématique des 3 étapes étudiées chez la souris (47)

Chez l'Homme, les mécanismes en cause sont moins bien connus. Beaucoup de questions restent en suspens comme : quel mécanisme limite le complexe CST dans la synthèse du brin 5' afin d'obtenir un surplomb simple brin de la longueur souhaitée ? Pourquoi la majorité des brins riches en C se terminent-ils par la même séquence ? etc (48,49).

Le raccourcissement des télomères pendant la division cellulaire amène à une longueur critique qui conduit à l'exposition des télomères et à l'activation des voies des protéines kinases ATM et ATR. Ces dernières phosphorylent p53 qui active à son tour l'inhibiteur de kinase cycline-dépendant p21, inhibiteur des complexes cycline/CDK indispensables pour le bon déroulement du cycle cellulaire. Il se produit donc un arrêt du cycle cellulaire, voire la sénescence ou l'apoptose (50). Il semble que ce sont les télomères les plus courts, et non la taille moyenne des télomères, qui soient responsables de la sénescence cellulaire (51).

III.4.2. La limite d'Hayflick

Dans la première moitié du XXème siècle, les scientifiques croyaient que, dans un milieu de culture adéquate et avec des conditions favorables à leur réplication, les cellules avaient une capacité de division infinie. Cette théorie était sous-tendue par des modèles de cellules immortelles comme les cellules HeLa, provenant d'un carcinome cervical humain (de Mme Henriette Lacks) (52).

En 1961, Hayflick et Moorhead ont découvert que les cellules non tumorales avaient un nombre de réplifications fini. Pour cela, ils ont réalisé une expérience sur une culture de fibroblastes embryonnaires humains *in vitro*. Ils ont prouvé que des cellules embryonnaires, cultivées avec les meilleures conditions possibles, arrêtaient de se diviser au bout d'une cinquantaine de réplifications et mouraient. Cette limite du nombre de réplifications est une propriété inhérente à chaque type cellulaire, on parle de « limite de Hayflick » (52). Cette limite de réplication cellulaire est liée au raccourcissement des télomères. En dessous d'un seuil de répétitions télomériques, les cellules ne peuvent plus se diviser et rentrent en sénescence (52).

Hayflick propose ainsi une hypothèse alternative quant au rôle des télomères dans le vieillissement. Il considère que le raccourcissement des télomères est l'équivalent moléculaire de la détermination de la longévité. Selon lui, le but de toute espèce est la reproduction et une fois que cet objectif est atteint, la survie d'un individu au-delà de ce point constitue une période de longévité. L'état de survie au-delà du succès reproductif constituerait une période durant laquelle les processus de développement sont terminés et la capacité à maintenir ces systèmes diminue. La notion principale suggérée par Hayflick est que les événements qui se produisent au-delà de cette période augmentent la probabilité de décéder, c'est-à-dire qu'il y a une augmentation des troubles moléculaires pour lesquels les processus de réparation échouent de plus en plus à les corriger. Pour étayer son propos il fait ainsi référence à la deuxième loi de la thermodynamique selon laquelle l'entropie de tout système augmente avec le temps. Ainsi, un désordre moléculaire croissant se produit dans les cellules normales lorsque les télomères raccourcissent et *in vivo*, conduisent à une augmentation de la survenue de pathologies ou à la mort (52).

III.4.3. La protection télomérique

La structure ainsi que la séquence nucléoprotéique du télomère lui permettent de ne pas être reconnu comme une cassure du double brin d'ADN. En effet, McClintock a démontré que la suppression du télomère par cassure double brin sur un chromosome entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. En revanche, si la séquence télomérique est artificiellement replacée au niveau du site de coupure, la viabilité cellulaire est restaurée. On distingue ainsi deux types d'extrémités chromosomiques : les extrémités stables, qui correspondent aux télomères et les extrémités instables, créées par les cassures double brin de l'ADN. Les télomères sont donc des extrémités naturelles et non délétères (34).

Les télomères, notamment via leur complexe Shelterin, évitent l'activation de trois enzymes de réponse aux dommages de l'ADN : ATM, ATR et PARP-1 (« Poly ADP-ribose polymerase 1 ») et bloquent 4 voies de signalisation de réponse aux dommages de l'ADN : les voies classique et alternative de la jonction non homologue des extrémités (NHEJ), la recombinaison homologue (HDR) et l'hyper résection (Tableau III) (49).

Tableau III : Tableau récapitulatif des voies de réparation de l'ADN qui sont inhibées par le complexe Shelterin, de la sous-unité impliquée et du mécanisme d'action (49)

DDR pathway	Shelterin subunit(s)	Mechanism
ATM kinase	TRF2 (TIN2)	t-loop
ATR kinase	POT1a (POT1b)	RPA exclusion
PARP1	TRF2, TIN2	Branched-DNA binding, ?
c-NHEJ	TRF2	t-loop (iDDR, Rap1)
alt-NHEJ	TRF2 (TIN2, POT1a/b)	t-loop, PARP1 repression, ?
HDR	POT1a or POT1b + Rap1	?, ?
Hyper-resection	POT1a/b, TRF2	Repression of ATM/ATR

III.4.3.1. Répression de la voie Ataxia-Telangiectasia-mutated (ATM)

La kinase ATM est une menace pour l'intégrité télomérique. Son activation induit une réponse aux dommages de l'ADN qui implique un arrêt du cycle cellulaire et éventuellement la sénescence ou l'apoptose. La kinase ATM est activée lors de l'interaction de son capteur MRN (Mre11/Rad50/Nbs1) avec une cassure du double brin d'ADN (49).

TRF2 est nécessaire pour empêcher l'activation d'ATM au niveau du télomère. La participation de TRF2 dans la formation de la boucle T pourrait expliquer le fait que cette voie n'est pas activée. Bien que le complexe MRN puisse reconnaître les extrémités télomériques, il ne peut le faire lorsqu'elles sont séquestrées dans la boucle T. D'autres hypothèses, non démontrées, reposent sur la possible compaction de l'ADN par TRF2 qui bloquerait la reconnaissance par MRN ou l'inhibition de la kinase ATM directement par TRF2. Ces mécanismes semblent peu probables car ils devraient également empêcher l'activation de la DDR lors d'une coupure dans le télomère et pas uniquement à l'extrémité de celui-ci (49).

III.4.3.2. Répression de la voie Ataxia telangectasia and Rad3-related (ATR)

La kinase ATR est activée par deux voies distinctes. La première implique la liaison de la RPA à l'ADN simple brin et à l'attachement du complexe 9-1-1 (Rad9-Hus1-Rad1) recruté par Rad17 au niveau de la région double brin-simple brin. La kinase ATR se lie au RPA par l'intermédiaire de ATRIP et est activée lorsque la protéine TopBP1 interagit avec le complexe 9-1-1. De façon minoritaire, ETAA1 peut également activer la kinase ATR en se liant à ATR/ATRIP et RPA indépendamment de TopBP1, Rad17 et 9-1-1 (49).

Au sein du complexe Shelterin, c'est la protéine POT1 qui permet de réprimer la signalisation ATR. En se liant à l'extrémité simple brin du télomère, POT1 empêche l'accès à RPA et donc l'activation de la voie ATR. Cette inhibition médiée par POT1 nécessite qu'elle soit intégrée au sein du complexe Shelterin ; à savoir qu'elle soit liée à TPP1, elle-même liée à TIN2 (49).

III.4.3.3. Répression de PARP1 (« Poly(ADP-ribose) polymerase 1 »)

PARP1 est une menace potentielle pour les télomères car ils contiennent un site d'activation PARP1. La PARsylation des protéines télomériques médiée par PARP1 peut nuire au fonctionnement des télomères en rajoutant des charges négatives pouvant interférer, entre autres, avec la liaison à l'ADN. Elle favorise également le clivage de la boucle T et la jonction alternative non homologue des extrémités (49).

La liaison de PARP1 aux télomères est inhibée par TRF2 et TIN2. On suppose que TRF2 masque le site d'activation de PARP1 grâce aux ramifications de son domaine de liaison à l'ADN. En revanche, le mécanisme d'action de TIN2 n'est pas connu (49).

III.4.3.4. Inhibition de la jonction classique d'extrémités non homologues (c-NHEJ)

La formation de chromosomes dicentriques par fusion télomère-télomère est une grande menace pour l'intégrité du génome car ils peuvent donner lieu à de nombreux réarrangements. La c-NHEJ est médiée par l'hétérodimère Ku70/80, un complexe en forme d'anneau qui se place au niveau des extrémités de l'ADN et les rassemble. C'est ensuite l'ADN ligase, complexée à XRCC4 et à d'autres facteurs, qui réalise la ligature (49).

Au sein du complexe Shelterin, c'est la protéine TRF2 qui permet de prévenir cette fusion télomérique. La suppression de la protéine TIN2 provoque également ces jonctions entre télomères par déstabilisation de TRF2. C'est par le biais de la formation de la boucle T que TRF2 empêche la NHEJ, car dans cette conformation, l'extrémité télomérique n'est tout simplement pas accessible à Ku70/80 (49).

III.4.3.5. Inhibition de la jonction alternative d'extrémités non homologues (alt-NHEJ)

Bien que ce mécanisme soit mineur, le complexe Shelterin est également capable de l'éviter, comme la c-NHEJ. La alt-NHEJ est initiée quand une transition 5' double brin-simple brin active PARP1. La PARsylation des protéines à proximité crée une plateforme de liaison pour l'ADN ligase et l'ADN polymérase. Si deux extrémités télomériques 3' ont une légère homologie de séquence, l'activation de PARP1, la synthèse d'ADN par la polymérase et la liaison par la ligase aboutissent à la NHEJ alternative (49).

Une homologie de séquences minime (une ou quelques paires de bases) suffit. Ce phénomène entre en compétition avec la c-NHEJ mais reste très largement minoritaire (49).

De même que dans la c-NHEJ, la protéine TRF2 inhibe ce phénomène en formant la boucle T mais d'autres composants semblent également impliqués. TIN2 est très probablement un autre répresseur pouvant limiter l'accumulation de PARP1 et donc l'alt-NHEJ. TPP1 ou POT1 pourraient également être impliqués (49).

III.4.3.6. Inhibition de la réparation par recombinaison homologue (HDR)

Ce phénomène engendre des échanges de télomères entre des chromatides sœurs. Il ne pose pas de problème tant que la longueur des télomères n'est pas modifiée et que l'échange est équivalent. En revanche, si l'échange est inégal, une cellule fille pourrait hériter d'un télomère raccourci, ce qui réduirait sa durée de vie répllicative (49).

C'est Ku70/80 qui permet d'inhiber la recombinaison homologue entre télomères en association avec RAP1 et POT1 mais le mécanisme exact n'est pas connu (49).

III.4.3.7. Répression de l'hyper-résection de l'extrémité 5'

Alors que la résection de l'extrémité 5' est nécessaire pour rétablir la structure télomérique, une résection excessive représente un risque. En l'absence du complexe Shelterin, le brin riche en C devient vulnérable aux facteurs nucléolytiques agissant au niveau des cassures de l'ADN double brin, ce qui active les voies ATM et ATR (49).

L'hyper résection en 5' est donc inhibée essentiellement en évitant l'activation de la réponse aux dommages de l'ADN. Ainsi, tant que TRF2 et POT1 assurent l'inhibition des voies ATM et ATR, la résection n'est pas initiée (49).

III.5. Mécanismes de maintien de la longueur des télomères

III.5.1. La Télomérase

III.5.1.1. Structure

La télomérase est une ribonucléoprotéine composée de la protéine TERT (« Telomerase Reverse Transcriptase ») qui est une ADN polymérase ARN dépendante et d'une sous-unité matrice d'ARN appelée TERC (« Telomerase RNA component »). L'extrémité 3' du TERC possède un domaine H/ACA qui permet de lier le complexe protéique formé par DKC1 (dyskérine), NHP2 (« Non-histone protein 2 »), NOP10 (« Nucleolar protein 10 »), GAR1 (« Encoding H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1 ») et TCAB1 (« Telomerase cajal body protein 1 »). D'autres protéines comme la reptine et la pontine, qui sont des ATPases, semblent également intervenir dans l'assemblage de la télomérase en interagissant avec TERT et la dyskérine. Elles faciliteraient l'assemblage de TERT avec TERC et la dyskérine ou permettraient un remodelage du complexe télomérasique. TERC et TERT sont liées par les domaines Pseudoknot et CR4-CR5 (Figure 24) (41).

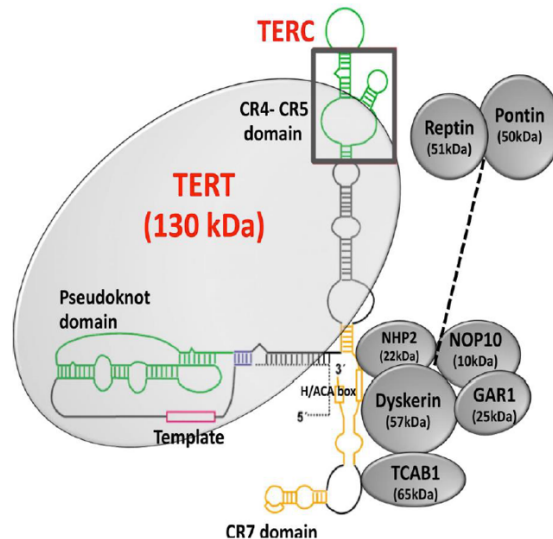


Figure 24 : Structure de la télomérase (53)

III.5.1.2. *Fonction*

La télomérase permet de conserver une longueur de télomères suffisante lors des divisions cellulaires en prolongeant le télomère et donc limite la perte progressive de séquences d'ADN à chaque cycle de réplication (33).

TERT est recrutée lors de la phase S du cycle cellulaire et se lie à la protéine TPP1 du complexe Shelterin. L'élongation des télomères est donc coordonnée avec leur réplication semi-conservative (41). Dans les cellules non cancéreuses, les télomères sont allongés par une seule télomérase qui synthétise en moyenne 60 nucléotides (multiples de la séquence TTAGGG) (40).

La télomérase utilise son propre ARN en tant que matrice. Cet ARN se lie à l'ADN télomérique simple brin grâce à sa séquence 5'-CUAACCCUAAC-3' et la sous-unité TERT catalyse ensuite l'élongation du brin 3'. La télomérase allonge uniquement le brin G mais elle est couplée avec l'activité de polymérases qui permettront par la suite d'allonger le brin C (40).

Le nombre de répétitions ajoutées par la télomérase est très contrôlé dans le but de maintenir un équilibre et toute perturbation de cette homéostasie peut entraîner différentes maladies. Cette régulation s'effectue grâce à des protéines liées aux télomères qui permettent de bloquer la télomérase et d'allonger préférentiellement les télomères courts. Ainsi, l'activité télomérase diminue parallèlement à l'allongement des télomères (54). Ce modèle implique deux états différents du télomère :

- « Ouvert » : la télomérase peut réaliser l'élongation
- « Fermé » : l'accès est bloqué à la télomérase ; les télomères longs recrutent plus de TRF1 et TRF2 pour former une boucle T non accessible

La télomérase est exprimée dans les cellules souches, les cellules germinales, la plupart des cellules cancéreuses et dans des lignées cellulaires immortalisées, et de très rares types cellulaires somatiques comme les lymphocytes activés ou les cellules de la Granulosa (33).

Son importance est cruciale dans les cellules tumorales qui présentent une activité télomérase supérieure à celle des cellules saines. Ceci empêche le raccourcissement de leurs télomères et inhibe la sénescence cellulaire. Ces observations illustrent ainsi le contraste entre la sénescence cellulaire (pas d'activité télomérase et raccourcissement télomérique) et l'immortalité cellulaire (activité télomérase et longueur stable des télomères) (33).

III.5.1.3. *Réactivation de la télomérase*

L'oncogenèse implique généralement une importante prolifération cellulaire et donc une absence de raccourcissement des télomères. C'est pourquoi environ 85% des cancers humains s'accompagnent d'une augmentation de l'activité télomérase (55). Cette réactivation intervient via différents mécanismes génétiques et épigénétiques incluant l'amplification de *TERT* et de *TERC*, les réarrangements génomiques de *TERT*, des mutations somatiques dans le promoteur de *TERT* et des modifications épigénétiques par méthylation du promoteur de *TERT* (41).

Le gène *TERT* se situe au niveau du chromosome 5p15.33 et le gène *TERC* sur le chromosome 3q26.3. Ces régions sont fréquemment amplifiées dans les cancers et cette amplification conduit à une augmentation de l'expression de *TERC* et *TERT* (41).

Les réarrangements génomiques constituent un autre mécanisme responsable d'une surexpression de *TERT*. Les réarrangements à 50 kb en amont du site de transcription de *TERT* peuvent conduire à une juxtaposition de super-amplificateurs, provoquant un remodelage de la chromatine et par conséquent une expression accrue de *TERT* (41).

Les mutations du promoteur de *TERT* constituent des altérations génétiques fréquentes qui conduisent à la réactivation de la télomérase. Ces mutations créent de nouveaux sites de liaison pour des facteurs de transcription et favorisent la tumorigenèse via un mécanisme en 2 étapes. Première étape, ces mutations empêchent le raccourcissement des télomères, prolongeant ainsi la durée de vie de la plupart des cellules de la tumeur. Au cours de la deuxième étape, les télomères extrêmement courts de certaines cellules tumorales (nécrotiques) stimulent l'activité télomérase pour soutenir la prolifération cellulaire globale (41).

Les nouvelles méthodes de séquençage ont permis de caractériser une région génomique particulière au sein du promoteur de *TERT* englobant 52 sites CpG, connue sous le nom de THOR (« *TERT* hypermethylated oncological region »). THOR est hyperméthylée dans les tumeurs malignes et hypométhylée dans les tissus normaux. La méthylation de l'ADN contrôle la liaison d'activateurs et d'inhibiteurs de la transcription sur le promoteur de *TERT*. L'hyperméthylation empêche la liaison des inhibiteurs ce qui entraîne une surexpression de *TERT* et une augmentation de l'activité télomérase (41).

III.5.1.4. *Méthodes de mesure*

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer l'activité télomérase de divers échantillons (cellules, tissus, populations cellulaires mixtes). Chacune présente ses avantages et ses inconvénients, mais la méthode TRAP est la plus couramment utilisée (56).

La méthode TRAP (« Telomere repeat amplification protocol ») permet de mesurer l'activité de la télomérase et peut être divisée en 3 étapes : allongement des amorces par la télomérase, amplification de l'ADN synthétisé et détection (56).

A l'étape d'élongation, des répétitions télomériques sont ajoutées par la télomérase à une amorce oligonucléotidique imitant le télomère (TS). Ensuite, l'ADN synthétisé par la télomérase est amplifié par PCR de à l'aide d'amorces spécifiques (ACX). A ce stade, différents marqueurs peuvent être incorporés à l'ADN tels que des marqueurs radioactifs, fluorescents. Cette étape est suivie par l'étape de détection ; dans la méthode historique il s'agissait d'une séparation électrophorétique des produits de PCR puis détection sur gel de polyacrylamide à l'aide d'un marqueur radioactif qui a été introduit lors de la réaction (Figure 25) (56).

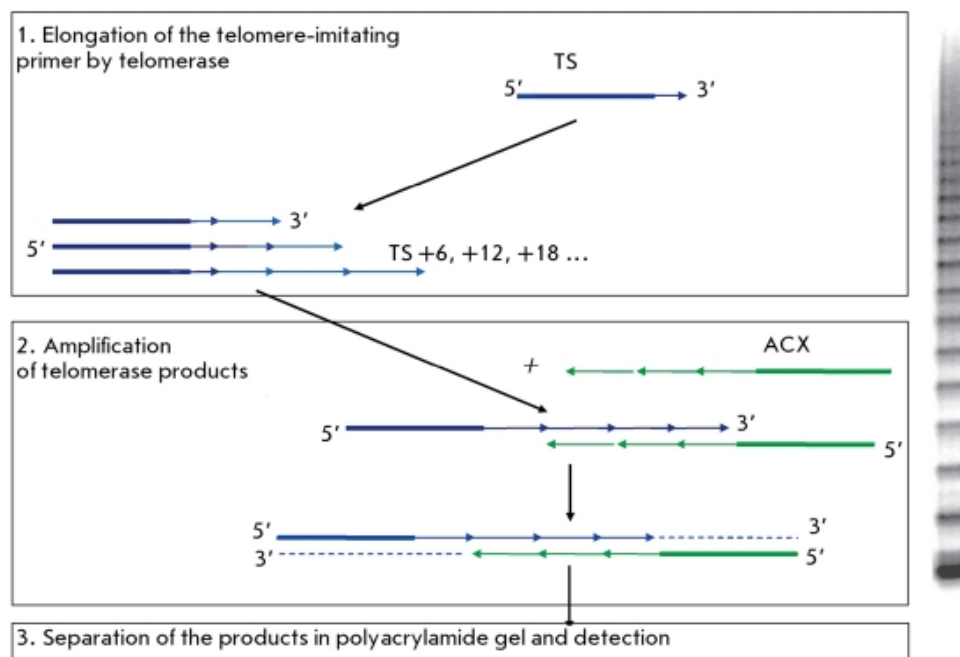


Figure 25 : Protocole historique d'amplification des répétitions télomériques (TRAP) (56)

Ces produits de PCR peuvent ensuite être détectés selon plusieurs méthodes (56) :

- Qualitatives : évaluation de la radioactivité totale
- Semi-quantitatives : fluorescence, scintillation, photodétection, ELISA, électrochimie
- Quantitatives : PCR en temps réel

III.5.2. « Alternative lengthening of telomeres » (ALT)

Ce mécanisme de recombinaison est essentiellement décrit dans les cellules cancéreuses et les cellules immortalisées, mais on ne sait pas clairement s'il a un rôle dans les cellules somatiques normales et les cellules germinales males. Les cellules cancéreuses ALT-positives sont capables de maintenir la longueur de leurs télomères en l'absence de télomérase. Ce mécanisme d'allongement alternatif engendre une grande hétérogénéité de longueur, certains télomères étant extrêmement longs (>50 kb) et d'autres très courts (<5 kb) (55).

Dans les cellules ALT positives, on retrouve énormément de séquences télomériques extra chromosomiques prenant majoritairement une forme circulaire double brin ; d'où le nom de « t-circles » (« Telomeric circles »). Par ailleurs, l'allongement des télomères atteint toujours un plateau indiquant que l'organisme met en place un mécanisme de « coupe des télomères ». On suppose donc que les télomères trop longs sont raccourcis par coupure de l'ADN au niveau de la jonction avec la boucle télomérique formant ainsi les « t-circles ». L'abondance de cette forme d'ADN extra chromosomique dans les cellules ALT serait donc le résultat d'un mécanisme servant à limiter le phénomène d'ALT allongeant les télomères (55).

Bien qu'il soit admis que l'allongement des télomères dans les cellules ALT nécessite une étape de recombinaison, le mécanisme précis reste incertain. Deux modèles pourraient coexister (Figure 26) (55):

- Le modèle T-SCE inégal : les T-SCE (« Telomeric-sister chromatids exchange ») se produisent plus fréquemment dans les cellules ALT mais l'explication moléculaire reste inconnue. Des T-SCE inégaux se produiraient donc entre une cellule avec télomère long et une cellule avec télomère court ;
- Le modèle de réplication de l'ADN dépendante d'une recombinaison homologue : suite à une recombinaison, il y aurait synthèse d'une nouvelle séquence d'ADN télomérique en utilisant un télomère adjacent comme modèle.

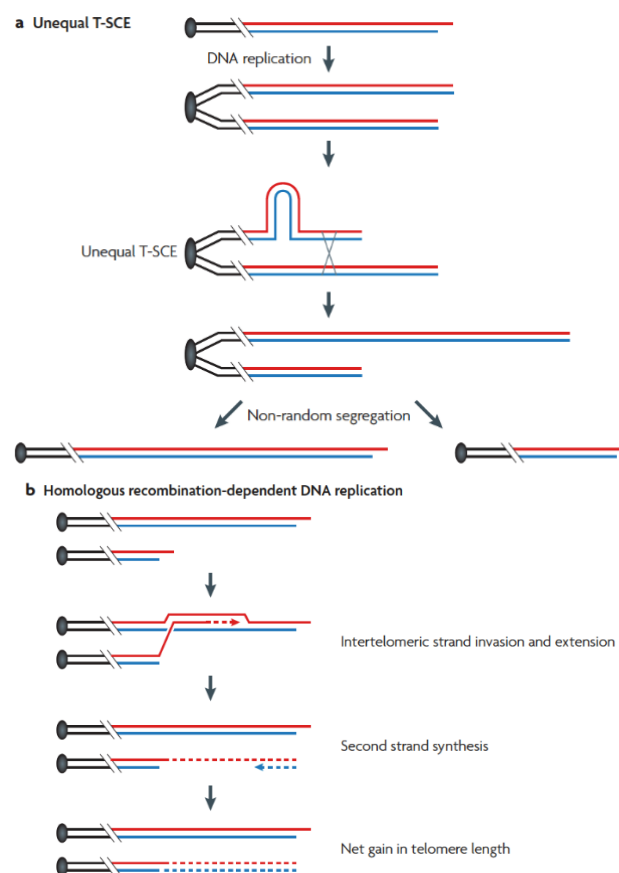


Figure 26 : Représentation schématique des 2 modèles d'allongement alternatif des télomères : (a) T-SCE inégal et (b) Réplication d'ADN dépendante d'une recombinaison homologue (55)

Ce mécanisme requiert la présence d'un certain nombre de protéines, qui sont aussi présentes dans les cellules normales car elles sont nécessaires pour la recombinaison et la réparation de l'ADN dans des contextes non cancéreux. Les phénomènes inhibant l'ALT dans les cellules normales sont mal connus, mais le complexe Shelterin pourrait y jouer un rôle inhibiteur (55).

III.6. Méthodes de mesure de la longueur des télomères

Plusieurs méthodes permettent de mesurer la longueur des télomères. Les méthodes de mesure les plus couramment utilisées fournissent généralement des informations sur la longueur moyenne des télomères. Comme ce sont les télomères les plus courts qui déclenchent les réponses aux dommages de l'ADN conduisant à la sénescence cellulaire, cette longueur minimale des télomères représente un biomarqueur clé. Une nouvelle technique (TeSLA) a été développée afin de fournir des informations quantitatives concernant les télomères les plus courts (57).

III.6.1. Q-PCR (« Quantitative polymerase chain reaction »)

En mesurant le signal des télomères (T) par rapport à un signal référence d'un gène à une seule copie (S), on obtient le ratio T/S. Ce ratio est proportionnel à la longueur moyenne des télomères et permet donc de déterminer la longueur relative des télomères (Figure 27) (57).

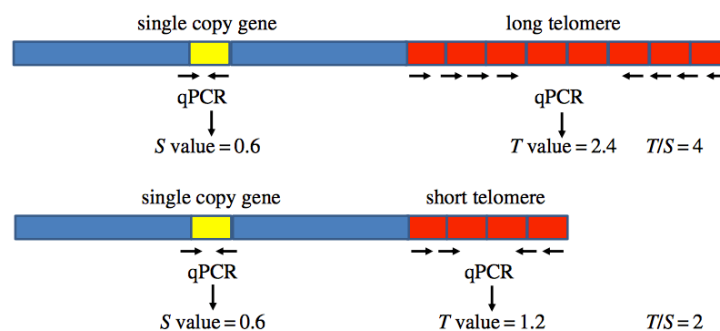


Figure 27 : Principe de la méthode de mesure des télomères par Q-PCR (57)

La Q-PCR est relativement facile à réaliser et ne nécessite pas une grande quantité d'ADN (environ 50 ng). Elle peut être appliquée à un format haut débit et est donc largement utilisée dans les études de populations importantes (57).

Cependant, cette technique ne fournit qu'une quantification relative et les données ne peuvent pas être présentées en valeurs absolues (en kb) sauf si elles sont comparées à une lignée cellulaire de référence dont on connaît la longueur moyenne des télomères grâce à une autre méthode. Il semblerait aussi qu'il existe une forte variabilité (CV intra essai $\approx 10\%$) limitant fortement la comparaison de résultats entre différents laboratoires. Par ailleurs, cette technique n'est applicable que dans des échantillons diploïdes et avec un caryotype stable car dans les cellules cancéreuses, le gène à copie unique pourrait être dupliqué ou absent, faussant ainsi les résultats (57).

III.6.2. Analyse TRF (« Terminal restriction fragment »)

Cette technique est basée sur le fait que l'on connaisse la séquence des télomères et est considérée comme étant le « Gold standard ». L'analyse TRF utilise une sonde marquée (TTAGGG)_n et mesure l'intensité des télomères sur une membrane de « Southern » pour déterminer la longueur moyenne (57).

L'ADN génomique est digéré en petits fragments grâce à une combinaison d'enzymes de restriction reconnaissant 4 paires de bases. Cette technique permet de conserver les séquences télomériques (TTAGGG)_n intactes car elles ne contiennent pas de site de reconnaissance par les enzymes utilisées. Ainsi, chacun des 92 télomères présents dans les cellules humaines diploïdes seront épargnés par la digestion, bien que de longueurs variables, tandis que le reste de l'ADN génomique se retrouve sous forme de petits fragments. Cependant, les régions sous télomériques étant composées de répétitions de télomères dégénérées avec des séquences adjacentes sans sites de restriction, chaque TRF contiendra une certaine quantité de séquences non télomériques (appelées région X) (57).

Après la digestion de l'ADN, on réalise une électrophorèse sur gel et les séquences télomériques peuvent être détectées par transfert de « Southern ». On obtient ainsi une membrane avec des télomères de longueurs variables détectés par des sondes marquées. La longueur moyenne est ensuite déterminée par quantification de l'intensité de l'ADN marqué et par comparaison à une échelle de fragments d'ADN dont on connaît la taille (Figure 28) (57).

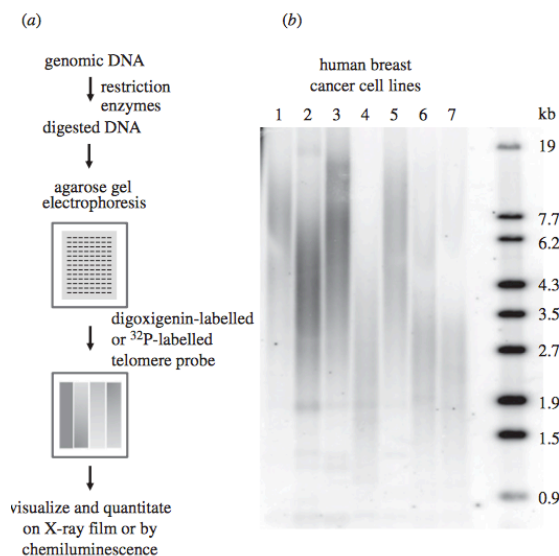


Figure 28 : (a) Méthodologie de la méthode TRF et (b) exemple de résultats de longueurs de télomères dans des cellules humaines de cancer du sein (57)

Cependant, cette technique requiert de grandes quantités d'ADN (environ 3 mg) et est très chronophage, ce qui limite son utilisation pour les études sur de grandes populations. De plus, les télomères courts (≤ 2 kb) sont difficiles à détecter et à quantifier. Par ailleurs, les résultats peuvent considérablement varier en fonction du panel d'enzymes de restriction utilisé, rendant difficile la comparaison des résultats entre laboratoires et entre les différentes études publiées (57).

III.6.3. Méthodes utilisant la Q-FISH (« Quantitative fluorescence in situ hybridization »)

Les télomères peuvent également être mesurés avec des techniques utilisant la Q-FISH et qui sont basées sur des principes similaires. La Q-FISH en interphase requiert un microscope pour déterminer l'intensité de fluorescence des télomères après hybridation avec une sonde fluorescente de séquence (CCCTAA₃).

La même technique peut être utilisée sur des chromosomes en métaphase, permettant d'obtenir une plus grande précision mais elle nécessite que les cellules prolifèrent (Figure 29). La Q-FISH haut débit dérive de la méthode de mesure en interphase mais permet d'utiliser des procédures automatisées sur des plaques de 384 puits (57).

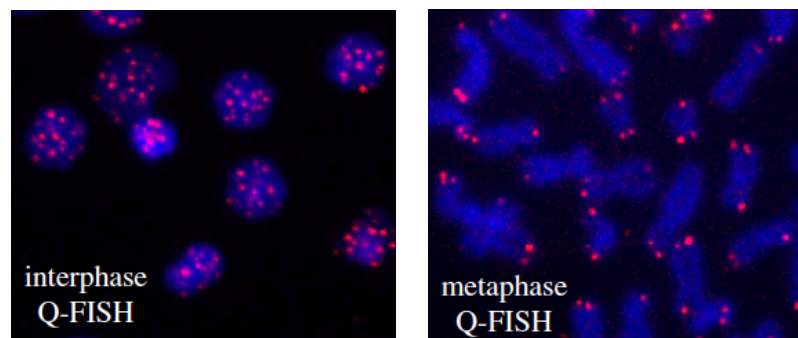


Figure 29 : Q-FISH télomériques réalisées sur des cellules en interphase et en métaphase (57)

En raison de la limite d'hybridation des sondes, la Q-FISH ne permet pas de détecter les signaux fluorescents des télomères qui ont un nombre de répétitions en dessous du seuil d'hybridation de la sonde ; ces extrémités chromosomiques sont appelées « telomere-free ends »). A l'inverse, des signaux très intenses en FISH pourraient représenter des amas télomériques mais la quantification ne permet pas de les différencier. Un autre inconvénient de cette technique est que la sonde peut se lier à certaines séquences télomériques interstitielles situées à l'écart des télomères ; générant ainsi des faux positifs (57).

En dépit du fait qu'il existe des limites à cette méthode de mesure, elle a été utilisée dans des études clés qui ont permis, entre autres, de démontrer que ce sont les télomères les plus courts et non la longueur moyenne qui sont critiques pour la viabilité cellulaire (57).

L'analyse TIF (« Telomere dysfunctional induced foci ») est dérivée de la Q-FISH. Elle utilise, en plus de la sonde télomérique, un anticorps dirigé contre une protéine recrutée lors de l'activation de la réponse aux dommages de l'ADN. Comme les télomères représentent uniquement 1/6000^{ème} du génome, la probabilité que les signaux soient localisés au même endroit est très rare. Ainsi, de nombreux signaux co-localisés suggèrent qu'il existe une anomalie au niveau des télomères activant les voies de réparation de l'ADN. En revanche, cette technique ne permet pas de déterminer la longueur des télomères (57).

III.6.4. STELA (« Single telomere length analysis »)

Cette technique a été conçue afin de mesurer la longueur des télomères individuellement sur chaque chromosome. Elle combine les méthodes de PCR et Southern blot, mesurant ainsi l'élongation d'un seul télomère à l'aide d'une amorce spécifique des régions sous télomériques d'un chromosome. STELA a permis de mettre en évidence l'existence de télomères ultra courts dans les cellules humaines en sénescence (57).

Un inconvénient de STELA, est que chaque extrémité chromosomique ne dispose pas forcément d'une séquence unique permettant de réaliser une amorce spécifique d'un chromosome. Ainsi, seuls quelques télomères pouvaient être mesurés : XpYp, 2p, 11q, 12q et 17p (58).

Pour pallier à cela, l'Universal STELA (U-STELA) a été développée pour détecter tous les télomères à l'extrémité des chromosomes simultanément. Un autre inconvénient de cette technique est qu'elle ne permet pas de détecter les télomères de plus de 8 kb (57).

III.6.5. TeSLA (« Telomere shortest length assay »)

Cette technique a été développée dans le but de répondre au besoin d'avoir une méthode plus sensible, plus précise et non biaisée afin de mesurer la longueur de tous les télomères, y compris les plus courts, sans détecter les séquences télomériques interstitielles. Elle nécessite de petites quantités d'ADN (< 1 µg) et utilise une stratégie de digestion améliorée avec analyse en Southern blot à l'aide d'une sonde hyper-sensible marquée et d'un logiciel de traitement d'image. TeSLA permet ainsi de mesurer automatiquement la distribution des longueurs de télomères de 1 à 18 kb environ sans détecter les régions interstitielles (57).

Cette méthode très sensible permet d'obtenir une dynamique des télomères au cours de divers processus cellulaires et de détecter des changements, même minimes, qui surviendraient dans un court laps de temps. Les principales limites de cette technique sont qu'elle est à faible débit et qu'elle n'est pas adaptée pour mesurer les télomères les plus longs (57).

III.7. Longueur des télomères

III.7.1. Génétique des télomères

La longueur des télomères dans la descendance est co-déterminée par la longueur des télomères chez les parents, mais les mécanismes responsables de cette corrélation restent mal identifiés (28,48). Son héritabilité est élevée, avec des estimations variant entre 44 et 80% selon les auteurs (60). Une méta-analyse regroupant 19 713 sujets estime que 70% de la longueur des télomères sont hérités de la mère via un mécanisme lié à l'X et à l'ADN mitochondrial (61). Par ailleurs, l'effet de l'âge paternel à la conception a été largement étudié, suggérant ainsi que les nouveau-nés issus de pères plus âgés ont des télomères statistiquement plus longs (41).

On suppose que ce phénomène est un mécanisme de plasticité intergénérationnelle dans lequel la longueur des télomères de la descendance est programmée pour faire face à un environnement dans lequel la reproduction a lieu à un âge avancé (62).

D'un autre côté, l'âge maternel semble avoir une moindre influence sur la longueur des télomères dans la descendance (62).

La longueur des télomères est un paramètre complexe qui est déterminé par différents loci situés sur des autosomes et sur le chromosome X.

Chez la levure, plus de 150 gènes seraient potentiellement impliqués dans la régulation de la longueur des télomères (63). Grâce à des études d'associations pangénomiques conduites sur de très grandes cohortes, 11 loci associés à la longueur des télomères ont été identifiés, comportant des variants de plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans l'homéostasie télomérique, aussi bien que d'autres gènes. Par exemple, les gènes codant pour *TERC*, *TERT*, *CTC1* ou *OBCF1* codent pour des protéines directement impliquées dans la régulation de la longueur des télomères. Mais il y a également des gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse aux dommages de l'ADN (*DCAF4*) ou dans la régulation transcriptionnelle (*ZNF208*) (60,64,65).

Les deux principaux variants génétiques associés aux variations de la longueur des télomères sont rs3772190 en 3q26.2 (*TERC*) et rs4387287 en 10q24.33 (*OBCF1*). Cependant, les résultats obtenus dans ces vastes études génétiques n'ont permis d'expliquer qu'une très petite partie des variations génétiques observées dans la longueur des télomères : <1% et 2,26% pour rs3772190 et rs4387287 respectivement (65).

Les études fonctionnelles fournissent une approche génétique pour étudier la corrélation entre longueur des télomères et pathologies liées à l'âge. Cependant, établir un lien de causalité entre les variants génétiques et le risque de survenue de maladie est très complexe car les facteurs environnementaux et le style de vie influencent également la longueur des télomères via des phénomènes épigénétiques (41).

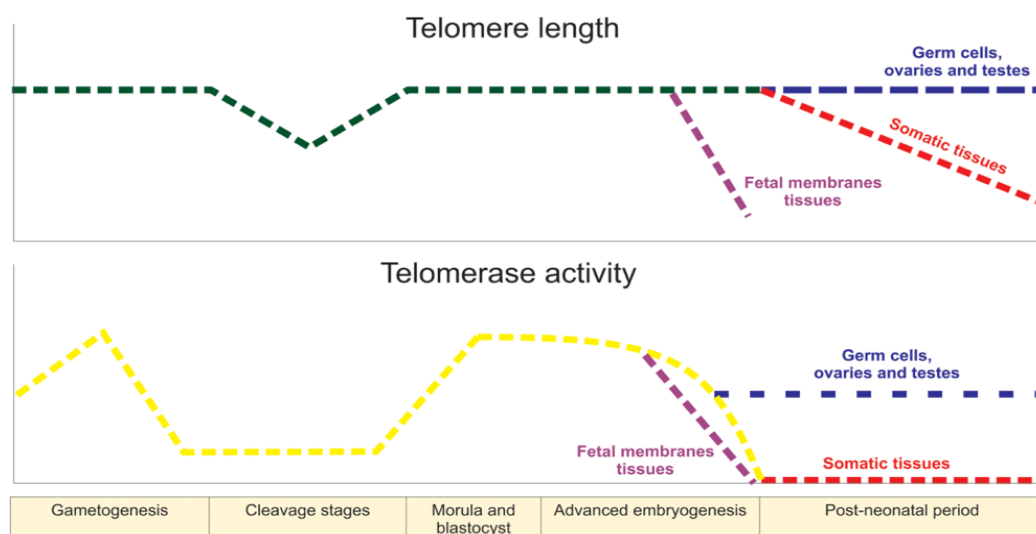
III.7.2. Dynamique des télomères

La longueur des télomères dépend de l'âge, du sexe, et de l'âge paternel à la conception. Elle est diminuée en cas de stress oxydant en lien avec un taux élevé de radicaux libres. Les télomères sont plus longs chez les femmes que chez les hommes en raison des œstrogènes qui ont des propriétés anti-oxydantes en stimulant la manganèse superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase au travers de l'activation de voies MAP kinase et NF-κB. Par ailleurs, les œstrogènes activent directement et indirectement la transcription de la télomérase via le promoteur de *hTERT* (33).

La dynamique des télomères varie d'un tissu à l'autre mais également durant les étapes de maturation et de développement comme l'illustre la Figure 30. Les tissus modulent la longueur de leurs télomères et leur activité télomérase en fonction des besoins en mitoses durant les différentes étapes du développement (66).

Par ailleurs, en plus de différer d'un tissu à l'autre, la longueur des télomères varie également entre les cellules et même entre les chromosomes d'une même cellule. Des études ont ainsi rapporté des télomères plus courts au niveau des bras 17p, 19p et 20q des chromosomes, alors que ceux en 5p, 3p, 4q et 1p seraient plus longs (66).

Des variations dans la longueur des télomères au niveau de bras chromosomes homologues ont également été décrites (67).



La culture de cellules humaines a permis de mettre en évidence différents taux d'attrition télomérique, impliquant que ce taux n'est pas fixe mais pourrait être sujet à modification. Cependant, très peu de données sont connues sur ce qui contrôle le raccourcissement des télomères dans les cellules humaines. Une étude a démontré que la taille du surplomb 3' simple brin est directement proportionnelle au taux de raccourcissement des télomères, variant d'environ 300 nucléotides dans des cellules perdant 100 paires de bases par division à 150 nucléotides dans des cellules perdant moitié moins de bases. Ceci suggère que des mécanismes d'attrition télomérique qui n'affecteraient pas cette partie du télomère, tels que des dommages oxydatifs, sont peu susceptibles de contribuer de manière significative au raccourcissement des télomères (68).

Pour chaque type cellulaire, il est difficile de donner une longueur moyenne des télomères de chaque chromosome. En effet, les valeurs énoncées varient considérablement d'une étude à l'autre du fait des différentes techniques utilisables afin de mesurer la longueur des télomères, mais également à cause des conditions pré-analytiques (69).

III.7.3. *In utero*

A l'heure actuelle, les informations concernant la dynamique des télomères lors des premières semaines de gestation sont peu nombreuses. Cheng *et al.* ont montré qu'entre les semaines 6 et 7, la longueur des télomères diminue rapidement puis l'attrition est ralentie entre les semaines 8 et 11 et reste ensuite constante. Ainsi, la longueur des télomères dans le fœtus de plus de 11 semaines est identique à celle d'un bébé né à terme (70). Il a par ailleurs été démontré que la longueur des télomères était identique dans les différents tissus (71).

Quant à la télomérase, son activité est maximale à la 6^{ème} semaine et décroît progressivement tout au long de la grossesse (70).

III.7.4. Dans les cellules somatiques

On estime que les télomères mesurent entre 5 et 10 kb dans les cellules somatiques, cependant cette moyenne varie entre les cellules, les tissus, les organes et également entre les individus (33). Bien que la longueur des télomères diffère d'un tissu à l'autre, il a été démontré que le raccourcissement était identique (72). Dans ces cellules, la longueur des télomères décroît à chaque division d'environ 50 à 200 pb (33). L'attrition télomérique est plus importante durant les premières années de vie puis ralentit à l'âge adulte, distinguant au moins 2 phases distinctes. La première va de la naissance jusqu'à environ 4 ans et se caractérise par un raccourcissement rapide des télomères (- 1 kb/an), en parallèle de la croissance de l'enfant. Il y a ensuite une stabilisation apparente jusqu'à l'âge adulte (environ 20 ans). La phase finale est représentée par un déclin plus progressif de la longueur des télomères jusqu'à la mort (73).

Chez les nouveau-nés, il n'existe pas de différence significative de la longueur des télomères en fonction du sexe. Cependant, une différence homme-femme survient à la puberté en raison de l'imprégnation œstrogénique féminine (33).

Dans les tissus somatiques, l'activité télomérase s'arrête et les télomères régressent progressivement tout au long de la vie (66). La longueur des télomères dans ces tissus varie en fonction de leur histoire répliquative. En effet, des tissus avec un faible index de prolifération comme le muscle squelettique et la graisse ont des télomères plus longs que ceux ayant un index de prolifération élevé tels que la peau et le système hématopoïétique. Ainsi, le raccourcissement des télomères dans les leucocytes est considérablement plus rapide durant les stades précoces du développement humain qu'à l'âge adulte à cause de la prolifération du système hématopoïétique (74).

III.7.5. Dans les spermatozoïdes

Dans les cellules germinales masculines, les télomères s'allongent durant la spermatogenèse grâce à l'activité de la télomérase qui permet de maintenir une longueur suffisante des télomères durant leur maturation (33,75).

Une étude a estimé l'activité télomérase dans les cellules germinales masculines à tous les stades de la spermatogenèse en mesurant la composante ARN de l'enzyme au niveau des tubules séminifères. Les auteurs ont ainsi constaté une expression maximale de l'enzyme dans les spermatogonies avec une décroissance aux stades spermatocytes et spermatides. En revanche, aucune expression n'est retrouvée dans les spermatozoïdes (76).

Les télomères dans les spermatozoïdes humains mesurent entre 6 et 20 kb avec une grande variabilité interindividuelle, ainsi qu'une variabilité dans la longueur des télomères de spermatozoïdes issus d'un même éjaculat (75). Bien qu'il soit clairement établi que la longueur des télomères décroît avec le temps dans les cellules somatiques, la dynamique télomérique dans les cellules spermatiques semble être différente. Des auteurs ont ainsi décrit que la longueur des télomères dans les spermatozoïdes augmente d'environ 135 paires de bases par an selon Baird *et al.* (77). D'autres auteurs ont également mis en évidence cette élongation des télomères dans les spermatozoïdes mais à un rythme de 57 paires de bases par an (62).

Les auteurs ont ainsi suggéré plusieurs mécanismes possibles expliquant cette observation : (1) une expression plus élevée de la télomérase dans les testicules des hommes plus âgés, (2) des télomères initialement déjà plus longs dans les spermatogonies des hommes âgés, (3) une plus faible attrition des télomères chez les hommes âgés en raison d'une moindre prolifération durant les dernières étapes de la spermatogenèse ou (4) les hommes âgés d'aujourd'hui ont été élevés dans un environnement différent, sûrement moins délétère (78).

III.7.6. Dans les ovocytes

Des auteurs ont démontré que les télomères dans les ovocytes étaient plus courts que dans les spermatozoïdes avec une longueur moyenne de 7 à 11 kb (contre 10 à 20 kb dans le spermatozoïde) (79). De plus, à l'inverse des cellules germinales masculines, les télomères dans les ovocytes raccourcissent durant leur maturation du fait de la baisse de l'activité de la télomérase ovocytaire (80). Ceci est confirmé dans l'étude de Turner et Hartshorne qui mettent en évidence des télomères significativement plus longs dans les ovocytes immatures par rapport aux ovocytes matures (80).

Pendant le processus de gamétogenèse, l'activité de la télomérase est élevée dans les ovocytes afin d'essayer de maintenir une longueur suffisante des télomères (33). Une étude sur tissu ovarien fœtal a en effet démontré que l'activité de la télomérase était détectable tout au long de la prophase de première division méiotique (81). Pendant longtemps, les chercheurs ne retrouvaient pas d'activité télomérase dans les ovocytes matures (82). Cependant, de plus récentes études avec des techniques plus sensibles ont permis de démontrer que la télomérase est active dans les ovocytes matures, mais de manière bien inférieure à celle des ovocytes immatures (83).

Des auteurs ont proposé un modèle afin de comprendre le phénotype complexe retrouvé dans les ovocytes de femmes à un âge avancé. « La théorie des télomères dans le vieillissement reproductif » comporte deux notions clés qui impactent les télomères dans la lignée germinale féminine. La première se déroule pendant les étapes de développement précoce, quand les télomères raccourcissent à chaque division mitotique lors de la multiplication des ovogonies. Les travaux de Bob Edwards, qui ont depuis été confirmés par d'autres, ont permis de démontrer que les ovocytes ovulés tardivement dans la vie d'une femme ont subi plus de cycles cellulaires durant l'ovogenèse fœtale. La seconde étape importante se situe lors de l'intervalle prolongé entre l'arrêt méiotique et l'ovulation, quand les espèces réactives de l'oxygène, inévitablement produites par le métabolisme des cellules vivantes, réduisent un peu plus les télomères ovocytaires (84).

Il a été émis l'hypothèse qu'il existe une « chaîne de production » des ovocytes au cours de la vie fœtale puisqu'ils n'arrêtent pas tous leurs mitoses simultanément au cours de l'ovogenèse, mais plutôt par vagues. En 1968, Henderson et Edwards ont proposé que l'ordre d'entrée des ovocytes en méiose dicte leur ordre d'ovulation de la puberté jusqu'à la ménopause. Ainsi, les premiers ovocytes ayant cessé de proliférer pour entrer en méiose sont également les premiers à être ovulés chez la jeune femme. A l'inverse, les derniers ovocytes à entrer en méiose durant la vie fœtale sont ovulés tardivement dans la vie de la femme (85).

Les auteurs suggèrent que les ovocytes tardivement formés ont moins de chiasma. Des chromosomes homologues sans chiasma ne se sépareront pas correctement, donnant ainsi des ovocytes déséquilibrés. La fréquence de ces derniers augmenterait donc progressivement avec l'âge puisque les ovocytes ovulés seront issus d'ovocytes générés tardivement lors de la période pré-natale. Cette hypothèse de « chaîne de production ovocytaire » est issue d'expériences réalisées par Henderson et Edwards sur des souris adultes ; ils ont observé que les ovocytes MI issus de femelles âgées avaient beaucoup moins de chiasma que ceux des jeunes femelles. Cette observation a été interprétée à la lumière d'un aspect essentiel concernant les chiasmas : il n'y a pas de perte une fois qu'ils sont formés lors de la prophase méiotique jusqu'au stade de métaphase I (85).

Par la suite, cette hypothèse a plusieurs fois été testée menant à des conclusions controversées. Cependant, aucune de ces études n'a étudié directement le principe du « first in, first out / last in, last out ». Ainsi, en 1991, Paul Polani et John Crolla ont réalisé des expériences dans le but de traquer et d'analyser des ovocytes matures dérivés d'ovocytes générés à différentes étapes de la vie fœtale et qui ont été marqués avant d'entrer en méiose. Grâce à leurs résultats, ils ont confirmé cette conclusion (86).

Par ailleurs, la baisse de la fertilité féminine liée à l'âge est attribuée au vieillissement ovarien, à savoir à la diminution de la réserve ovarienne mais également à la baisse de la qualité ovocytaire. Parmi les mécanismes sous-jacents de ce déclin de la qualité des ovocytes, le stress oxydatif est un phénomène essentiel. Le pool d'ovocytes chez la femme est présent depuis la naissance et les ovocytes qui ne sont ovulés que tardivement dans la vie reproductive sont donc exposés pendant des dizaines d'années aux espèces réactives de l'oxygène. Ces dernières sont responsables d'un dysfonctionnement mitochondrial, réduisant la synthèse d'ATP et influençant ainsi l'ensemble du fuseau méiotique responsable de la ségrégation chromosomique. Parallèlement, les ovocytes « vieillissants » perdent leurs mécanismes de protection contre les ROS : la capacité de neutralisation des ROS, les systèmes de réparation de l'ADN et les systèmes de dégradation des protéines endommagées via le protéasome et l'autophagie. Avec l'âge, il existe donc une augmentation de l'exposition aux espèces réactives de l'oxygène et une augmentation de la vulnérabilité des ovocytes conduisant à une instabilité du fuseau, des anomalies chromosomiques et un raccourcissement des télomères qui aboutissent à une diminution de la qualité ovocytaire (87).

III.7.7. Dans l'embryon

Après la fécondation, le processus d'embryogenèse débute et de nombreuses divisions se produisent pour permettre le développement du fœtus. Ceci nécessite de conserver une longueur suffisante des télomères pour permettre la formation des tissus et des organes (66).

Plusieurs études ont démontré que les télomères des embryons clivés étaient significativement plus courts que dans les blastocystes. Les auteurs ont ainsi retrouvé des télomères mesurant en moyenne 8 kb dans les embryons clivés contre 12 kb dans les blastocystes (69,83).

Certaines études ont démontré que l'activité télomérase décroît durant le stade de clivage, menant ainsi à une réduction de la taille des télomères. Plus tard, au stade morula-blastocyste, l'activité de la télomérase augmente de façon à promouvoir le processus d'élongation des télomères et ainsi permettre une multiplication cellulaire accélérée (66,83).

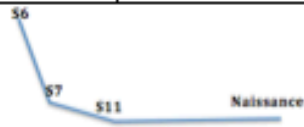
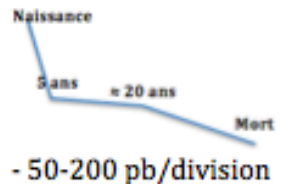
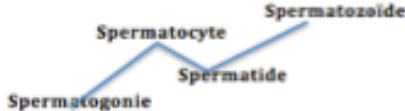
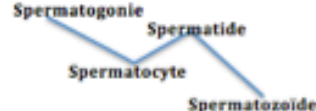
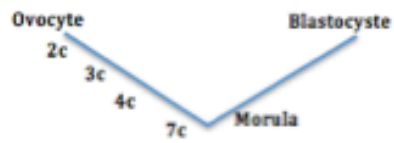
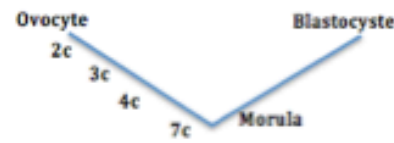
Une étude a démontré une augmentation rapide de la longueur des télomères durant les premières étapes de clivage embryonnaire, à la fois chez des souris « wild type » et chez des souris « knock out » pour la télomérase. Cette observation est la preuve que c'est essentiellement le mécanisme d'ALT qui est responsable de l'allongement télomérique à ces stades. En revanche, l'existence de ce mécanisme n'a pas été mise en évidence dans l'embryon humain (70).

Les auteurs ont également mis en évidence que des embryons issus d'une même cohorte peuvent avoir des télomères de longueurs significativement différentes et que des différences étaient aussi observées entre les blastomères d'un même embryon. Ceci démontre que la division d'un blastomère au sein d'un embryon ne donne pas des cellules filles identiques en termes de longueur des télomères. Cette variation pourrait également être expliquée par le fait que l'activité télomérase diffère entre les blastomères chez l'Homme (88). Bien que l'allongement alternatif des télomères (ALT) n'ait pas encore été démontré dans les embryons humains, il est actif chez la souris. Ce phénomène pourrait ainsi être à l'origine d'un allongement très variable des télomères par un mécanisme recombinaison-like dans les embryons précoces. Il serait donc possible que l'ALT soit plus actif lorsque l'activité télomérase est relativement basse lors des clivages aux stades embryonnaires précoces, contribuant ainsi à la variabilité inter-blastomères de la longueur des télomères. La variabilité des cellules humaines en terme de polarité et de capacité à activer le génome, de même que le mosaïcisme chromosomique pourraient également y contribuer (69).

A la fin de la grossesse, la longueur des télomères et l'activité de la télomérase diminuent rapidement au niveau des tissus de la membrane fœtale pour permettre l'accouchement. Les membranes qui encadrent le développement de l'enfant ont une dynamique spécifique qui est différente de celle des autres organes durant la grossesse. Comme les autres tissus fœtaux, ces membranes nécessitent une croissance rapide et progressive qui assurent un développement embryonnaire adapté, qui requiert un bon maintien de la longueur des télomères. Cependant, contrairement aux tissus qui constitueront le futur enfant, ces membranes sont transitoires et leur durée de vie est limitée au temps de la grossesse. Des recherches récentes ont démontré que le raccourcissement des télomères joue un rôle important dans le vieillissement de ces membranes et sert de mécanisme qui engendre une sénescence cellulaire et donc l'accouchement. Il a également été montré qu'en plus du raccourcissement des télomères, les fragments des télomères augmenteraient la sénescence des cellules amniotiques, en partie en activant les voies de signalisation de la protéine kinase P38, et donc aideraient à l'accouchement (66).

L'évolution de la longueur des télomères et de l'activité télomérase dans les différentes cellules sont résumées dans le Tableau IV.

Tableau IV : Résumé de l'évolution de la longueur des télomères et de l'activité télomérase dans les cellules humaines

		Longueur des télomères		Activité de la télomérase
		Taille (kb)	Evolution	
Fœtus				
	Cellules somatiques	5 – 10 Femme > Homme		∅
	Durant la spermatogenèse			
	Spermatozoïdes	6 – 20 Variable +++	+50 – 135 pb/an Selon auteurs	∅
	Durant l'ovogenèse			
	Ovocytes matures	7 – 11	NA	Très faible
ε	Embryons clivés	≈ 8		
	Blastocystes	≈ 12		

La longueur des télomères et leur structure déterminent la durée de vie répliquative des cellules. La concordance de la longueur des télomères entre les chromosomes représente un important prérequis pour la recombinaison homologue et la ségrégation ; par conséquent, la longueur des télomères joue un rôle essentiel dans la méiose et, ainsi, des télomères trop courts engendrent un arrêt de la méiose, des erreurs de ségrégation, des non disjonctions chromosomiques, des aneuploïdies et l'apoptose (33).

III.8. Facteurs affectant la longueur des télomères

Il est admis que la longueur des télomères est essentiellement déterminée par des facteurs génétiques (78%) via différents gènes, à la fois autosomiques et sur le chromosome X ; cependant, d'autres facteurs comme l'environnement, le sexe, le stress oxydatif et l'inflammation peuvent également influencer la longueur des télomères (Figure 31) (33) .

Nous avons vu précédemment que l'âge paternel à la conception influence la longueur des télomères de la descendance : ceci résulte de l'activité télomérase dans les spermatogonies souches : à chaque division pour maintenir le pool de réserve de spermatogonies, la télomérase rallonge un peu les télomères des spermatogonies filles par rapport à la spermatogonie mère. Ainsi les enfants nés de pères âgés ont de plus longs télomères que ceux ayant des pères jeunes.

Il existe également un phénomène d'ascendance génétique : les personnes ayant des origines africaines ont des télomères plus longs que les européens. L'explication proposée relève de la pression de sélection de variants donnant un avantage dans un environnement donné : Dans ces populations davantage exposées aux infections, la survie requiert un système immunitaire très efficace en lien avec un fort potentiel prolifératif du tissu hématopoïétique, caractéristique des personnes ayant des télomères longs ; celles ayant des télomères courts ont progressivement disparu avec le temps (74).

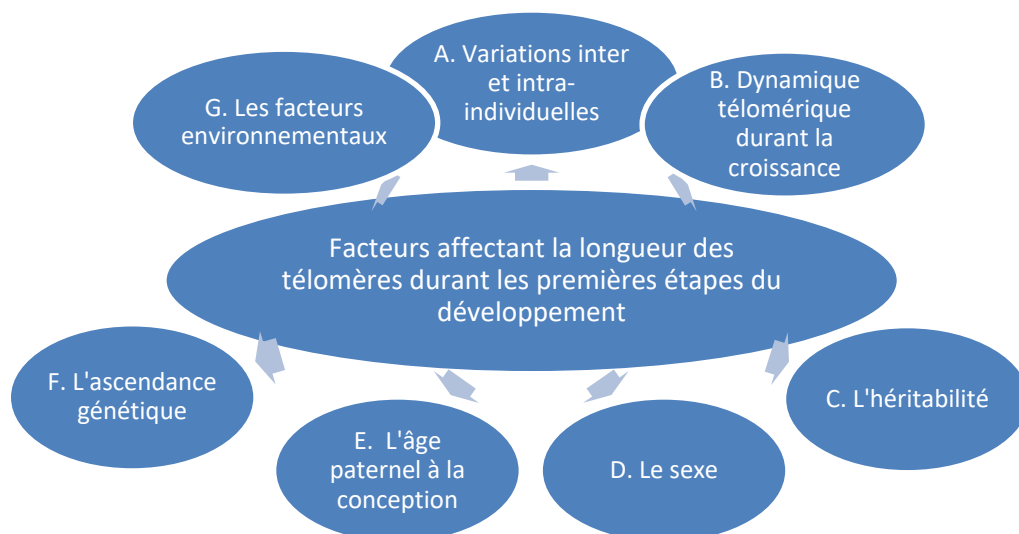


Figure 31 : Facteurs affectant la longueur des télomères lors des premières étapes du développement d'après Chahine *et al.* (74)

Du fait de leur composition riche en guanine, les télomères sont plus sensibles au stress oxydatif. D'autres facteurs comme le vieillissement, un dysfonctionnement mitochondrial, le tabac, l'obésité, l'alimentation, un stress psychologique, des facteurs socio-économiques peuvent également affecter la longueur des télomères (Figure 32) (33).

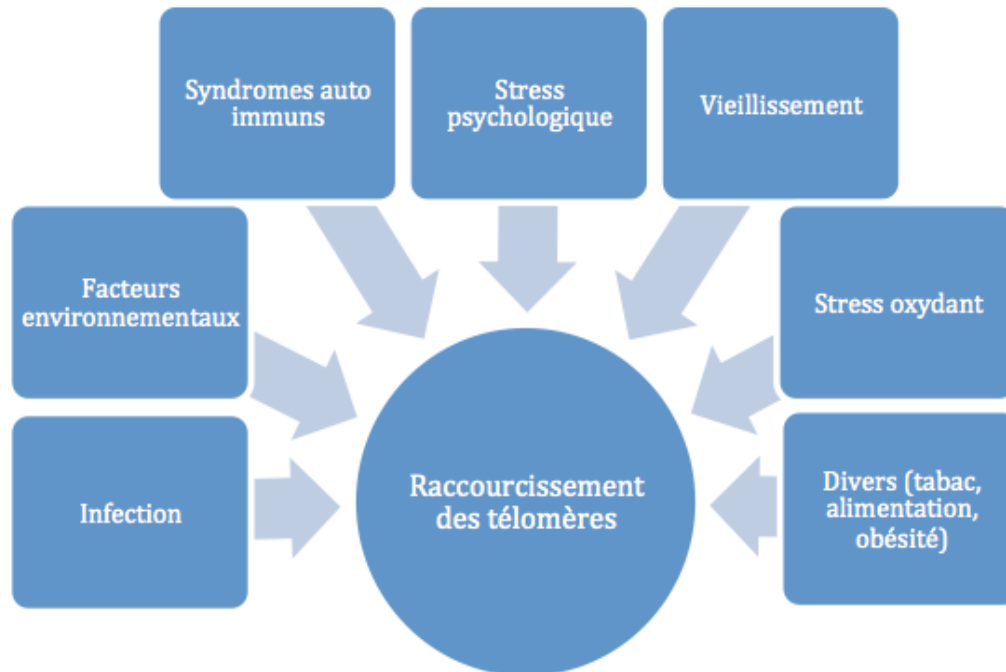


Figure 32 : Facteurs provoquant un raccourcissement des télomères

III.8.1. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est, avec le « end replication problem » et l'exonucléase, l'un des trois facteurs contribuant le plus au raccourcissement des télomères. L'utilisation métabolique de l'oxygène par les organismes aérobies entraîne une production de sous-produits partiellement réduits portant le nom d'espèces réactives de l'oxygène (en anglais « Reactive Oxygen Species » ou ROS). Les ROS sont capables d'oxyder différentes macromolécules au niveau cellulaire et notamment l'ADN. Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre la production des ROS et les défenses cellulaires antioxydantes. Ceci est fréquemment observé chez les malades présentant des pathologies inflammatoires et coronariennes ou lors d'un dysfonctionnement mitochondrial (89).

Les espèces réactives de l'oxygène réagissent avec les guanosines et les transforment en 8-hydroxydéoxyguanosine (8-OHdG) formant ainsi des bases oxydées à potentiel mutagène puissant (90). Si la 8-OHdG échappe à la réparation, elle est particulièrement affine pour l'adénine du fait de sa conformation et un A pourrait être incorporé à la place du C lors du cycle de réplication. Si cette erreur d'appariement n'est pas corrigée, la séquence TTA(8-OHdG)GG serait convertie en TTATGG ce qui perturberait la liaison du complexe Shelterin et l'attrition télomérique (89).

Les dNTPs libres sont encore plus sensibles aux dommages oxydatifs que les bases déjà incorporées dans l'ADN et également plus délétères. Premièrement parce que la 8-OHdGTP est préférentiellement incorporée par la polymérase en liaison avec l'adénine convertissant la séquence télomérique en GTAGGG et TGAGGG. Ensuite, la télomérase est également susceptible d'incorporer la 8-OHdGTP durant l'extension télomérique, mais cet oxo-dNTP a un effet terminateur de chaîne (89).

Ces ROS sont également responsables de la création de sites abasiques et de cassures d'ADN simple et double brin. La présence de bases riches en guanine rend les télomères plus sensibles au stress oxydatif et plusieurs études ont rapporté davantage de cassures d'ADN et de bases oxydées dans les télomères par rapport au reste du génome après exposition à des agents oxydants. On ne sait pas si l'accumulation préférentielle des dommages oxydatifs au niveau des télomères est due à une sensibilité accrue et/ou à une réparation réduite. En effet, la 8-OHdG ne peut pas être réparée au sein des télomères du fait de la structure en G-quadruplex (89).

Plusieurs modèles ont été proposés afin d'expliquer comment le stress oxydatif accélère l'attrition télomérique. Une possibilité est qu'il provoque l'apoptose de certaines cellules qui serait compensée par les autres cellules en se divisant davantage. Plus les cellules se divisent et plus les télomères raccourcissent. Cependant, cette hypothèse ne permet pas d'expliquer le raccourcissement télomérique observé lors d'un stress oxydatif léger et non cytotoxique (89).

Le modèle le plus plébiscité suggère que les ROS induiraient des ruptures de l'ADN directement au niveau des télomères ou dans une zone de réparation de l'ADN, conduisant à l'arrêt de la fourche de réplication et à la perte du télomère (89).

Une autre possibilité implique un impact des ROS sur la liaison du complexe Shelterin au télomère (89). Des niveaux élevés de radicaux libres libèrent complètement les TBPs ; les altérations des extrémités chromosomiques sont ainsi reconnues comme des cassures double brin et induisent la réponse appropriée (33). En revanche, il a été démontré que de faibles niveaux de 8-OHdG engendrent un retrait partiel de TRF1 et TRF2, perturbant la structure G-quadruplex et donc permettant l'accès à la télomérase et l'allongement des télomères (89).

III.8.2. Les facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux, comme une mauvaise alimentation, le tabagisme, l'obésité, le stress psychologique, l'exercice physique intense et le mauvais statut socioéconomique, peuvent entraîner un raccourcissement des télomères (33).

Le régime alimentaire permet d'influer sur l'inflammation et le stress oxydatif qui provoquent l'attrition des télomères. Un mode de vie sain avec une alimentation riche en fruits et légumes et pauvre en graisses saturées, combinée à de l'exercice, est associé avec des télomères plus longs. Certains nutriments influencent directement l'homéostasie télomérique notamment via l'activité de la télomérase (comme le zinc). D'autres ralentissent l'attrition télomérique en limitant les phénomènes inflammatoires ou le stress oxydatif (comme les vitamines A, C, D, E, les oméga 3 etc.) (Figure 33) (91).

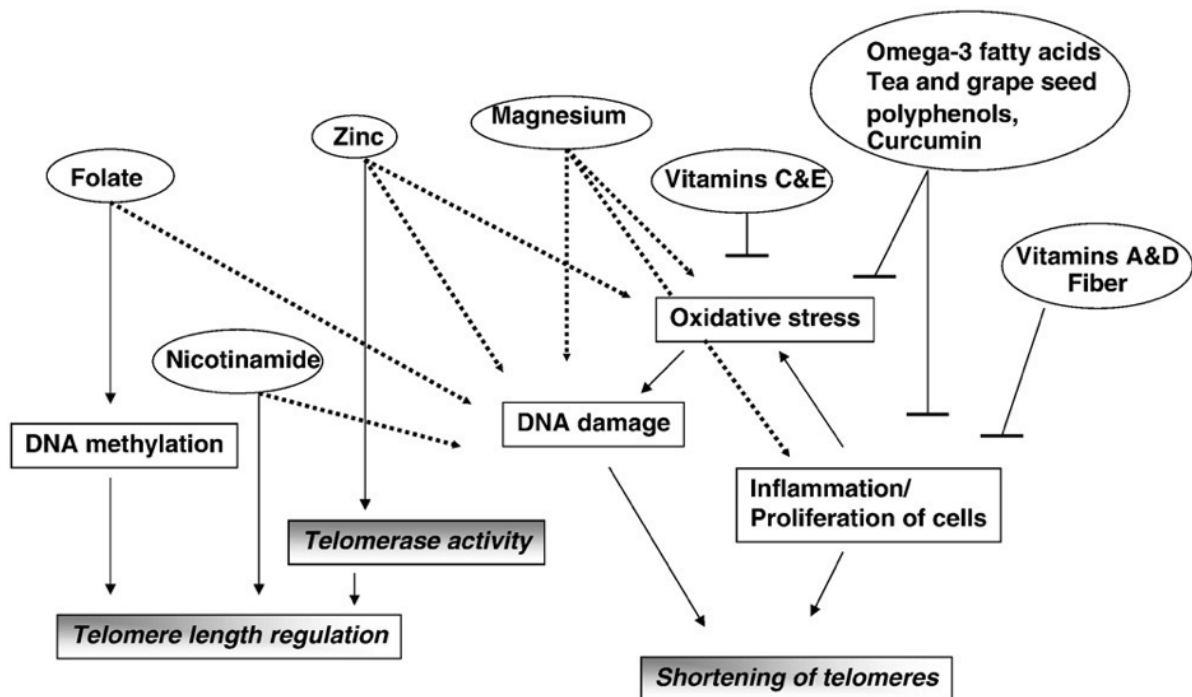


Figure 33 : Mécanismes potentiels de l'influence des nutriments sur la longueur des télomères : flèche continue = stimule / flèche en pointillés = provoque si déficit / barre = inhibe (91)

L'obésité entraîne également une diminution de la longueur des télomères notamment en augmentant le stress oxydatif et l'inflammation via l'augmentation des cytokines circulantes (92).

Le tabagisme engendre une attrition télomérique en provoquant une inflammation, en stimulant les leucocytes et en produisant des ROS (93). L'exposition aux insecticides, aux pesticides, aux polluants environnementaux, aux températures élevées et aux rayonnements électromagnétiques peut également réduire la longueur des télomères par induction de stress oxydant (33). Des toxiques largement répandus, les polychlorobiphényles (PCB), influencent les télomères en réduisant l'activité de la télomérase (94). Ainsi, la limitation de l'exposition à ces produits chimiques, aux xénobiotiques et aux rayonnements pourrait limiter le niveau de ROS générés et donc limiter la vitesse de raccourcissement des télomères (33).

IV. Pathologies liées à la perturbation de l'homéostasie télomérique

En 2009, le prix Nobel de physiologie et de médecine a été attribué à Blackburn, Greider et Szostak pour leurs recherches sur les télomères et la télomérase.

Selon le comité du Nobel, le prix a été attribué à ces scientifiques « *qui ont trouvé la solution à un problème majeur en biologie : comment les chromosomes peuvent être entièrement copiés durant la division cellulaire et comment ils sont protégés contre la dégradation. ... Leurs découvertes ont ajouté une nouvelle dimension à notre compréhension des cellules et éclairé les mécanismes de la maladie et stimulé le développement de nouvelles thérapies possibles* ».

IV.1. Pathologies somatiques

Au cours du vieillissement physiologique, la perte progressive (à chaque division) de l'ADN télomérique dans les cellules somatiques peut contribuer à la sénescence répllicative, l'apoptose ou la transformation néoplasique. Des télomères courts sont associés à la prédisposition à plusieurs pathologies liées au vieillissement (95). Par exemple, les patients présentant une dyskératose congénitale, pathologie génétique à transmission autosomique dominante (OMIM # 127550 et OMIM # 224230) ou récessive liée à l'X (OMIM # 305000), ont des mutations au niveau du gène codant pour la partie ARN de la télomérase. Ces derniers présentent des signes de vieillissement accéléré et décèdent prématurément. Cela interroge sur la possibilité d'utiliser la longueur des télomères courts dans les cellules sanguines, comme marqueur d'un raccourcissement télomérique généralisé dans toutes les cellules de l'organisme, potentiellement associé à la survenue de pathologies liées à l'âge (96).

IV.1.1. Syndromes des télomères courts ou « Short telomere syndromes » (STSs)

Les STSs sont des syndromes de vieillissement accéléré causés par des mutations génétiques héréditaires entraînant une diminution de la longueur des télomères. Ils sont cliniquement définis comme la perte prématurée des cellules souches progénitrices, affectant ainsi la capacité de régénération des tissus. En conséquence, les tissus avec un renouvellement cellulaire rapide, tels que la peau, la moelle osseuse, les poumons et le tractus gastro-intestinal sont souvent le plus affectés (97).

Du fait de leurs diverses présentations cliniques, les STSs sont difficiles à diagnostiquer mais surviennent souvent à un âge précoce avec des manifestations de plus en plus sévères au fil des générations. Ce phénomène d'anticipation génétique est dû au fait que les descendants héritent non seulement de la mutation, mais également de télomères déjà raccourcis. Chez 40% des patients, les mutations génétiques en cause ne sont pas identifiées. Les syndromes des télomères courts et les gènes impliqués sont résumés dans le Tableau V (97).

Tableau V : Syndromes des télomères courts, gènes associés et mode de transmission (97)

Pathologie	Hérédité	Gènes associés
STSs avec insuffisance hématopoïétique		
Dyskératose congénitale	Récessive liée à l’X (plus commune) Autosomique dominant Autosomique récessif	Télomérase : <i>DKC1</i> Télomérase : <i>TERT, TERC</i> Shelterin : <i>TIN2</i> Télomérase : <i>NOP10, NHP2, TCAB1</i>
Syndrome Hoyeraal-Hreidarsson	Récessive liée à l’X Autosomique dominant Autosomique récessif	Télomérase : <i>DKC1</i> Shelterin : <i>TIN2</i> Télomérase : <i>TERT</i> Shelterin : <i>ACD</i> (code TPP1) Synthèse ADN télomérique : <i>RTEL1</i>
Syndrome Revesz	Autosomique dominant	Shelterin : <i>TIN2</i>
Syndrome de Coats plus	Autosomique récessif	CST : <i>CTCI, STN1</i>
Anémie aplasique	Autosomique dominant	Télomérase : <i>TERT, TERC</i>
Anémie de Fanconi	Récessive liée à l’X Autosomique récessif Autosomique dominant	Télomérase : <i>DKC1</i> Télomérase : <i>NOP10, NHP2</i> Shelterin : <i>FANCD2</i> Shelterin : <i>ACD</i>
STSs à symptomatologie pulmonaire		
Fibrose pulmonaire idiopathique	Autosomique dominant	Télomérase : <i>TERT, TERC, NAF1</i>
STSs à symptomatologie gastro-intestinale		
Cirrhose cryptogénique	Autosomique dominant	Télomérase : <i>TERT, TERC</i>
Autres STS		
Syndrome Rothmund-Thomson	Autosomique récessif	<i>RECQL4</i> (rôle dans la maintenance télomérique)
Immunodéficience, instabilité région centromérique et anomalies faciales	Autosomique récessif	<i>DNMT3B</i> (cause télomères courts, hypométhylation régions sous télomériques)
Dystrophie musculaire facioscapulohumérale	Autosomique dominant	<i>DUX4</i>

Ces pathologies sont caractérisées par des troubles multi-systémiques entraînant des manifestations cliniques telles qu’une pancytopenie hématopoïétique par hypoplasie médullaire, une immunodéficience, une entérocite, une fibrose pulmonaire, un emphysème, une cirrhose cryptogénique, une hyperplasie nodulaire régénérative du foie, une canitie prématurée (avant 30 ans), une dysplasie du cartilage fibreux, une ostéoporose ainsi qu’une prédisposition aux cancers (épithéliaux et hématologiques) (97).

IV.1.2. Pathologies cardiovasculaires

Les pathologies cardio-vasculaires sont dues à la formation de plaques d’athérome au niveau des tissus vasculaires. Ces plaques sont formées à la suite d’une réparation inadéquate de l’endothélium et d’un remodelage vasculaire en réponse à une augmentation du stress oxydant et à la sécrétion de facteurs inflammatoires. Le processus de formation de ces plaques d’athérome est associé à un raccourcissement des télomères dans les cellules vasculaires (98).

L'inflammation et le stress oxydant étant des facteurs d'attrition télomérique, des télomères courts pourraient ainsi être considérés comme des marqueurs de ces deux paramètres. Beaucoup d'auteurs considèrent que des télomères courts précèdent de plusieurs dizaines d'années les manifestations cliniques des pathologies cardiovasculaires athéroscléreuses et les risques métaboliques qui en découlent. Ainsi la longueur des télomères des cellules endothéliales pourrait être déterminante dans le développement de ces pathologies au cours de la vie et donc en être directement la cause plutôt que d'être uniquement un marqueur de risque (74). Une hypothèse suggérée allant dans ce sens serait que l'accumulation de cellules sénescents, l'une des principales caractéristiques des plaques d'athérome, réduirait le potentiel régénératif des tissus touchés. Ce phénomène augmenterait ainsi l'apoptose, ce qui exacerberait d'autant plus la réaction inflammatoire et le dysfonctionnement endothélial (99).

Beaucoup d'études cliniques ont démontré l'association entre des télomères courts (mesurés dans les leucocytes) et les maladies cardio-vasculaires athéroscléreuses mais les résultats sont discordants, notamment concernant l'association LTL et survenue d'un AVC. Dans la mesure où une étude unique ne pourrait apporter de résultats significatifs que si elle portait sur un grand effectif de sujets, Matthew D'Mello a réalisé une méta analyse de 27 études observationnelles et il conclut ainsi sur l'existence d'un lien significatif entre des télomères raccourcis et le risque de survenue d'un AVC ou d'un infarctus du myocarde (98).

IV.1.3. Diabète de type 2

La résistance à l'insuline et l'attrition des télomères sont deux caractéristiques qui sont observées généralement avec l'âge. Si ces paramètres sont tous deux associés au processus de vieillissement, y-a-t-il un lien entre les deux ? L'attrition télomérique serait-elle être la cause ou la conséquence de l'insulinorésistance ? Dans leur étude de cohorte, Simon Verhulst *et al.* concluent que des télomères courts augmentent le risque de développer une insulinorésistance au cours de sa vie. Par ailleurs, ils démontrent que le fait d'être insulinorésistant n'accélère pas le raccourcissement télomérique. Cependant, cela n'exclut pas la possibilité que la variation interindividuelle du taux d'attrition des télomères au cours de la vie adulte puisse favoriser le développement d'une résistance à l'insuline (100).

Beaucoup d'autres études ont également étudié le lien entre diabète et télomères courts. Elisabeth Jeanclous fut la première à mettre en évidence une association entre le diabète de type 2 et le raccourcissement télomérique (101). Li a ensuite déterminé que les télomères (mesurés dans les leucocytes) de patients diabétiques étaient plus courts que ceux de patients contrôles. Ceci a été confirmé dans une méta analyse en 2016 : les patients diabétiques de type 2 avaient des télomères significativement plus courts que les patients sains (102). L'hypothèse physiopathologique posée par les auteurs est que des télomères courts favoriseraient l'apoptose des cellules dans différents tissus et donc une augmentation du stress oxydatif et de l'inflammation, phénomènes en cause dans le développement de l'insulinorésistance (102). D'autres auteurs émettaient l'hypothèse que des télomères plus courts au niveau des cellules β du pancréas engendreraient leur sénescence ou leur apoptose et donc le développement d'un diabète (102). Cette hypothèse est néanmoins contredite par le fait que le diabète de type 2 est dû à une insulinorésistance des tissus périphériques et non à une cause pancréatique (100).

Par ailleurs, les télomères des patients atteints de diabète de type 1 ne sont pas significativement plus courts que ceux présentant une insulino-résistance et sont comparables à ceux des témoins sains (100).

IV.1.4. Maladies neurodégénératives

L'association de télomères courts a été observée avec plusieurs maladies neurodégénératives telles que les Maladies d'Alzheimer, la démence à corps de Lewy (38) et même le syndrome de Down (103). Liu *et al.* ont ainsi mis en évidence une attrition télomérique supérieure chez les malades souffrant de la Maladie d'Alzheimer (104).

En revanche, la survenue de la maladie de Parkinson, qui est pourtant une autre maladie neurodégénérative liée à l'âge, n'est pas corrélée à la longueur des télomères dans la méta-analyse de Forero *et al.* portant sur 956 patients atteints de Parkinson et 1284 témoins (105).

IV.1.5. Cancer

Bon nombre d'auteurs ont cherché à déterminer s'il existe une corrélation entre la longueur des télomères dans les cellules, et notamment dans les cellules du sang périphérique, et le risque de cancer. La relation est discutable en raison du double rôle des télomères dans la cancérogenèse. En effet, leur attrition conduit théoriquement à l'instabilité du génome, qui est un événement fondamental à l'origine des tumeurs. Cependant, des télomères longs peuvent permettre davantage de divisions des cellules, favoriser l'immortalité et accroître une prolifération cellulaire aberrante à l'origine de la formation et du développement de tumeurs. Les données d'études épidémiologiques sont contradictoires : certaines études ont montré que les télomères courts augmenteraient le risque de cancer du sein, tandis que d'autres obtenaient des associations opposées ou inexistantes (106).

Compte tenu des résultats contradictoires et des sources potentielles de biais dans les différentes études, une revue systématique et une méta-analyse ont été menées en 2017, reprenant les résultats de 28 études prospectives incluant plus de 13 000 cas et 71 000 contrôles et ont permis d'observer un léger sur-risque de développer tout type de cancer pour les individus présentant des télomères plus longs. Mais des télomères longs seraient surtout un facteur de risque de cancer du poumon et de cancer en général chez les hommes (106), ce qui contredisait la précédente méta-analyse de 2016 qui était arrivée à la conclusion que des télomères courts seraient corrélés à une diminution du risque de cancer du poumon. En revanche, les auteurs de cette méta-analyse n'ont pas démontré d'association significative avec le risque global de cancer. Ils ont également retrouvé une association entre télomères courts et tumeurs gastro-intestinales, ainsi qu'avec les cancers de la tête et du cou (107).

Ces corrélations discordantes suggèrent qu'il existe différents mécanismes cancérogènes favorisés ou non par la taille de télomères en fonction du type de cancer (107). Par exemple, les tumeurs se développant sur un fond d'inflammation chronique pourraient être favorisées par une longueur courte de télomères (106).

Des études de cohortes prospectives à plus grande échelle et bien conçues sont nécessaires pour préciser la valeur prédictive de la longueur des télomères sur le risque de cancer et découvrir les mécanismes biologiques sous-jacents (106).

IV.1.6. Mortalité humaine toutes causes confondues

Plusieurs études ont cherché à évaluer l'influence de la longueur des télomères sur la survie globale et la mortalité. Une étude a notamment été réalisée sur des personnes de plus de 60 ans, non sélectionnées pour la présence ou l'absence de pathologie. Les patients ayant les télomères (leucocytaires) les plus courts avaient un plus faible taux de survie avec un taux de mortalité toutes causes confondues presque deux fois plus élevé que ceux avec des télomères longs (Figure 34). Ces patients avaient notamment un risque multiplié par 3 de décéder d'une pathologie cardiaque et par 8 d'une infection. Leur survie moyenne était diminuée d'environ 4 ans (96).

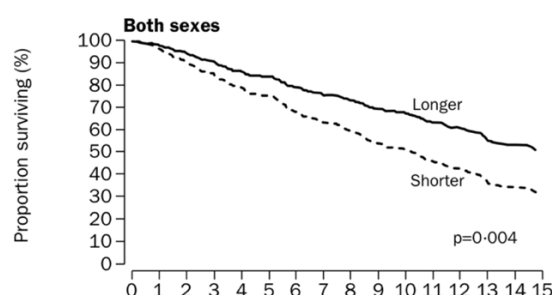


Figure 34 : Proportion de patients survivants au cours du temps en fonction de la longueur de leurs télomères (96)

Une méta-analyse regroupant plus de 64 000 individus a conforté l'association entre des télomères leucocytaires courts et l'augmentation de la mortalité toutes causes confondues comme le montre la Figure 35 (108).

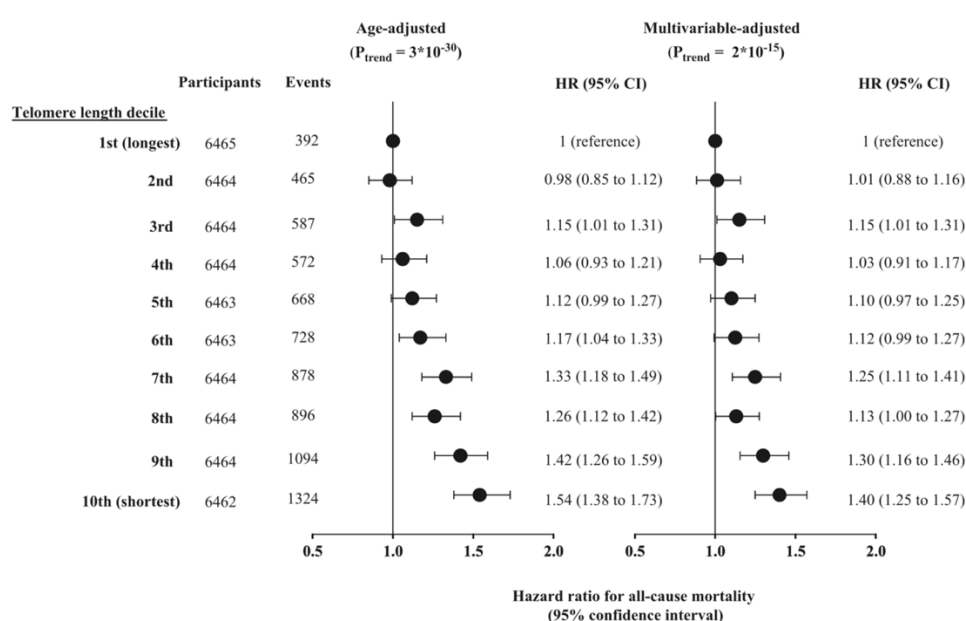


Figure 35 : Risque de mortalité toute cause chez les 64 637 participants de l'étude en fonction de la longueur de leurs télomères (108)

Ces résultats supportent l'hypothèse que le raccourcissement télomérique chez l'Homme contribue à la mortalité au travers plusieurs pathologies chez la personne âgée (74).

Beaucoup d'auteurs se sont intéressés aux télomères et notamment à la possible utilisation de leur longueur en tant que biomarqueur de l'état de santé d'un patient. De nos jours, deux laboratoires implantés aux États-Unis et en Espagne proposent, sur leur site internet notamment («www.lifelength.com », « www.teloyears.com »), de mesurer les télomères. Ils affirment que des télomères courts seraient un marqueur fiable permettant de prédire la survenue de beaucoup de pathologies chroniques liées à l'âge. Ces entreprises biotechnologiques proposent à leurs clients de mesurer leurs télomères afin de leur fournir « une image complète de leur santé globale et de leur processus de vieillissement ». L'objectif annoncé est de permettre aux individus à risque de vieillissement biologique accéléré, de modifier leur mode de vie afin de ralentir le phénomène d'attrition télomérique. Il leur est même conseillé d'effectuer un monitoring au long cours de la longueur de leurs télomères pour vérifier l'efficacité des « mesures antivieillessement ».

Ces laboratoires ne proposent pas d'application dans le domaine de la fertilité. Mais ils évoquent déjà l'utilisation potentielle de ces tests dans cette indication pour identifier le risque de devenir infertile, pour sélectionner les meilleurs donneurs de gamètes ou encore pour vérifier la qualité des ovocytes obtenus en vue d'une FIV.

IV.2. Fertilité / Infertilité

Ces dix dernières années, le lien entre longueur des télomères et de nombreuses pathologies, a permis à l'évaluation de ce paramètre pour devenir un bon marqueur de sénescence. La diminution, voir la perte de la fertilité, font partie des différents phénomènes physiopathologiques liés à l'âge. Avec le vieillissement, le potentiel de reproduction décroît, on observe notamment davantage de fausses couches, d'anomalies congénitales et de troubles génétiques chez le conceptus, ainsi qu'une altération des paramètres spermatiques. De nos jours, le recours à l'AMP est de plus en plus fréquent, notamment à cause du désir de maternité de plus en plus tardif. Ainsi, l'étude des processus physiologiques du vieillissement et leurs implications dans la reproduction apparaît pertinente. Des anomalies au niveau des télomères pourraient être impliquées dans bon nombre de troubles de la fertilité (66). Dans cette optique, à l'âge chronologique (c'est à dire le nombre d'années depuis la naissance), s'ajoute un nouveau paramètre qui est l'âge « biologique ou moléculaire » évalué grâce aux télomères (79).

IV.2.1. Télomères et Reproduction chez l'animal :

En 2005, un lien entre des télomères courts et la fragmentation de l'ADN spermatique a été mis en évidence chez la souris grâce à un modèle murin d'inactivation de *Terc* (codant pour le composant ARN de la télomérase) : les souris *Terc* -/- présentaient un ADN spermatique 6 fois plus fragmenté (109) avec de possibles conséquences en termes de santé de la descendance (110).

En 2002, l'étude des descendants (mâles et femelles) de souris sans télomérase (TR^{-/-}) a mis en évidence une diminution de la fertilité menant finalement à la stérilité. Les télomères des gamètes présentent des raccourcissements et des pertes de télomères dès le stade métaphase de première division méiotique. L'étude du développement préimplantatoire des embryons issus de ces souris *versus* des souris (TR^{+/+}) montre que plus de la moitié des zygotes (TR^{-/-}) ont un seul *pronucléi* et que la fragmentation embryonnaire est accrue (Figure 36) (111).

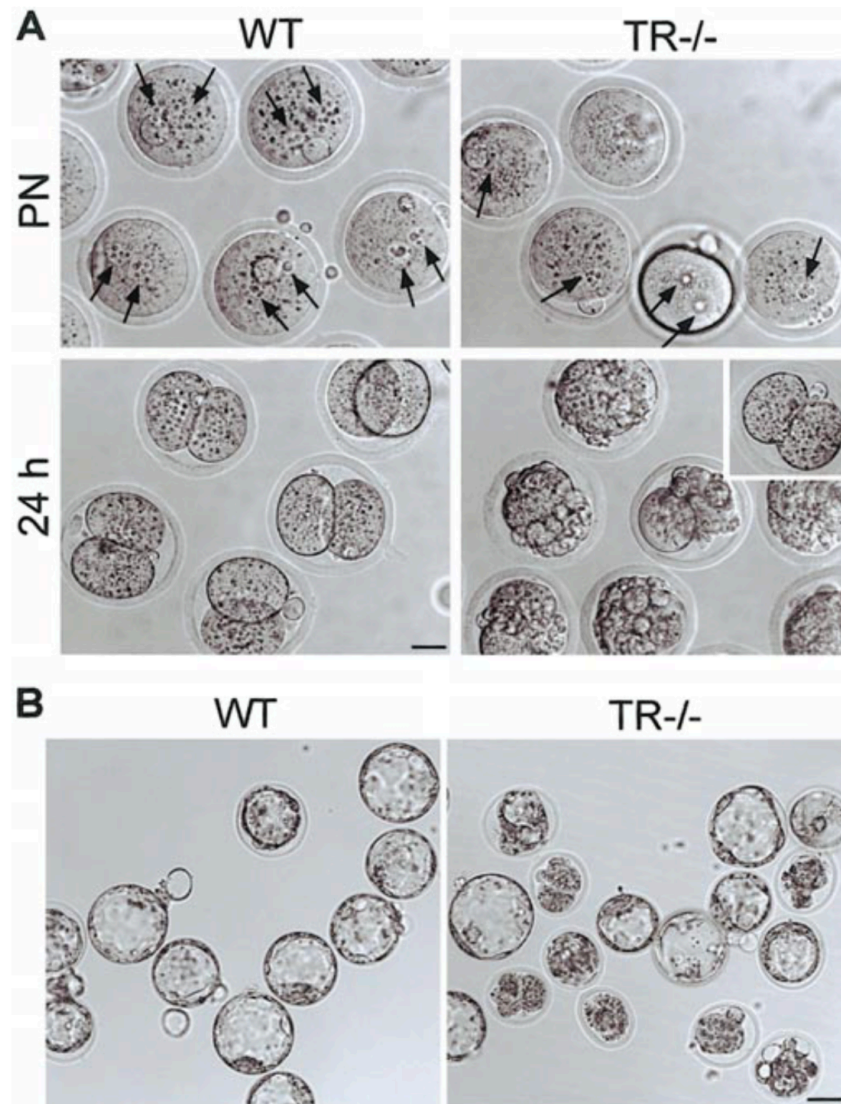


Figure 36 : Morphologie de zygotes (A,PN) avec davantage de zygotes à 1 seul PN chez les Tr^{-/-}, d'embryons clivés (A,24h) avec un taux de fragmentation supérieur chez les TR^{-/-}, et de blastocystes (B) de souris (TR^{-/-}) *versus* témoins (WT) (111)

En conclusion, la fécondation d'un ovocyte (TR^{-/-}) avec un spermatozoïde (TR^{-/-}) ou (WT) la fécondation d'un ovocyte (WT) avec un spermatozoïde (TR^{-/-}) donne de faibles taux de clivage et de développement embryonnaire. Ceci indique que seule une faible proportion de gamètes issus de souris (TR^{-/-}) sont capables d'être fécondés et de donner des embryons évolutifs, même à l'état hétérozygote. De plus, la réintroduction de la télomérase, en fécondant des ovocytes (TR^{-/-}) avec un spermatozoïde (WT) ou inversement, ne corrige pas totalement les différents paramètres étudiés (111).

Enfin, des embryons homozygotes (TR -/-) ont pu donner des blastocystes, suggérant ainsi que l'embryon est capable de réaliser un développement précoce sans télomérase.

Par ailleurs, les blastocystes (TR-/-) ne présentent pas plus d'aneuploïdies que les blastocystes (WT). Les auteurs présument donc que ces embryons qui se sont développés malgré l'absence de télomérase forment une sous population issue de gamètes avec des télomères initialement plus longs. Suggérant ainsi que c'est davantage la longueur des télomères plutôt qu'une déficience en télomérase qui serait responsable des anomalies de fécondation, de clivage et de développement embryonnaire. Une courte taille des télomères, à la fois dans le spermatozoïde et dans l'ovocyte, peut contribuer à une fécondation anormale des gamètes et conduire à des anomalies de clivage des embryons (111).

Cependant, la transposition de ces conclusions à l'espèce humaine doit être nuancée. En effet, les télomères murins sont bien plus longs que les télomères humains, et l'attrition télomérique s'étale sur plusieurs générations avant d'atteindre un seuil critique (69).

IV.2.2. Longueur des télomères et fertilité masculine

Comme nous l'avons vu précédemment, l'intégrité des télomères dans les cellules de la lignée germinale est importante en biologie de la reproduction. Ainsi, un statut télomérique non optimal dans les spermatozoïdes impacterait directement la fertilité masculine (66).

Thilagavathi *et al.*, en 2013, ont analysé la longueur des télomères chez des hommes atteints d'infertilité idiopathique *versus* témoins fertiles et ils ont retrouvé des télomères plus courts chez les patients ayant des difficultés à concevoir, suggérant ainsi une potentielle implication des télomères courts dans les infertilités idiopathiques (33). Cette conclusion a été contredite la même année par Turner et Hartshorne qui n'ont mis en évidence aucun lien entre longueur des télomères et la fertilité (112). Depuis, plusieurs autres études semblent confirmer le lien entre infertilité et télomères spermatiques plus courts. Des chercheurs ont également retrouvé un lien entre des télomères courts, mesurés non plus dans les spermatozoïdes mais dans les leucocytes, et l'azoospermie. Il a par ailleurs été démontré l'existence d'un lien entre certains polymorphismes de gènes impliqués dans l'homéostasie télomérique et le risque d'infertilité masculine (113).

La qualité du sperme est évaluée via la morphologie, la concentration et la mobilité des spermatozoïdes. Des auteurs ont donc voulu étudier l'influence du statut télomérique sur ces paramètres. En 2013, A. Ferlin et son équipe ont réalisé une étude prospective mesurant la longueur des télomères dans les spermatozoïdes de 61 échantillons avec une normozoospermie et 20 échantillons présentant une oligozoospermie idiopathique issus d'hommes très jeunes ayant entre 18 et 19 ans. Cette sélection très précise de patients, ayant approximativement le même âge, a permis aux auteurs de s'affranchir de la variable « âge » qui a une forte influence dans la longueur des télomères (59).

L'analyse de la relation entre la longueur des télomères dans les spermatozoïdes et la numération spermatique a permis d'établir une corrélation positive entre ces deux paramètres ; on observe que les télomères dans les spermatozoïdes sont statistiquement plus courts lorsque la concentration est diminuée (59). Dans les années suivantes, davantage d'études confirment cette association (113,114).

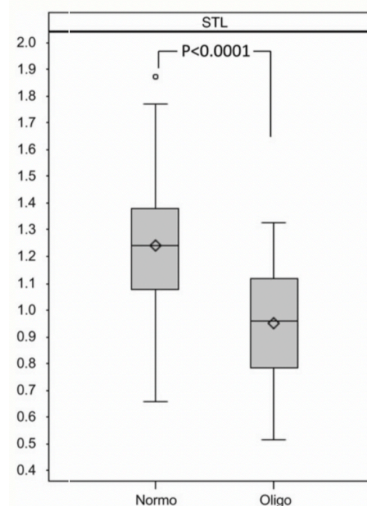


Figure 37 : Longueur des télomères dans les spermatozoïdes de patients avec normozoospermie *versus* ceux de patients avec oligozoospermie (59)

Certaines études ont également pu mettre en évidence que des télomères plus courts pourraient être responsables d'une altération de la mobilité spermatique. Par exemple, des échantillons présentant une asthénozoospermie ont des télomères plus courts par rapport à des échantillons normozoospermiques (75). Une corrélation positive avec la vitalité et la protamination a par ailleurs été démontrée (113). Néanmoins, deux études n'ont retrouvé aucune association entre les paramètres spermatiques et la longueur des télomères dans les spermatozoïdes. Cependant, elles incluaient peu de sujets, à savoir 32 et 45 patients respectivement, comparés à 25 et 32 contrôles (80,115).

Par ailleurs, la baisse de l'expression de la télomérase dans les spermatozoïdes est corrélée avec l'observation, chez les mêmes patients, de troubles de spermatogenèse comme l'arrêt post méiose, pré méiose ou l'absence de cellules germinales dans certains tubes séminifères (« Sertoli cell-only syndrome »). Ainsi, plusieurs études ont démontré l'intérêt de détecter l'activité télomérase dans les biopsies testiculaires pour affirmer d'un blocage de maturation. Ceci illustre l'importance de l'homéostasie télomérique durant la spermatogenèse et indique qu'un dysfonctionnement dans le processus d'élongation des télomères peut altérer la fertilité masculine (116).

Concernant la fragmentation de l'ADN spermatique, de façon analogue à ce qui a été observé chez la souris, un taux élevé de fragmentation de l'ADN serait associé à une courte taille des télomères spermatiques (117). Mais ces premiers résultats semblent controversés (114).

La fragmentation pourrait résulter d'une anomalie des télomères ayant pour conséquence des problèmes de ségrégation des chromosomes et donc des anomalies lors de la division méiotique. Ceci serait illustré par l'association «télomères courts / diploïdies» dans les spermatozoïdes (118). Par chance, certaines méthodes de préparation de sperme, comme la migration en gradient de densité et le swim-up, permettent de sélectionner des spermatozoïdes ayant des télomères plus longs, ce qui correspond aux spermatozoïdes les plus mobiles et présentant un moindre taux de fragmentation de l'ADN (Figure 38) .

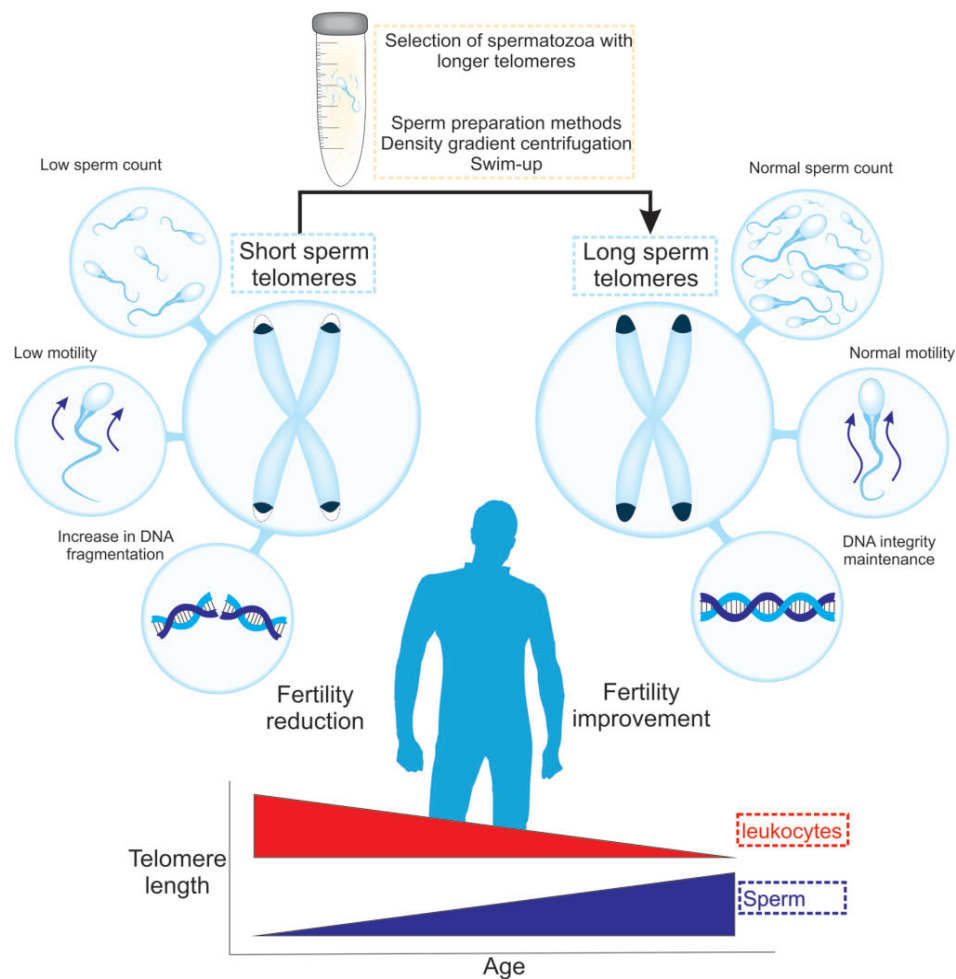


Figure 38 : Impact du statut télomérique sur le potentiel de fertilité masculine (66)

IV.2.3. Longueur des télomères et fertilité féminine

Depuis longtemps, il est clairement établi que l'âge est un facteur déterminant de la fertilité féminine. Aujourd'hui, les connaissances sur les télomères apportent un nouveau regard sur ce processus de vieillissement au niveau moléculaire et de manière personnalisée (66). De nombreuses études ont étudié le lien entre télomères et fertilité féminine, cette thématique a d'ailleurs fait l'objet d'un article (Annexe 2).

IV.2.3.1. Télomères et durée de vie reproductive

Des études épidémiologiques suggèrent que la longévité est associée à une augmentation de la durée de vie reproductive : une fécondité accrue serait corrélée à une augmentation de l'espérance de vie et ce phénomène serait notamment lié aux naissances tardives (122). En effet, une relation entre l'âge lors de l'accouchement du dernier enfant et la longévité a été mise en évidence (123). En outre, d'autres études épidémiologiques rapportent des taux de mortalité supérieurs chez les femmes ayant eu une ménopause précoce (124). Tous ces résultats peuvent néanmoins être sources de confusion. Comment doit-on les interpréter ? Les femmes accouchant à un âge avancé vieilliraient-elles réellement plus lentement ? Existe-t-il des gènes communs dans le vieillissement somatique et reproductif (123) ?

Les télomères jouent un rôle majeur dans le vieillissement cellulaire et une courte taille de télomères prédispose à toutes sortes de pathologies liées à l'âge et à une surmortalité. Ceci amène à poser l'hypothèse que la durée de vie reproductive et la fertilité sont toutes deux liées à l'homéostasie télomérique (123).

En 2005, Aydos *et al.* ont étudié le lien entre la longueur des télomères dans les leucocytes et la durée de la vie reproductive féminine. Ils ont ainsi mis en évidence une corrélation positive entre ces deux paramètres comme le montre la Figure 39 (125).

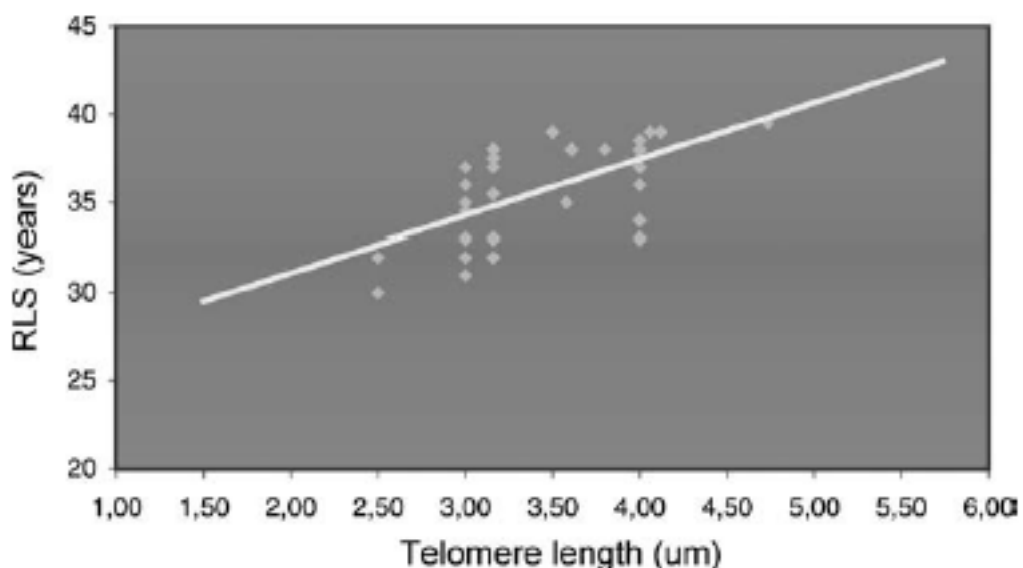


Figure 39 : Corrélation entre la durée de vie reproductive (RLS) et la longueur des télomères dans les leucocytes (125)

En 2017, Gray *et al.* ont étudié la longueur des télomères dans les leucocytes en fonction de l'âge de survenue de la ménopause. En moyenne, une augmentation de 1 kb retarderait la ménopause de 10 à 11 mois (126). Ces études présentent de nombreux biais dont le fait de ne pas avoir exclu les patientes ménopausées à cause d'une chirurgie.

IV.2.3.2. Syndrome des ovaires polykystiques

Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) est une pathologie de l'ovulation pouvant se traduire par un facteur menant généralement à une infertilité.

Plusieurs études ont recherché une possible association entre la longueur des télomères et le SOPK, cependant, leurs résultats sont contradictoires.

En 2014, Li *et al.* ont mené la première étude sur le lien entre les télomères et le syndrome des ovaires polykystiques chez près de 700 patientes SOPK et 600 contrôles, elle représente la plus grande étude qui ait été réalisée à ce sujet : les patientes présentaient des télomères leucocytaires plus courts. Les auteurs relient cette observation plutôt à l'augmentation du stress oxydatif présent dans ce syndrome sans totalement exclure que le raccourcissement télomérique puisse également être une cause de SOPK (127).

D'autres études ont été publiées plus récemment : quatre n'ont pas démontré de différence significative entre la longueur des télomères leucocytaires chez les patientes SOPK et chez les contrôles. Une étude a même retrouvé des télomères plus longs chez les femmes atteintes de ce syndrome (131). Sur les sept études incluses dans la revue de la littérature de Vasilopoulos *et al.*, trois ont démontré une association négative entre la longueur des télomères dans les leucocytes et le SOPK (113).

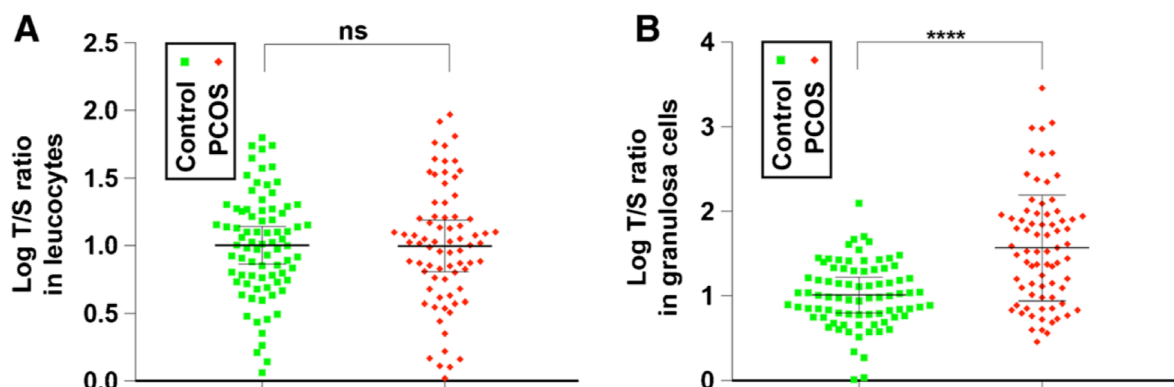


Figure 40 : Comparaison de la longueur relative des télomères dans les leucocytes (A) et des les cellules de la granulosa (B) chez des contrôles *versus* femmes avec SOPK (PCOS) (132)

De même, la longueur des télomères a été étudiée dans les cellules de la granulosa chez les patientes SOPK, et des résultats contradictoires ont également été trouvés. Deux études ont rapporté des télomères plus longs dans les cellules de la granulosa des femmes SOPK mais Li *et al.* ont démontré l'inverse (131,133,134). Ces conclusions génèrent des incertitudes quant au rôle de l'homéostasie télomérique dans cette pathologie, ce qui s'explique par les biais engendrés par le design différent de ces études et l'étiologie complexe de ce syndrome (66).

IV.2.3.3. Endométriose

De nombreuses études ont montré que l'activité télomérase est augmentée dans certaines pathologies prolifératives de l'endomètre comme l'endométriose (Figure 41) (135–139). Certaines ont également démontré que les télomères étaient plus longs dans les cellules de l'endomètre de patientes atteintes d'endométriose. Ils ont par ailleurs mis en évidence une corrélation positive entre l'activité télomérase et la sévérité de la maladie (138).

Des auteurs ont démontré que les lésions ectopiques qui sont en cause ont un phénotype de résistance à la progestérone et des télomères significativement plus longs que les cellules physiologiques fonctionnelles (135).

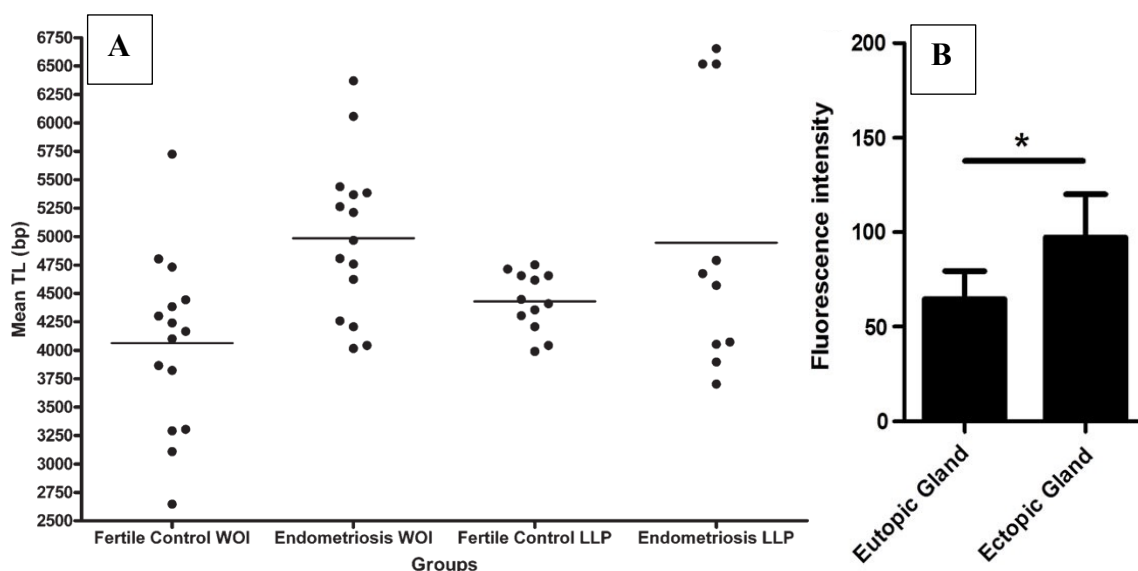


Figure 41 : (A) Longueur moyenne des télomères au niveau de l'endomètre chez des contrôles *versus* patientes endométriosiques durant la fenêtre d'implantation (WOI) et à la fin de la phase lutéale (LLP) (136)

(B) Activité télomérase au niveau de l'endomètre ("Eutopic gland") et au niveau des lésions endométriosiques ("Ectopic gland") (135)

Par conséquent, l'inhibition directe de l'activité télomérase dans les cellules épithéliales de l'endomètre pourrait contourner cette résistance pathologique à la progestérone et ainsi empêcher la prolifération et la propagation des lésions endométriosiques. Des auteurs ont pu démontrer cet effet *in vitro* en stoppant la prolifération de cellules endométriales endométriosiques en culture en inhibant la télomérase avec l'Imetelstat (135).

IV.2.3.4. *Insuffisance ovarienne prématurée*

Le mécanisme d'arrêt définitif de la vie reproductive chez la femme n'a toujours pas été élucidé. Il est généralement admis que le facteur le plus important est la réserve folliculaire ovarienne, définie comme le nombre et la qualité des follicules disponibles pour le recrutement et l'ovulation. C'est un critère fortement influencé par l'âge et qui décroît durant la vie reproductive chez la femme. Dans la mesure où l'âge biologique des ovaires peut être plus avancé que l'âge chronologique, il existe un intérêt à établir si un processus de vieillissement anormal peut mener à une réduction prématurée de la réserve ovarienne et de la fertilité féminine (66).

En effet, la longueur des télomères est un facteur déterminant le nombre de mitoses possibles dans une cellule et ce paramètre est en grande partie déterminé lors de la vie intra utérine ; les différences observées chez des femmes en bonne santé à un âge donné reflètent donc des inégalités déjà présentes dans les cellules germinales primordiales *in utero*. Ainsi, des cellules germinales primordiales avec de longs télomères devraient pouvoir réaliser davantage de divisions mitotiques et donc aboutir à plus de follicules dans les ovaires (125).

L'association entre insuffisance ovarienne prématurée et longueur des télomères sera développée dans la revue systématique de la littérature dans la partie VI : « Les télomères : un biomarqueur de fertilité féminine ? ».

IV.2.3.5. *Implantation endométriale de l'embryon*

Un facteur fondamental pour une grossesse est la bonne implantation de l'embryon au niveau de l'endomètre. Dans l'endomètre, l'activité télomérase et la longueur des télomères varient en fonction des différentes phases du cycle, suggérant une régulation par les hormones stéroïdes sexuelles. Elles sont ainsi maximales lors de la phase proliférative puis diminuent jusqu'à atteindre leur minimum au milieu de la phase sécrétoire, période qui constitue également la fenêtre d'implantation, avec une action dominante de la progestérone (Figure 42) (135).

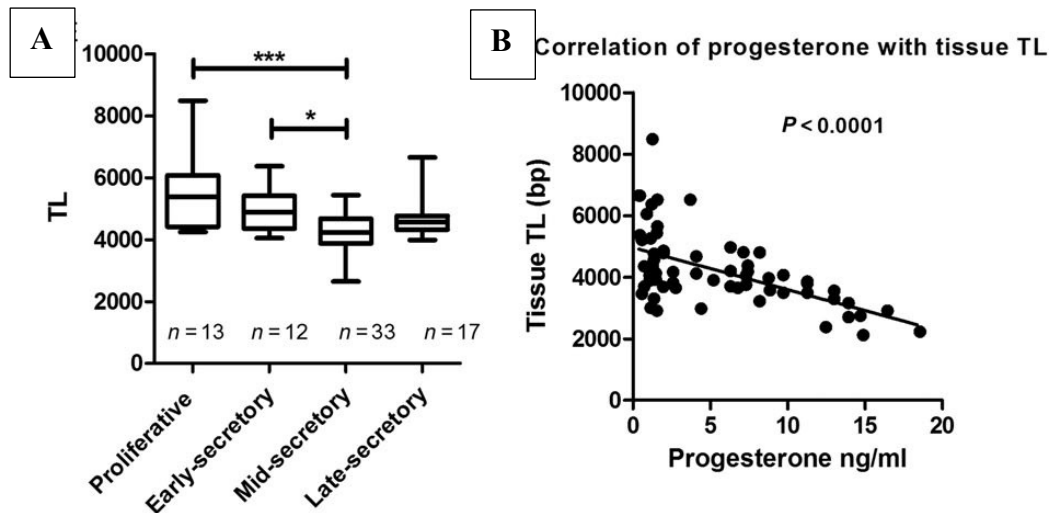


Figure 42 : Longueur des télomères au niveau de l'endomètre : (A) en fonction de la phase du cycle menstruel (B) en fonction des taux sanguins en progestérone (135)

Cette suppression de l'activité télomérase dans l'endomètre de femmes fertiles a été supposée comme un mécanisme nécessaire pour permettre aux cellules endométriales d'entrer en sénescence afin de créer un espace pour l'embryon. Cependant, les mécanismes sous-jacents de ce phénomène sont encore à l'étude. Un endomètre fin post-ménopausique peut être totalement régénéré et fonctionnel avec la prise d'hormones exogènes. C'est ainsi le seul organe reproducteur féminin qui ne présente pas de changements irréversibles liés à l'âge. Ceci pourrait être expliqué par la capacité des estrogènes à stimuler l'activité télomérase (135).

Ce rôle de la télomérase a en partie été mis en évidence par Hapangama et son équipe : la télomérase endométriale présente un profil d'expression différent en fonction de l'anomalie à l'origine de l'infertilité. L'expression de la télomérase ainsi que la longueur des télomères ont été mesurées dans les biopsies de l'endomètre. Aucune différence significative dans la longueur des télomères entre les groupes n'a été mise en évidence, seulement une tendance à l'augmentation de la taille des télomères et une activité télomérase statistiquement plus élevée dans les échantillons de patientes ayant des échecs d'implantation répétés (Figure 43). Selon les auteurs, les cellules stromales surexprimant la télomérase seraient susceptibles de devenir résistantes à l'apoptose et ainsi constituer une barrière à l'envahissement trophoblastique (140).

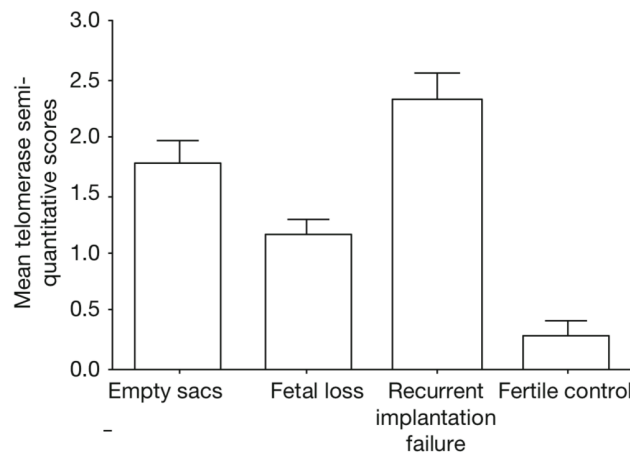


Figure 43 : Activité télomérase endométriale lors de la fenêtre d'implantation dans les cas de sac gestationnel vide, de fausse couche, d'échec d'implantation récurrents *versus* des contrôles fertiles (140)

IV.2.3.6. *Aneuploïdie*

L'aneuploïdie gamétique et embryonnaire est un problème fortement lié à l'âge maternel puisque cette anomalie surviendrait principalement lors de la reprise de la méiose de l'ovocyte. L'aneuploïdie représente la forme la plus fréquente d'instabilité génétique retrouvée dans les embryons humains et conduit à des fausses couches et un retard de développement mental chez les enfants. Lorsqu'on étudie cette relation au niveau moléculaire, l'étude de Treff *et al.* a démontré que les globules polaires aneuploïdes humains ont des télomères plus courts que les euploïdes (141).

L'un des syndromes les plus connus d'aneuploïdie est le Syndrome de Down. L'âge maternel « chronologique » est un facteur de risque fréquent de cette pathologie ; néanmoins l'effet de l'âge biologique sur la non disjonction chromosomique n'est toujours pas élucidé. De ce point de vue, une étude a trouvé que les mères âgées (> 35 ans) d'enfants ayant un syndrome de Down ont des télomères plus courts que des mères contrôles appariées sur l'âge. Cette différence significative n'a pas été retrouvée dans les populations de mères de moins de 35 ans (142,143). Cependant, une autre étude a démontré l'inverse (103). Le vieillissement accéléré pourrait prédisposer à la non disjonction du chromosome 21, mais cette conclusion nécessite d'être étayée par davantage d'études au vu des discordances de résultats. Par ailleurs, une étude a rapporté que des facteurs extrinsèques, tels que la mastication de tabac peuvent être liés à une réduction de la longueur des télomères chez les femmes qui donnent naissance à des enfants atteints de trisomie 21. Ceci suggère qu'une accélération du vieillissement biologique peut être due à des facteurs environnementaux génotoxiques qui altèrent la machinerie moléculaire impliquée dans l'homéostasie télomérique, ce qui conduit à une augmentation du risque d'anomalie chromosomique (66).

IV.2.3.7. *Fausses couches récurrentes*

L'étiologie des fausses couches récurrentes comprend différents facteurs, tels que les anomalies chromosomiques chez les parents, des anomalies utérines, des infections etc. Mais dans environ 50% des cas, la cause reste inexpliquée, on la qualifie alors d'idiopathique. Ceci est notamment dû à la grande variabilité génétique et épigénétique de ce trouble (144).

Parmi les différentes explications potentielles de cette pathologie, le raccourcissement prématuré des télomères semble être une piste prometteuse. Bien que leur rôle dans les fausses couches récurrentes n'ait été que peu étudié, Thilagavathi *et al.* ont rapporté que des télomères plus courts pourraient en être une cause, notamment en réduisant le potentiel de réplication cellulaire dans l'embryon (Figure 44) (144). De la même manière, Hanna *et al.* rapportent que des femmes ayant eu des fausses couches récurrentes ont des télomères significativement plus courts dans les leucocytes que les contrôles (145). Les auteurs attribuent ces différences à la restriction du potentiel de réplication durant l'embryogenèse, à l'accélération du processus de vieillissement ou à l'augmentation du stress cellulaire qui pourraient affecter négativement le maintien de la grossesse. Il est également possible que des télomères courts engendrent davantage d'aneuploïdies qui sont connues pour être la principale cause de fausses couches récurrentes. En effet, il est admis que le raccourcissement télomérique est associé à une instabilité génomique et pourrait jouer un rôle dans la survenue des aneuploïdies (144).

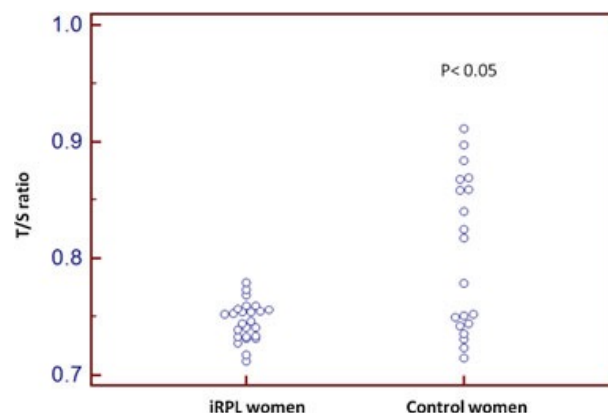


Figure 44 : Longueur des télomères dans les leucocytes de femmes ayant des fausses couches récurrentes versus contrôles (144)

IV.2.3.8. Complications lors de la grossesse

Puisque la sénescence des membranes fœtales et le raccourcissement télomérique semblent être des phénomènes physiologiques en fin de grossesse, ils peuvent aussi mener à d'importantes complications obstétricales si ces phénomènes se produisent de façon prématurée. Menon *et al.* ont rapporté que la longueur des télomères dans les leucocytes issus du sang de cordon et de placenta étaient significativement plus courts en cas de rupture prématurée des membranes (RPM) par rapport à une naissance prématurée avec des membranes intactes. Ils ont néanmoins retrouvé une longueur similaire entre les cas de RPM et les naissances à terme (146). De la même manière, Ferrari *et al.* ont démontré que des échantillons de placentas d'enfants mort-nés de cause inexpiquée ont des télomères réduits de moitié par rapports aux cas de naissances vivantes, suggérant que la sénescence prématurée du placenta est une composante importante qui peut compromettre la vie du fœtus. De plus, cette étude indique que l'attrition télomérique dans le cas des mortinaissances et des RPM était équivalente, prouvant que ce phénomène est un mécanisme commun à ces pathologies (Figure 45). Le fait que certaines patientes ont une RPM alors que d'autres donnent naissance à des enfants mort-nés nécessite des recherches plus approfondies. Les auteurs émettent l'hypothèse que dans les cas de RPM, le niveau d'inflammation et de stress oxydatif seraient inférieurs (147).

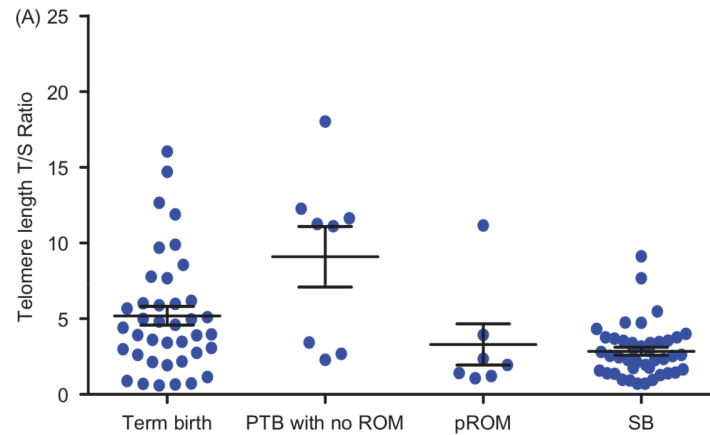


Figure 45 : Longueur des télomères dans le placenta en cas de naissance à terme ("Term birth"), de naissance prématurée sans rupture des membranes ("PTB with no ROM"), de naissance prématurée avec rupture des membranes (pROM) et de mortinaissance (SB) (147)

De plus, puisque les télomères déterminent la capacité de réplication cellulaire, l'accélération de leur raccourcissement au niveau des membranes fœtales peut également impacter le développement et la croissance. Il a été décrit que ce mécanisme serait en lien avec le retard de croissance intra-utérin (RCIU). Plusieurs auteurs ont décrit une réduction significative des télomères trophoblastiques dans les cas de RCIU *versus* des contrôles sains. Ce phénomène est exacerbé par une diminution de l'activité et de l'expression de la télomérase qui empêche le bon processus d'élongation télomérique et contribue ainsi au développement et à la progression de la pathologie. La corrélation entre le retard de croissance intra utérin et l'homéostasie télomérique a également été démontrée par l'augmentation significative du phénomène de capture télomérique, suggérant qu'il s'agirait d'une réponse compensatoire au RCIU pour tenter de maintenir une longueur suffisante de télomères (Figure 46) (148, 149).

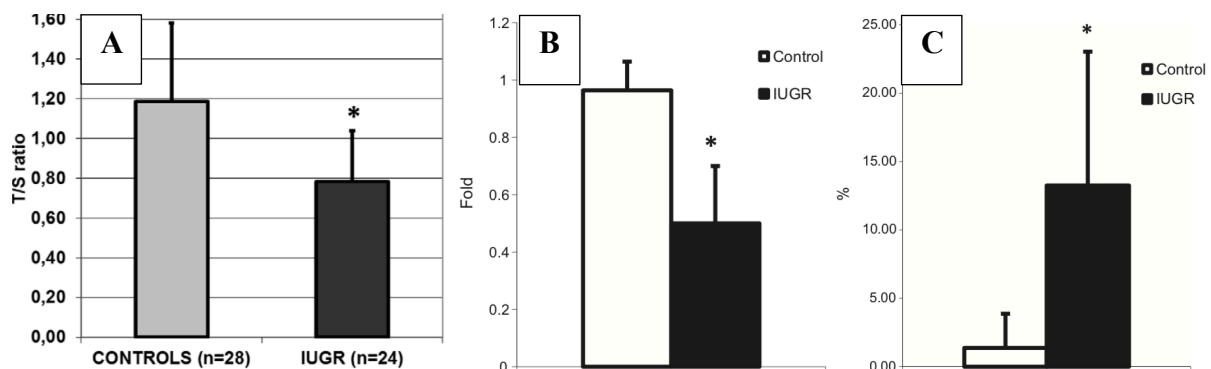


Figure 46 : Homéostasie télomérique placentaire entre RCIU (IUGR) et contrôles : (A) Longueur des télomères (148), (B) Activité télomérase, (C) Phénomène de capture télomérique (149)

Par ailleurs, la sénescence des tissus placentaires peut altérer le flux sanguin mère-fœtus, conduisant à une hypoxie, caractéristique principale de la physiopathologie de la pré-éclampsie. À cet égard, Biron-Shental *et al.* ont rapporté que les cas de pré-éclampsie avaient des télomères plus courts et une expression de la télomérase diminuée par rapport à des témoins sains (150,151).

La corrélation précédemment décrite entre le raccourcissement télomérique et le diabète de type 2 ont amené des auteurs à évaluer l'homéostasie télomérique dans les placentas de parturientes atteintes d'un diabète. À cet égard, des études récentes ont signalé des télomères plus courts et une expression de la télomérase plus faible dans le placenta de femmes ayant un diabète non contrôlé par rapport à des témoins sains (Figure 47). Ces observations indiquent que l'hyperglycémie peut entraîner des dommages placentaires en favorisant la sénescence tissulaire. Néanmoins, Zinkova *et al.* n'ont trouvé aucune différence entre les contrôles et les échantillons placentaires de patientes diabétiques de type 1 bien contrôlées. Bien que ces études présentent des différences méthodologiques, cela suggère qu'une bonne gestion de la maladie peut prévenir les effets néfastes de l'hyperglycémie sur le vieillissement placentaire. Une étude a par ailleurs retrouvé des télomères plus courts dans les leucocytes d'enfants nés de mères diabétiques (66,152,153).

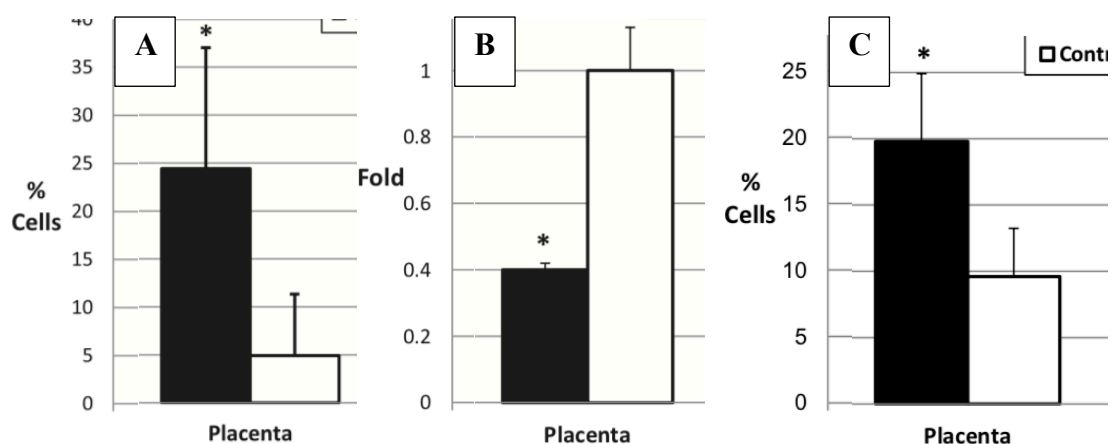


Figure 47 : Homéostasie des télomères placentaires chez des patientes diabétiques (en noir) versus contrôles (en blanc) (A) Longueur des télomères (152), (B) Activité télomérase, (C) Phénomène de capture télomérique (153)

IV.2.3.9. *Impact des facteurs environnementaux durant la grossesse*

Durant la grossesse, l'environnement peut influencer la santé à long terme de l'enfant à venir. Ceci est lié à la modulation du processus de vieillissement lors de la vie intra utérine qui a ainsi été nommé « programmation fœtale des télomères » (154). De ce point de vue, certaines études récentes s'accordent sur le fait qu'un stress psychologique chez la mère durant la grossesse pourrait engendrer une diminution de la longueur des télomères chez les enfants (154–157). De la même manière, plusieurs auteurs ont décrit une réduction significative de la longueur des télomères chez le fœtus, associée avec une consommation de tabac par la mère lors de la grossesse (158–160). Ces facteurs font donc partie de ce qui a été proposé comme « évènement indésirable » lors de la programmation fœtale des télomères et peuvent induire des effets néfastes sur la santé à long terme en raison d'un vieillissement moléculaire accéléré.

De la même manière, Martens *et al.* ont démontré que les femmes ayant un IMC élevé lors de la grossesse ont des enfants avec des télomères de longueur réduite (mesurées dans le sang de cordon et dans les tissus placentaires), suggérant ainsi qu'avoir un poids adapté chez la mère pourrait être bénéfique pour la longévité des enfants (161).

En outre, Entringer *et al.* ont rapporté que la concentration en folates chez la mère est liée à une augmentation de la longueur des télomères chez les nouveau-nés (162).

Ceci suggère qu'une alimentation inadéquate, avant et pendant la grossesse, pourrait perturber la programmation des télomères de la descendance et donc avoir des conséquences sur la santé de la descendance (162).

De plus, l'homéostasie télomérique peut être influencée par le lieu de vie durant la grossesse. Bijmens *et al.* ont trouvé que les femmes qui vivaient à proximité de zones polluées avec peu d'espaces verts présentaient des télomères placentaires plus courts (163). De la même manière, une étude récente a montré que l'exposition à la pollution atmosphérique (évaluée par la mesure des particules dans l'air) a un effet négatif sur la longueur des télomères des enfants (164). Ainsi, Lin *et al.* ont rapporté que l'explosion de la pollution au cadmium est associée à une attrition des télomères au niveau placentaire (165). Ces résultats soulignent l'importance de procurer un environnement sain et le moins pollué possible aux femmes durant la grossesse. L'implication des anomalies des télomères dans les problèmes de fertilité féminine est résumée dans la Figure 48 (66).

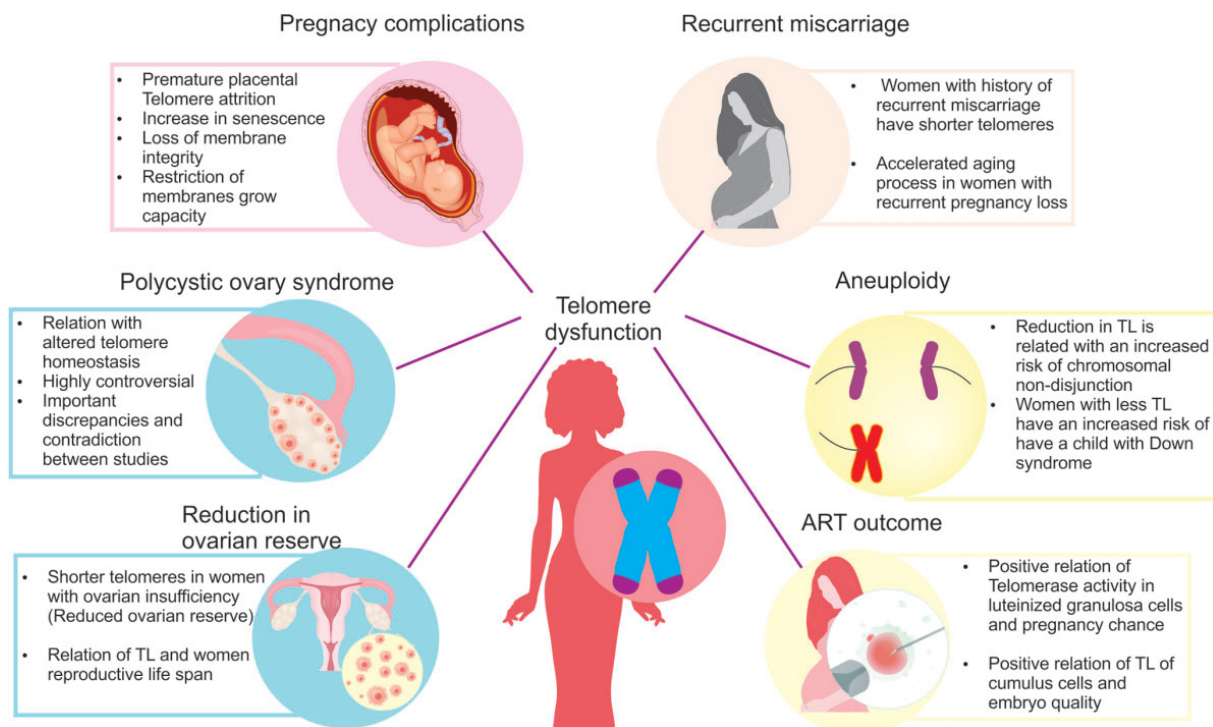


Figure 48 : Implication des anomalies des télomères dans les problèmes de fertilité féminine (66)

IV.3. Conclusion

Le système reproducteur féminin met en évidence certains paradoxes. Bien que l'utérus reste fonctionnel et réceptif tout au long de la vie reproductive, les ovocytes subissent quant à eux un processus de vieillissement profond et précoce. Les anomalies de la méiose touchent les femmes à mesure qu'elles vieillissent, entraînant ainsi infertilité, fausses couches, etc (113).

Compte tenu de l'augmentation de l'espérance de vie des individus dans le monde, les maladies liées à l'âge, telles que l'infertilité, sont progressivement devenues une préoccupation sociale et médicale essentielle.

Les marqueurs de routine de fertilité féminine, notamment de réserve ovarienne, sont actuellement insuffisants, et il est tentant de chercher à recourir à l'utilisation de la longueur des télomères dans cette indication dans la mesure où de nombreuses études ont démontré que l'infertilité semble très souvent associée à une perturbation de l'homéostasie télomérique (113).

De plus, le ralentissement de la sénescence prématurée en utilisant des traitements qui préviendraient le raccourcissement télomérique, pourrait s'avérer être une nouvelle piste d'amélioration des capacités reproductives des patientes.

Beaucoup de questions doivent encore être élucidées avant qu'un tel marqueur soit utilisé en clinique. Davantage d'études doivent être réalisées pour comprendre les bases et les mécanismes de régulation de la longueur des télomères dans le processus de vieillissement biologique et dans la reproduction (113).

V. Télomères et prise en charge en AMP

L'homéostasie télomérique pouvant avoir un impact sur la fertilité, les télomères ont été évalués en tant qu'éventuels marqueurs pronostiques de FIV chez les couples pris en charge en AMP. Une corrélation entre la longueur des télomères et des paramètres évalués en FIV (taux de fécondation, morphologie embryonnaire ...) ainsi qu'avec les issues cliniques (taux de grossesses, de naissances vivantes ...) a été recherchée dans divers types cellulaires.

Inévitablement, une des limites de la plupart de ces études réside dans le fait que chaque longueur de télomères de cellule embryonnaire est liée également à des caractéristiques télomériques de son ou sa partenaire qui ne sont pas contrôlées (75).

Par ailleurs, les recherches portant directement sur l'ADN télomérique dans les ovocytes ou dans les embryons humains afin de prédire la maturation ou le développement préimplantatoire présentent d'autres limites : 1) elles ne disposent que de très faibles quantités d'ADN pour mesurer les télomères, 2) il est difficile d'obtenir des ovocytes et des embryons de bonne qualité à analyser et 3) il est nécessaire de développer des techniques qui permettent de mesurer la longueur des télomères et de dépister une aneuploïdie lors d'une même biopsie d'ovocyte ou d'embryon (166).

V.1. Télomères dans les spermatozoïdes

En 2013, sur 50 patients, Turner et Hartshorne n'ont pas retrouvé de différences entre les longueurs des télomères de spermatozoïdes aboutissant à des grossesses par rapport à ceux qui n'en donnent pas (80).

Alors qu'en 2016, Cariat *et al.* ont démontré que des télomères plus courts dans les spermatozoïdes pourraient altérer les taux de grossesses chez 51 patients normozoospermes (118). Mais ces deux études comportent de nombreux biais : les paramètres féminins n'étaient pas pris en compte, ainsi que d'autres variables comme l'âge de la femme, l'IMC, le nombre d'ovocytes MII ...

En 2018, Torra-Massana *et al.* ont étudié la longueur des télomères dans les spermatozoïdes de donneurs comme éventuel marqueur prédictif des issues cliniques après FIV-ICSI. Ils ont mesuré les télomères dans 60 échantillons de spermatozoïdes utilisés au cours de 676 cycles chez des femmes de bon pronostic *a priori* ou avec recours à un don d'ovocytes et ont pu évaluer avec le moins de biais possible une association entre la LT dans les spermatozoïdes injectés d'une part et le taux de fécondation, la morphologie embryonnaire, les taux de grossesses et de naissances vivantes d'autre part (75). En utilisant ainsi un même échantillon lors de plusieurs cycles avec des patientes différentes, ils ont pu s'affranchir des variations liées aux paramètres féminins non contrôlables. Ils concluent que la LT dans les spermatozoïdes ne permet pas de prédire les résultats en FIV-ICSI (75).

Ils expliquent que l'allongement des télomères des cellules embryonnaires lors des stades précoces de l'embryogenèse pourrait compenser une courte taille de télomères de certains spermatozoïdes, d'où un impact réduit sur les issues en FIV-ICSI. Enfin, ils reconnaissent plusieurs limites à leur étude : 1) le très faible effectif, 2) la non prise en compte des taux de grossesses cumulés (après transfert d'embryons frais et transferts d'embryons congelés) et 3) la mesure de la LT réalisée sur un seul prélèvement alors qu'il existe de grosses variations entre les éjaculats (75).

V.2. Télomères dans les ovocytes

En 2009, Keefe et Liu ont mesuré les télomères dans des ovocytes issus des mêmes cohortes ovocytaires (même ponction folliculaire) que ceux ayant été utilisés pour réaliser des FIV : aucune patiente ayant une LT d'ovocytes « analysés » inférieure à 6,32 kb n'avait été enceinte (167).

En revanche, cette valeur seuil n'a pas été confirmée dans l'étude de Turner et Hartshorne de 2013 : cette étude ne met en évidence aucune valeur seuil de LT ovocytaire dont la fécondation aboutit à une grossesse (80).

En 2014, Wang *et al.* ont démontré que les télomères seraient plus longs dans les ovocytes de femmes qui obtiennent une grossesse après une tentative de FIV (168).

V.3. Télomères dans les cellules de la granulosa

Le rôle des cellules folliculaires dans la maturation, l'ovulation et la fécondation des ovocytes a déjà été largement décrit plus haut. Récemment, des études ont recherché une possible implication de la LT des cellules du cumulus dans la maturation ovocytaire et/ou la qualité embryonnaire (166). Leur objectif était d'évaluer ces paramètres comme biomarqueurs de la qualité et de la fécondance d'un ovocyte (169,170), du développement précoce de l'embryon (171,172) ou encore de la qualité embryonnaire et des taux de grossesses (173,174).

Cheng *et al.* notamment, ont mis en évidence en 2013, une corrélation entre la LT dans les cellules du cumulus et la qualité de l'embryon qui résulte de la fécondation de cet ovocyte : les télomères des cellules du cumulus d'ovocytes matures étaient plus longs que ceux d'ovocytes immatures (Figure 49). Ainsi, ce paramètre pourrait être un marqueur permettant de sélectionner des ovocytes et des embryons de meilleure qualité dans les stratégies de transfert électif d'un seul embryon (« Single Embryo Transfer » ou SET) (166).

Les résultats sont significatifs chez les patientes de moins de 38 ans et non significatifs chez les patientes au-delà de 38 ans mais avec une tendance identique (166).

L'absence de significativité pourrait être due au fait que les télomères raccourcissent naturellement avec l'âge et donc qu'un plus grand nombre de patientes serait nécessaire dans ce groupe pour trouver une différence significative (166).

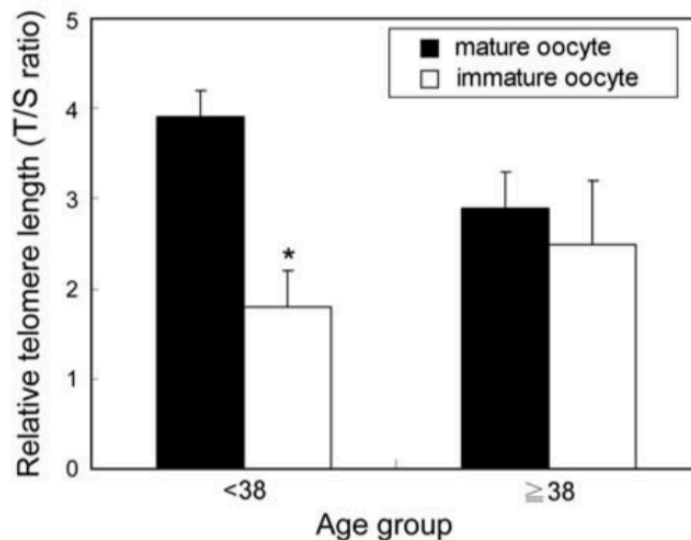


Figure 49 : Comparaison de la maturité ovocytaire et de la longueur des télomères chez les femmes de moins de 38 ans et chez celles de plus de 38 ans (166)

De la même manière, ils ont retrouvé des télomères plus longs dans les cumulus d'ovocytes qui ont été fécondés (Figure 50) (166). Xiaofei Xu et son équipe sont arrivés à la même conclusion dans leur étude, retrouvant ainsi une augmentation des taux de fécondation parallèlement à l'augmentation de la LT des cellules de la granulosa dans le groupe contrôle (28).

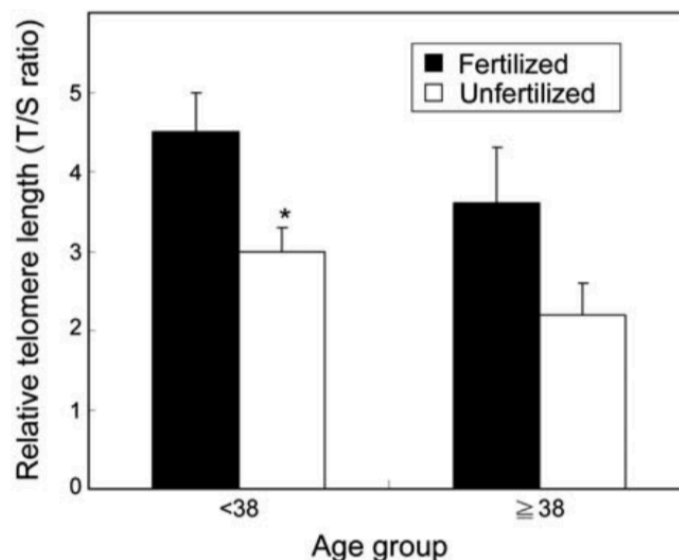


Figure 50 : Comparaison de la fécondation des ovocytes en fonction de la longueur des télomères chez les femmes de moins de 38 ans et chez celles de plus de 38 ans (166)

Et enfin, les télomères des cellules du cumulus d'ovocytes qui ont donné des embryons de moins bonne qualité étaient significativement plus courts que ceux qui ont donné des embryons de bonne qualité à J2 et à J3 dans chacun des 2 groupes de patientes (Figure 51) (166). En revanche, Xu *et al.*, n'ont pas retrouvé de lien entre la LT dans les cellules de la granulosa et la qualité des embryons qui en sont issus (28).

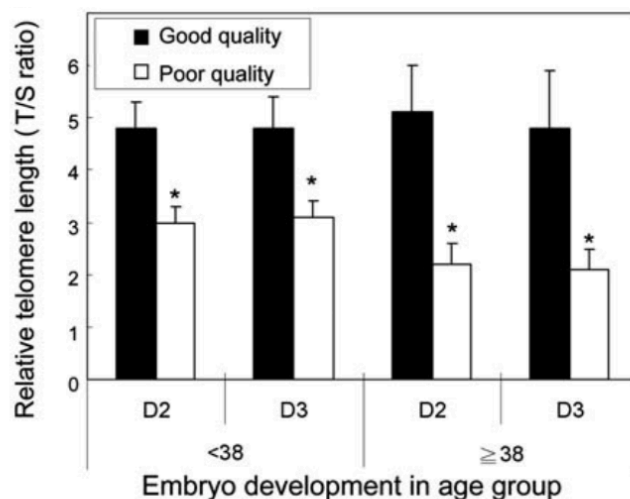


Figure 51 : Comparaison entre le développement embryonnaire à J2 et à J3 en fonction de la longueur des télomères chez les moins de 38 ans et chez les plus de 38 ans (166)

Dans leur étude, les auteurs ont également démontré qu'il existe des variations inter individuelles de la LT, mais également des variations intra individuelles entre les différents complexes cumulo-ovocytaires recueillis chez une même patiente. Ceci sous-entend que le microenvironnement de chaque complexe est donc différent (166).

Les auteurs ont donc démontré que la LT dans les cellules du cumulus est associée à la maturité ovocytaire, la fécondation et la qualité embryonnaire. Ils ont ainsi retrouvé des télomères plus courts dans les cellules du cumulus d'ovocytes immatures, d'ovocytes non fécondés et d'embryons de mauvaise qualité. Des télomères plus longs pourraient donc permettre d'offrir un environnement plus favorable au développement folliculaire. De meilleurs follicules donneraient ainsi davantage d'ovocytes matures et des embryons de bonne qualité (166).

Les auteurs concluent donc que la LT dans les cellules du cumulus serait un potentiel biomarqueur permettant de sélectionner les ovocytes ou les zygotes qui auraient plus de chances de donner un embryon évolutif. Ils donnent notamment une valeur cut-off de ratio T (nombre de copies gène témoin) / S (nombre de copies du gène d'intérêt (ici télomères)) à 4,23 pour obtenir des embryons de bonne qualité à J3. Par ailleurs, ils mentionnent que l'analyse en qPCR ne prend qu'une demi-journée à être réalisée, ce qui serait compatible avec une utilisation en routine. Cependant ils admettent également que ce marqueur pourrait ne pas être suffisamment discriminant pour être cliniquement utile (166).

Depuis 2011, l'équipe chinoise de Wang et Chen s'intéresse à la possibilité de prédire les issues cliniques en FIV grâce à la mesure de l'activité de la télomérase dans les cellules de la granulosa. Elle a ainsi retrouvé une activité télomérase supérieure dans le groupe des patientes enceintes par rapport à celles qui n'ont pas obtenu de grossesse (Figure 52) : l'augmentation de l'activité télomérase de 1 OD x mm (densité optique par mm) augmenterait de 4,769 fois ($p < 0,014$) les chances de tomber enceinte (168,175).

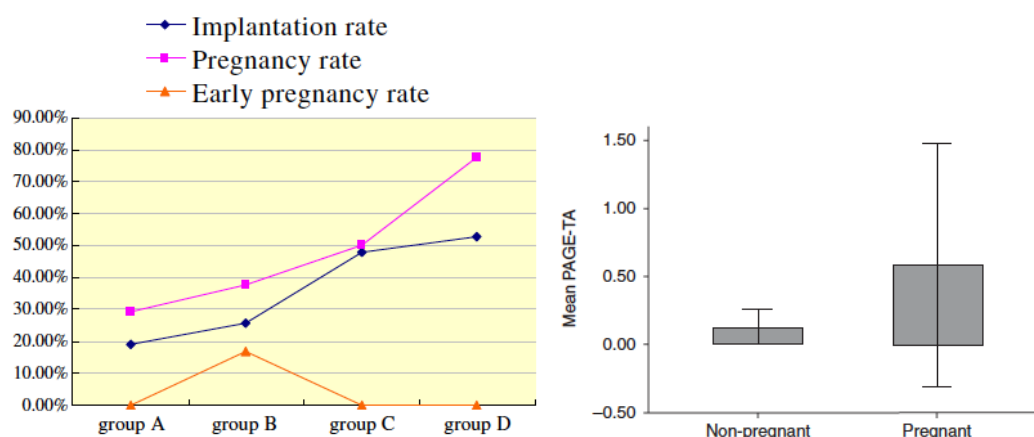


Figure 52 : Résultats des études de Wang et Chen de 2011 (à gauche) : groupe A n=17, groupe B n=16, groupe C n=14, groupe C= 9, et de l'étude de 2014 (à droite) retrouvant une augmentation des taux de grossesses avec l'augmentation de l'activité télomérase dans les cellules de la granulosa (168,175)

Le taux d'ovocytes matures et d'embryons de bonne qualité tend à augmenter parallèlement à l'augmentation de l'activité télomérase dans les cellules de la granulosa sans pour autant obtenir des différences significatives, peut-être à cause des faibles effectifs étudiés (175).

Des études dans l'espèce bovine ont montré que le stress oxydatif engendré par l'insémination des ovocytes pourrait engendrer la production de radicaux libres dérivés des spermatozoïdes. Des télomères significativement plus courts ont ainsi été mis en évidence dans des morula bovines produites *in vitro* comparées à *in vivo*. Cette observation tend à confirmer l'idée que les conditions de culture pourraient induire une réduction des télomères (69).

V.4. Conclusion

L'homéostasie télomérique apparaît comme étant étroitement impliquée dans la fertilité, notamment féminine. L'évaluation de la LT pourrait être intégrée dans la prise en charge des patients en AMP dans deux grandes circonstances :

- 1) comme paramètre pronostic d'un risque de développer une IOP, permettant de recommander une préservation gamétique chez les patientes en cas de LT d'emblée courte ;

- 2) comme paramètre pronostic des chances de grossesse après transfert d'un embryon donné, permettant d'optimiser les stratégies de transfert d'embryon unique.

Néanmoins, davantage d'études sont nécessaires pour préciser le caractère pronostic de ce paramètre, seul ou combiné aux paramètres déjà existants, avant de l'intégrer dans la pratique courante (66).

VI. Les télomères : un biomarqueur de fertilité féminine ?

VI.1. Introduction de la revue systématique de la littérature

L'un des principaux mécanismes cyto-moléculaires impliqués dans le processus de vieillissement est le raccourcissement des télomères. L'activité télomérase, participant à l'homéostasie télomérique, est une autre variable importante à prendre en compte. (66)

VI.1.1. Activité mitotique gonadique

La stratégie de stockage des cellules germinales est très différente entre les deux sexes, notamment au niveau de la cinétique de l'activité mitotique de ces cellules (79,176) :

- chez l'homme, les cellules germinales souches ne cessent de se diviser à partir de la puberté et entretiennent un stock quasi permanent toute au long de la vie de l'individu ;
- chez la femme, les cellules germinales souches se divisent intensément pendant la vie intra-utérine puis plus du tout après la naissance.

Les cellules somatiques en rapport avec ces cellules germinales ont également une cinétique d'activité mitotique sexe-spécifique :

- chez l'homme, les cellules somatiques à l'origine des cellules de Sertoli se divisent pendant la vie intra-utérine pour former les cordons séminifères, précurseurs des tubes séminifères qui se développent à la puberté, impliquant une deuxième vague de mitoses sertoliennes associée à la vague de mitoses spermatogoniales.
- chez la femme, les cellules somatiques à l'origine des cellules folliculeuses présentent une activité mitotique modérée, juste de quoi former la fine monocouche cellulaire autour des cellules germinales dans les follicules primordiaux et ensuite entretenir pendant une cinquantaine d'années la structure folliculaire primordiale/primaire. Ces cellules folliculeuses vont se multiplier intensément au moment du recrutement et surtout lors de la croissance et de la maturation folliculaire (Figure 53) (79,176).

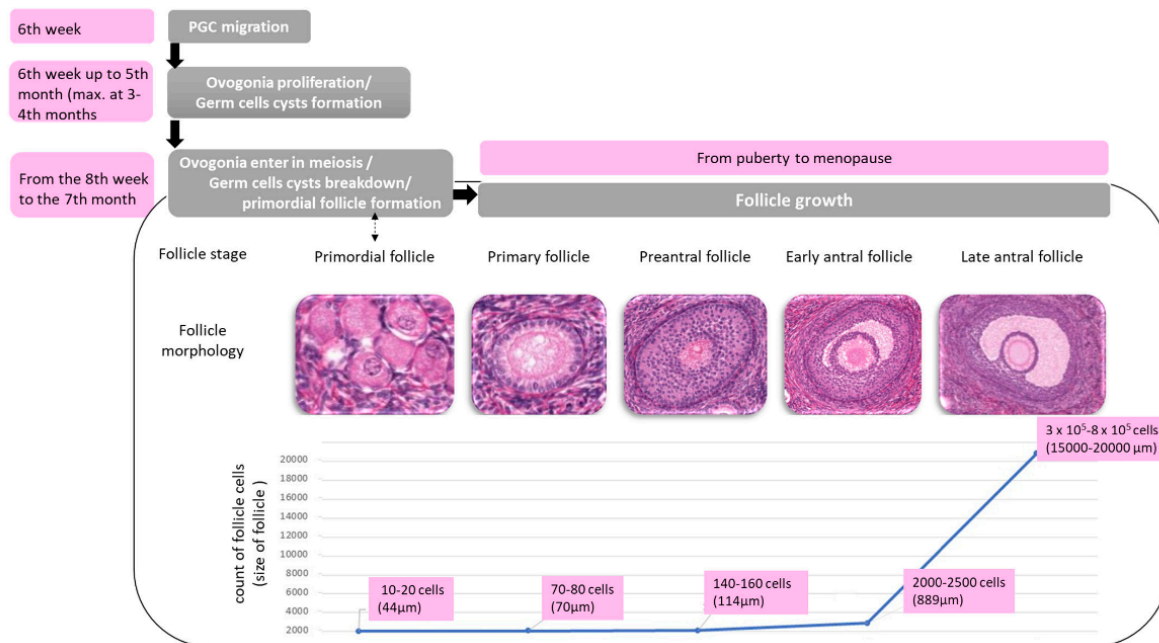


Figure 53 : Folliculogénèse humaine et nombre de cellules de la granulosa (177)

Des télomères plus courts pourraient ainsi limiter les capacités de mitose des cellules impliquées dans la reproduction à deux périodes chez la femme :

- Durant la vie fœtale, lorsque les cellules germinales primordiales se multiplient pour constituer un pool de follicules
- Chaque mois lors de la croissance et de la maturation du follicule dominant, en réponse aux gonadotrophines, jusqu'à l'ovulation

VI.1.2. Les cellules de la granulosa dans la maturation folliculaire

La maturation, la fécondation et le développement préimplantatoire d'un embryon dépendent d'un programme précis de croissance et de différenciation de l'ovocyte en coordination avec le développement et la différenciation des cellules de la granulosa qui l'entourent (175). Les cellules de la granulosa sont des cellules somatiques composant la majeure partie du follicule ovarien. Plus que n'importe quelles autres cellules, elles déterminent la taille finale du follicule pré ovulatoire (168).

VI.1.2.1. Rappels de physiologie

Après initiation de la méiose durant la vie fœtale, les ovocytes s'arrêtent au stade diplotène de prophase I. A ce stade, les ovocytes sont entourés d'une monocouche de cellules somatiques de la granulosa et l'ensemble forme ainsi le follicule primordial. À partir de la puberté, des groupes de follicules primordiaux entrent en croissance à chaque cycle menstruel sous l'effet de signaux endogènes médiés par les gonadotrophines et peuvent ainsi reprendre la méiose (178).

Concomitamment à l'initiation de la croissance ovocytaire, les cellules somatiques qui l'entourent commencent à proliférer et à former autour de l'ovocyte plusieurs couches de cellules. Une fois que le follicule a accumulé quelques milliers de cellules de la granulosa, l'espace extracellulaire augmente et s'expand pour former une cavité appelée antrum. Dans ce follicule antral, 2 populations de cellules existent : (1) les cellules du cumulus organisées en épithélium pseudo stratifié autour de l'ovocyte ; et (2) les cellules murales des couches internes formant un épithélium pseudo stratifié en contact avec la lame basale adjacente à la thèque externe de l'ovocyte (178).

Finalement, en réponse à la stimulation hormonale ; 2 événements majeurs se produisent :

- (1) l'ovocyte qui augmenté de volume termine sa première division méiotique et se bloque à nouveau en métaphase II ;
- (2) les cellules du cumulus présentent une expansion ou mucification, consistant en la formation d'une matrice extra cellulaire riche en acide hyaluronique qui augmente les espaces inter cellulaires.

C'est cet ovocyte en métaphase II, entouré des cellules de la corona radiata et du cumulus oophorus, qui est ovulé dans les trompes pour être fécondé (178).

La maturation folliculaire est représentée dans la Figure 54.

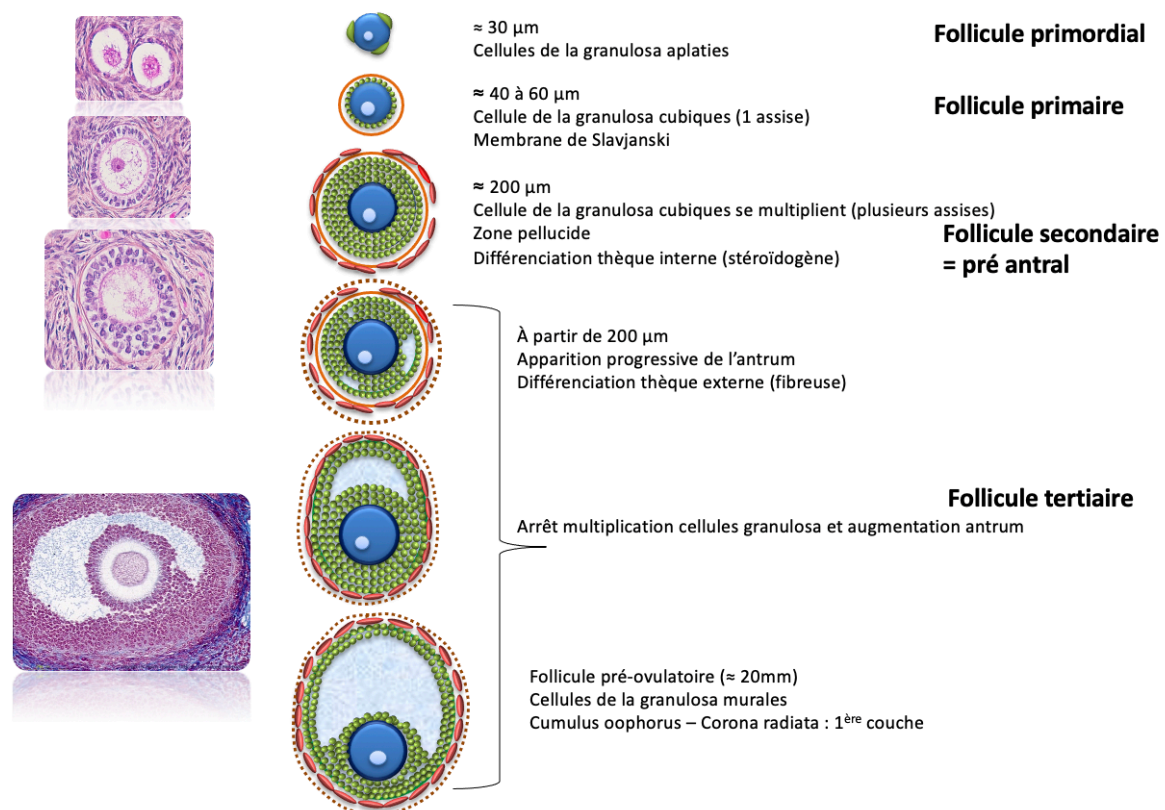


Figure 54 : Schéma récapitulatif de la maturation du follicule d'après Collado *et al.* (179)

VI.1.2.2. Rôle des cellules de la granulosa dans la croissance ovocytaire

L'ovocyte passe d'un diamètre de moins de 40 μm à 120 μm en 14 jours environ. Cinq types d'interactions ont été identifiées entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa (180) :

- Des contacts intercellulaires directs en l'absence de jonctions
- Des interactions classiques ligand-récepteur
- Des voies de signalisation paracrines
- Des GAP jonctions et des jonctions via des projections transzonales (TZP) (Figure 55)
- Des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs)

Ainsi, de petits métabolites tels que des substrats énergétiques, des nucléotides et des acides aminés sont apportés à l'ovocyte par les cellules de la granulosa qui l'entourent, par l'intermédiaire de ces jonctions. Ces jonctions jouent un rôle crucial dans le support nutritif et la signalisation de la maturation ovocytaire. Des ovocytes partiellement décoronisés avec seulement une couche de cellules de la granulosa ont des taux de maturation bien inférieurs à ceux qui sont toujours totalement entourés. Par ailleurs, les cellules de la granulosa régulent les taux de synthèse de protéines spécifiques et le profil de phosphorylation dans les ovocytes en croissance, ce qui régule directement leur métabolisme (178).

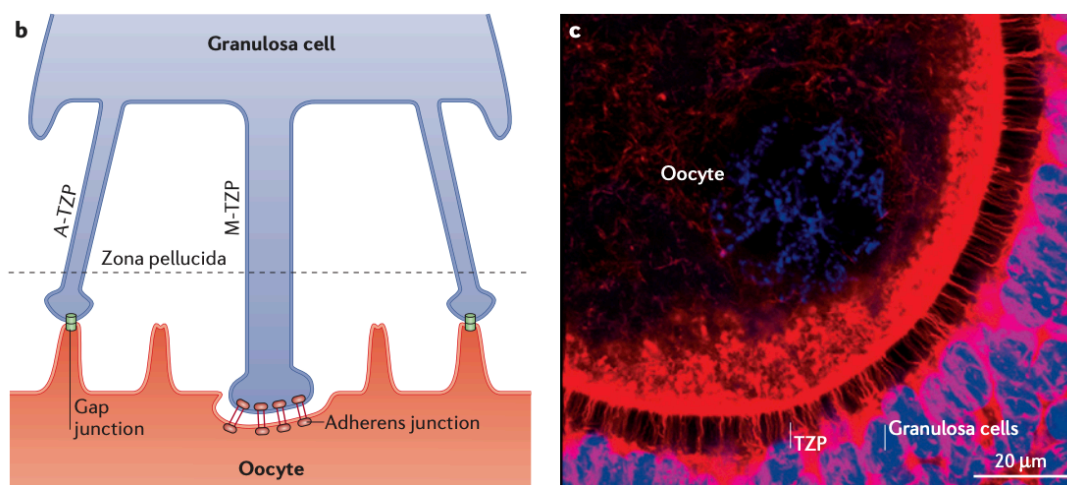


Figure 55 : Projections transzonales (TZP) des cellules de la granulosa au travers de la zone pellucide et formation de jonctions adhérentes et/ou de GAP jonctions avec la membrane plasmique de l'ovocyte (181)

VI.1.2.3. Rôle des cellules de la granulosa dans la régulation de la maturation méiotique

La première étape dans la reprise de la méiose de l'ovocyte, initiée par le pic de LH, est la dissolution de la membrane nucléaire, appelée également rupture de la vésicule germinative (Germinal Vesicle Break Down, GBD). En effet, le blocage méiotique en prophase I est maintenu par le passage de signaux inhibiteurs du cycle cellulaire des cellules du cumulus vers l'ovocyte ; l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) étant le facteur fondamental assurant cet arrêt méiotique (180).

La concentration d'AMPc intra ovocytaire est augmentée via différents mécanismes (Figure 56) :

- Directement des cellules de la granulosa via les GAP jonctions
- Via un récepteur à protéine G stimulant l'activité de l'adénylate cyclase
- Via le GMPc apporté par les cellules de la granulosa, via les jonctions communicantes, qui inhibe la dégradation de l'AMPc en inhibant la phosphodiesterase

L'AMPc active la Protéine Kinase AMPc dépendante qui inhibe la MAPK (« Mitogen Activated Protein Kinase ») et le MPF (« M-Phase Promoting Factor ») (180).

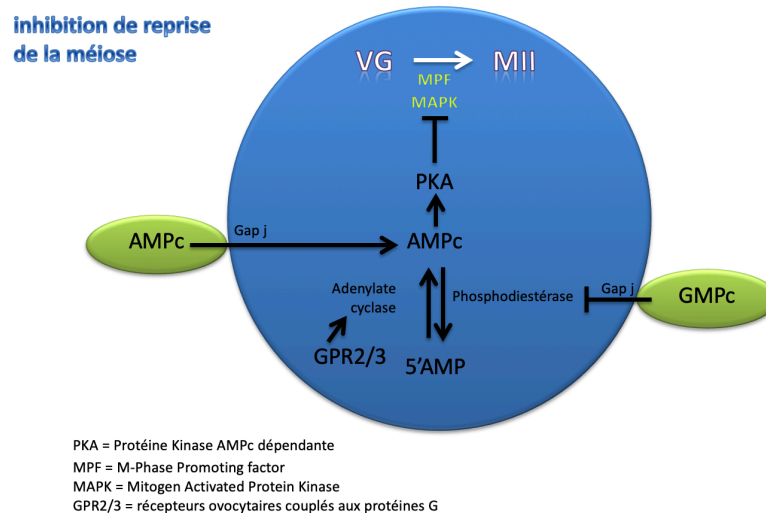


Figure 56 : Schéma représentatif des mécanismes moléculaires à l'origine de l'inhibition de la reprise de la méiose ovocytaire

La levée de cette inhibition et l'entrée en métaphase de la méiose I implique une cascade de signalisation complexe qui repose sur des protéines de type facteur de croissance épidermique (EGF) qui inhibent l'entrée d'AMPc et de GMPc, activant ainsi MPF et MAPK (Figure 57) (180).

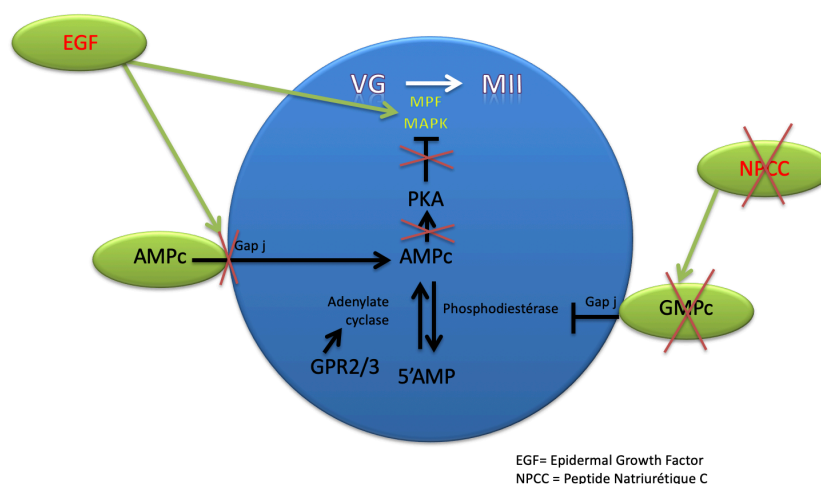


Figure 57 : Schéma représentatif des mécanismes moléculaires impliqués dans la reprise de la méiose ovocytaire

Avant l'ovulation, l'ovocyte doit réaliser une maturation finale pour devenir apte au développement. Pendant la maturation folliculaire, les cellules du cumulus se multiplient comme une lignée cellulaire distincte en même temps qu'elles synthétisent l'antrum sous l'effet de signaux régulateurs, tels que GDF9 et BMP15, émis par l'ovocyte. En modifiant le destin des cellules de la granulosa les plus adjacentes, la cellule germinale crée un microenvironnement intrafolliculaire spécialisé mieux adapté pour répondre à ses propres exigences métaboliques et cellulaires. Avant et pendant la maturation, les cellules de la granulosa activent des voies métaboliques spécifiques et transmettent des molécules peu synthétisées par l'ovocyte, comme le pyruvate, le cholestérol et divers acides aminés, indispensables à la maturation cytoplasmique ovocytaire. En outre, les cellules folliculaires contrôlent l'arrêt et la reprise de la méiose (180).

En conclusion, toutes ces découvertes sous-tendent le concept selon lequel l'acquisition de la compétence développementale des ovocytes au cours de la maturation est influencée de manière cruciale par l'environnement environnant, notamment les cellules de la granulosa.

VI.1.3. Longueur des télomères dans les leucocytes : un bon témoin de la longueur des télomères dans le corps entier ?

Mesurer la longueur des télomères dans les cellules de la granulosa (CGLT) présente des limitations pratiques importantes qui empêchent son utilisation comme biomarqueur dans la pratique clinique courante. La plus importante étant que l'analyse ne peut être réalisée qu'après récupération des cellules folliculaires lors d'une ponction ovocytaire, ce qui ne s'adresse donc qu'à des patientes réalisant une FIV.

Dans le but de contourner cet obstacle, il serait souhaitable de mesurer les télomères de cellules facilement accessibles comme par exemple des cellules dans le sang circulant. Mais cela n'a d'intérêt que si la longueur des télomères dans les leucocytes reflète celle des télomères dans le corps entier (38).

Or la longueur des télomères dans une cellule donnée dépend :

- 1) De la longueur télomérique à la naissance dans les cellules souches à l'origine de la cellule considérée
- 2) De l'index mitotique du tissu
- 3) De l'âge de l'individu
- 4) De l'activité télomérase dans le tissu donné
- 5) De toutes les conditions physiopathologiques pouvant augmenter l'index mitotique et pouvant altérer ou (ré)-activer l'activité télomérasique (38)

La longueur des télomères leucocytaires (LTL) est souvent utilisée dans les études cliniques qui ne prennent pas en compte la plupart du temps l'hétérogénéité de cinétique d'atréxie télomérique en fonction des tissus. Jusqu'à aujourd'hui, peu d'études ont exploré la relation entre la longueur des télomères dans les différents types cellulaires et les résultats ne sont pas clairs (38).

Pour certains types cellulaires, la relation a été mise en évidence : ainsi en 2013, Ferlin *et al.* a montré que la longueur des télomères dans les spermatozoïdes était fortement corrélée à la longueur des télomères dans les leucocytes, bien que ces derniers soient significativement plus courts que dans les cellules germinales, ce qui est logique étant donné l'activité télomérasique importante dans les spermatogonies (Figure 58) (59).

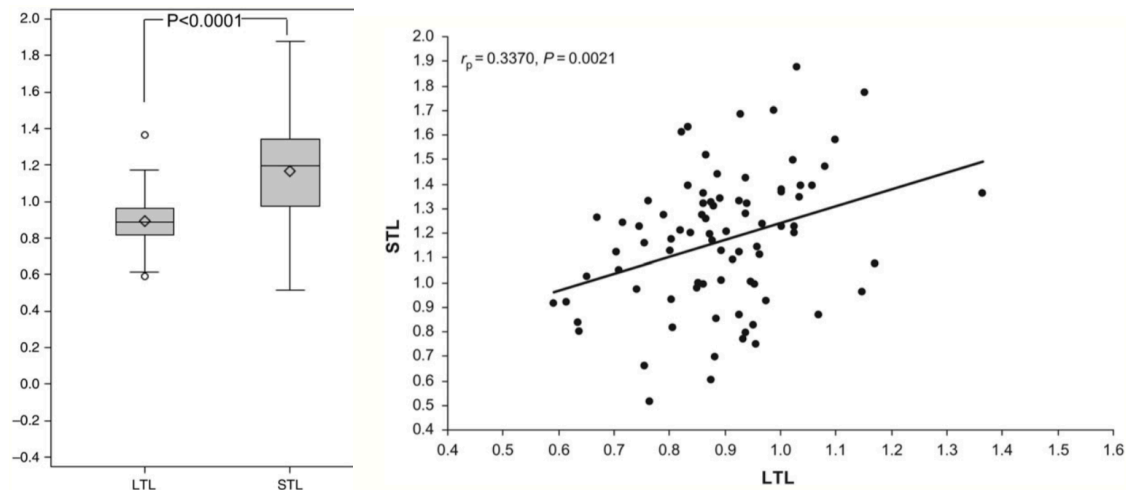


Figure 58 : Longueur des télomères dans les leucocytes (LTL) et dans les spermatozoïdes (STL) à gauche ; Corrélation entre la longueur des télomères dans les leucocytes et dans les spermatozoïdes à droite (59)

De la même, une étude de 2018 a comparé la longueur des télomères des cellules du cumulus et des leucocytes et a retrouvé des télomères plus longs dans les cumulus que dans les cellules sanguines (Figure 59) (182).

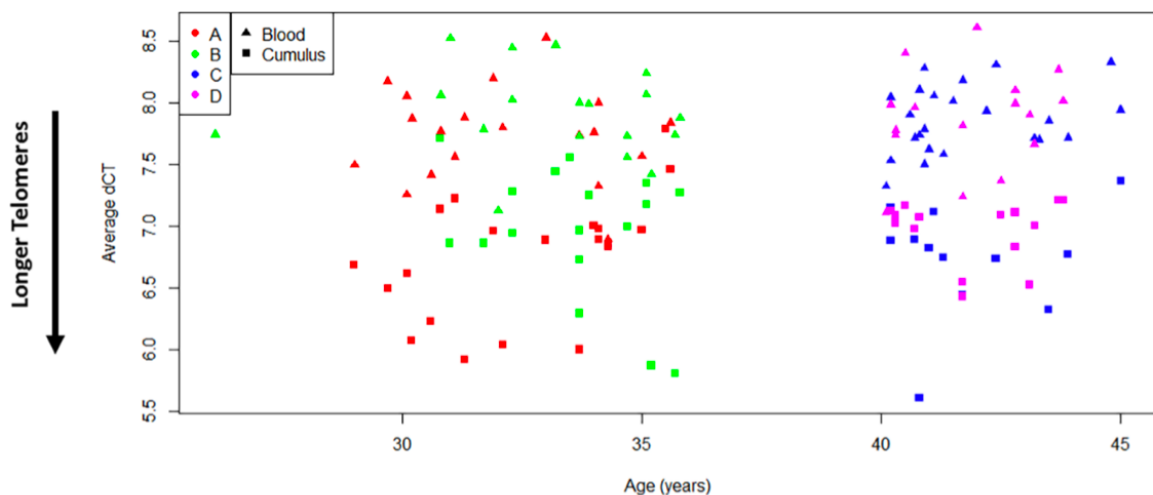


Figure 59 : Longueur des télomères dans les leucocytes et dans les cumulus en fonction de l'âge (182)

Plusieurs études ont cherché à étudier l'implication des télomères dans l'infertilité humaine. La revue de la littérature qui suit étudie un éventuel lien entre d'une part, la longueur des télomères et/ou l'activité télomérase dans les cellules de la granulosa et dans les leucocytes et, d'autre part la survenue d'une IOP.

En effet, puisque les cellules de la granulosa doivent intensément se diviser durant la maturation folliculaire, des télomères courts et/ou une activité télomérase basse pourraient limiter leurs capacités mitotiques, impacter la compétence ovocytaire et ainsi altérer la fertilité (183).

Cette revue de la littérature a fait l'objet d'une publication dans le « Journal of ovarian Research » en août 2020 et dans « Biomedicines » en juillet 2021 (Annexes 1 et 2).

VI.2. Matériels et méthodes

Les bases de données PubMed et Science Direct ont été consultées en date du 01/01/2021. La recherche documentaire la plus exhaustive possible a été effectuée conformément à l'énoncé PRISMA (« Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses ») et les mots-clés suivants ont été utilisés : (telomere length OR telomerase) AND (primary ovarian insufficiency OR premature ovarian failure OR occult ovarian insufficiency OR hypergonadotropic ovarian failure OR premature ovarian insufficiency)

Cette recherche a permis de recenser 28 articles dont 2 étaient des études expérimentales mesurant la longueur des télomères et/ou l'activité télomérase dans les cellules de la granulosa et 4 mesurant ces paramètres dans les leucocytes de patientes en IOP (Figure 60).

Pour chacune de ces études, il a été déterminé s'il existait une corrélation positive ou négative entre les paramètres télomériques et l'IOP. Les données ont été regroupées sous forme de tableaux synthétisant les résultats, mais également les caractéristiques des populations étudiées (nombre de sujets, âges, critères de sélection), le type d'échantillon étudié et les méthodes de mesure utilisées .

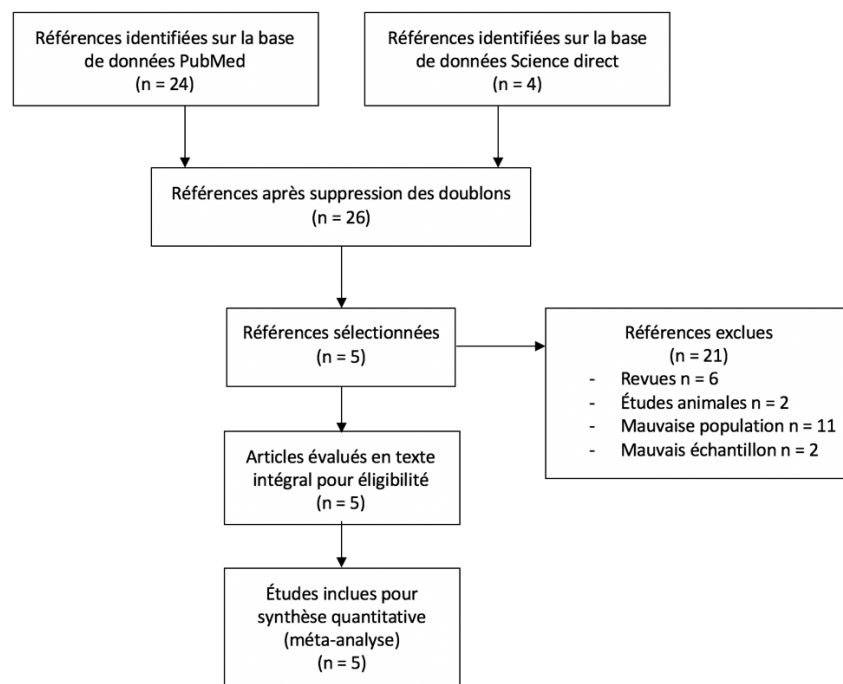


Figure 60 : Diagramme PRISMA pour l'identification et la sélection des études

VI.3. Résultats de la revue systématique de la littérature

VI.3.1. Longueur des télomères

VI.3.1.1. Sujets

Tableau VI : Caractéristiques des sujets en IOP et des contrôles dans les différentes études

Auteurs	Nombre de sujets	Définition	Age
Butts <i>et al.</i>, 2009 (185)	(n = 12) IOP	FSH $\geq$ 11,4 UI/L et estradiol $\leq$ 293,6 pmol/L	30 - 37
	(n = 42) Contrôles	FSH normale, infertilité tubaire ou masculine	23 - 37
Hanna <i>et al.</i>, 2009 (145)	(n = 34) IOP	Aménorrhée de 3 mois, FSH > 40 UI/L avant 40 ans	21 - 50
	(n = 108) Contrôles	Population Générale	17- 55
Xu <i>et al.</i>, 2017 (28)	(n = 120) IOP	Cycles réguliers, FSH $\geq$ 10 UI/L, CFA unilatéral < 5	$\leq$ 40
	(n = 90) Contrôles GCs	Absence de critères	$\leq$ 40
	(n = 279) Contrôles Leuc	Absence de critères	$\leq$ 40
Miranda-Furtado <i>et al.</i>, 2018 (186)	(n = 46) IOP	Aménorrhée, FSH > 40 UI/L avant 40 ans	18 - 41
	(n = 75) Contrôles	Cycles réguliers, FSH < 10 UI/L	18 - 41
Sayban <i>et al.</i>, 2018 (184)	(n = 40) IOP	Aménorrhée de 6 mois, FSH > 40 UI/L avant 40 ans	< 40
	(n = 40) Contrôles	Cycles réguliers, FSH normale	< 40

VI.3.1.2. Méthode de mesure

Les 5 études portant sur la mesure de la longueur des télomères dans les cellules de la granulosa et/ou dans les leucocytes ont toutes utilisé comme méthode de mesure la PCR quantitative en temps réel de Cawthon (2002) (187).

Après extraction, l'ADN télomérique est amplifié par PCR parallèlement à un produit génique à copie unique : le gène de la β globine (187).

Cette stratégie pour déterminer la longueur relative des télomères consiste à mesurer, pour chaque échantillon d'ADN, le facteur par lequel l'échantillon diffère d'un échantillon d'ADN de référence. Les résultats sont exprimés sous forme d'un rapport : nombre de copies de télomères (T) sur nombre de copies du gène référence (S). Ainsi $(T/S) = 1$ lorsque le nombre de copies répétées d'ADN inconnu est identique à l'ADN de référence. Ce rapport est donc proportionnel à la longueur moyenne des télomères (187).

Dans chaque étude la longueur moyenne des télomères dans les échantillons analysés varie considérablement. Ceci peut s'expliquer par les différents kits de réactifs pour une même méthode ainsi que les conditions de réalisation. Les valeurs de longueurs de télomères ne sont donc pas comparables d'une étude à l'autre et doivent être validées indépendamment dans chaque laboratoire (75).

VI.3.1.3. Résultats

Dans les 2 études mesurant la longueur des télomères dans les cellules de la granulosa, il a été retrouvé qu'elle est inférieure chez les patientes en IOP par rapport aux contrôles.

Les 4 études mesurant la longueur des télomères dans les leucocytes retrouvent des résultats divergents. Deux d'entre elles ont mis en évidence des télomères plus courts chez les patientes en insuffisance ovarienne alors que les deux autres ont retrouvé des télomères plus longs chez ces mêmes patientes par rapport aux contrôles. Les résultats des différentes études sont résumés dans le Tableau VII.

Tableau VII : Résultats de la longueur des télomères

Auteurs	Échantillons	Résultats
Butts <i>et al.</i>, 2009 (185)	Cellules de la granulosa	IOP : $1,88 \pm 0,69^a$ Contrôles : $3,15 \pm 0,25$
	Leucocytes	IOP : $9,61 \pm 1,38^b$ Contrôles : $8,98 \pm 1,15$
Xu <i>et al.</i>, 2017 (28)	Cellules de la granulosa	IOP : $0,78 \pm 0,09^c$ Contrôles : $1,90 \pm 0,23$
	Leucocytes	IOP : $0,75 \pm 0,09^d$ Contrôles : $1,79 \pm 0,12$
Miranda-Furtado <i>et al.</i>, 2018 (186)	Leucocytes	IOP : $0,93 \pm 0,23^e$ Contrôles : $1,07 \pm 0,27$
	Leucocytes	IOP : $0,7445^f$ Contrôles : $0,5994$

^ap = 0,039 ^bp = 0,01 ^cp < 0,001 ^dp < 0,001 ^ep < 0,0006 ^fp < 0,05

VI.3.2. Activité télomérase

VI.3.2.1. Sujets

Tableau VIII : Caractéristiques des sujets étudiés

Auteurs	Nombre de sujets	Définition	Age
Butts <i>et al.</i>, 2009 (185)	(n = 12) IOP	FSH $\geq 11,4$ UI/L et estradiol $\leq 293,6$ pmol/L	30 - 37
	(n = 42) Contrôles	FSH normale, infertilité tubaire ou masculine	23 - 37
Xu <i>et al.</i>, 2017 (28)	(n = 31) IOP	Cycles réguliers, FSH ≥ 10 UI/L, CFA unilatéral < 5	≤ 40
	(n = 38) Contrôles	Absence de critères	≤ 40

VI.3.2.2. *Méthode de mesure*

Butts *et al.* (2009) : PCR TRAPeze Telomerase Detection Kit

Après récupération des cellules de la granulosa et lyse, le surnageant est recueilli afin de limiter la présence de débris cellulaires et la concentration totale en protéines est mesurée. Le contrôle négatif consiste en un échantillon exposé à la chaleur afin d'inactiver la télomérase. Des cellules de rein humain, connues pour leur forte activité télomérase, peuvent être utilisées comme contrôle positif. Le milieu de culture de l'expérience est composé d'une quantité fixe de protéines, d'un substrat de la télomérase, des amorces, des nucléotides, la Taq polymérase qui permet d'amorcer la première étape d'élongation.

La réalisation d'une PCR en 2 étapes permet d'amplifier les produits de la télomérase. Les amplicons seront soumis à électrophorèse en gel polyacrylamide puis révélés après incubation avec un révélateur pour identifier les bandes d'ADN télomérique. L'activité télomérase, positive ou négative, est déterminée par la présence ou l'absence d'un motif caractéristique des produits de télomères en comparaison à des témoins comme montré dans la Figure 61 (168,175,185).

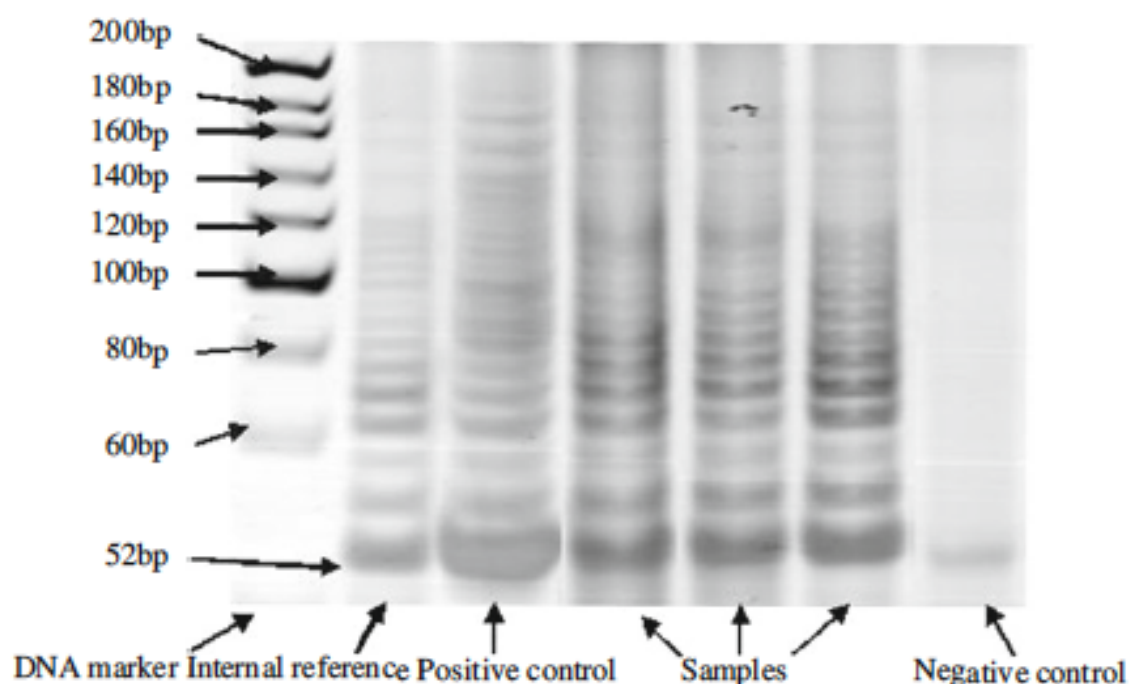


Figure 61 : Exemple de résultats d'activité télomérase obtenus après protocole TRAPeze et révélation (175)

Xu *et al.* (2017) : PCR Q-TRAP

De la même manière que pour la technique précédente, l'activité télomérase est évaluée en utilisant une mesure modifiée d'un protocole d'amplification quantitative des portions répétées des télomères (Q-TRAP) et est déterminée grâce à une courbe de calibration (28). Cette méthode permet d'obtenir des résultats quantitatifs contrairement à la méthode précédente qui donne un résultat qualitatif (absence ou présence d'activité télomérase).

VI.3.2.3. *Résultats*

Tableau IX : Résultats de la mesure de l'activité télomérase

Auteurs	Expression	Résultats
Butts <i>et al.</i>, 2009 (185)	Absence d'un motif spécifique des produits de télomérase	IOP : 11/12 (92%) ^a Contrôles : 21/42 (50%)
Xu <i>et al.</i>, 2017 (28)	Activité télomérase relative	IOP : 1,57 ± 0,59 ^b Contrôles : 4,63 ± 0,93

^ap = 0,02, OR = 11 ^bp = 0,025

Dans les deux études, l'activité télomérase était supérieure dans les cellules de la granulosa des contrôles par rapport aux IOP. Les résultats sont résumés dans le Tableau IX.

VI.4. Synthèse de la revue systématique de la littérature

Tableau X : Tableau de synthèse des différentes études (cases grisées pour les études retrouvant des télomères plus longs chez les femmes IOP)

Auteurs	Échantillons	Sujets	Paramètres	Méthode	Résultats
Butts <i>et al.</i>, 2009 (185)	Cellules de la granulosa	(n = 12) IOP (n = 42) Contrôles	LT	qPCR	Télomères plus courts chez IOP
	Cellules de la granulosa	(n = 12) IOP (n = 42) Contrôles	AT	PCR TRAPeZe	Absence de TA plus fréquente chez IOP
Hanna <i>et al.</i>, 2009 (145)	Leucocytes	(n = 34) IOP (n = 108) Contrôles	LT	qPCR	Télomères plus longs chez IOP
Xu <i>et al.</i>, 2017 (28)	Cellules de la granulosa	(n = 120) IOP (n = 90) Contrôles	LT	qPCR	Télomères plus courts chez IOP
	Leucocytes	(n = 120) IOP (n = 279) Contrôles	LT	qPCR	Télomères plus courts chez IOP
	Cellules de la granulosa	(n = 31) IOP (n = 38) Contrôles	AT	PCR Q-TRAP	Activité télomérase plus faible chez IOP
Miranda-Furtado <i>et al.</i>, 2018 (186)	Leucocytes	(n = 46) IOP (n = 75) Contrôles	LT	qPCR	Télomères plus courts chez IOP
Sayban <i>et al.</i>, 2018 (184)	Leucocytes	(n = 40) IOP (n = 40) Contrôles	LT	qPCR	Télomères plus longs chez IOP

Le Tableau X présente une compilation des résultats obtenus dans les différentes études concernant la longueur des télomères (LT) et l'activité télomérase (AT) dans les cellules de la granulosa et dans les leucocytes de patientes en IOP et de patientes contrôles.

VI.5. Discussion

VI.5.1. Longueur des télomères et activité télomérase dans les cellules de la granulosa

Les études de Butts *et al.* et Xu *et al.* ont montré que les cellules de la granulosa chez les patientes IOP ont des télomères plus courts que chez les contrôles. De plus, l'activité télomérase semble également être diminuée chez ces patientes.

Ces résultats démontrent que les télomères courts sont associés à une baisse de la fertilité et que la longueur des télomères est corrélée de façon positive avec la durée de vie reproductive chez les femmes (28,185).

L'hypothèse expliquant l'impact des télomères courts dans les cellules de la granulosa sur la fertilité féminine pourrait être la limitation des capacités de prolifération des cellules ayant des télomères courts (188). La capacité limitée de prolifération des cellules de la granulosa semble être une caractéristique qui différencie les femmes en IOP des femmes fertiles. Cela illustre le fait que le développement des follicules ovariens nécessite une augmentation explosive du nombre de cellules de la granulosa de quelques cellules à des dizaines de milliers avant l'ovulation (185).

Une activation insuffisante de la télomérase dans les stades précoces du développement folliculaire pourrait accélérer l'attrition des télomères et sévèrement compromettre les fonctions cellulaires nécessaires à la bonne maturation folliculaire (185,189,190).

Depuis plusieurs années, les cellules de la granulosa sont considérées comme des cellules ayant un potentiel de cellules souches multipotentes (191), avec la possibilité de se diviser sans avoir besoin d'un ancrage (192) et de se différencier en différents types cellulaires (193). Comme des cellules souches, elles présentent une importante activité télomérase (194,195). Cette activité télomérase a été étudiée au travers de différents types de follicules ovariens et au cours du vieillissement, particulièrement chez les bovins (196). L'activité télomérase la plus importante est retrouvée dans les petits follicules pré-antraux (197) puis on observe une diminution de cette activité durant la maturation folliculaire (189). Ceci suggère que l'importante prolifération des cellules de la granulosa pourrait être en partie liée à l'activité télomérase (198) et supporte l'hypothèse qu'une baisse de cette activité pourrait être impliquée dans la survenue ou l'aggravation de l'IOP. Cependant, les conclusions obtenues sur l'activité télomérase sont tirées d'études menées pour la plupart sur des cellules de la granulosa lutéinisées et totalement différenciées qui sont morphologiquement distinctes de cellules de la granulosa qui prolifèrent dans les stades précoces des follicules (185).

VI.5.2. Longueur des télomères dans les leucocytes

Le lien hypothétique entre la longueur des télomères dans les leucocytes et la fertilité féminine est basé sur le fait que LTL et GTL devraient être corrélées.

Il est reconnu que la longueur des télomères est synchronisée dans les différents tissus à la naissance (71) et que malgré les différentes longueurs de télomères observées dans les tissus du fait d'index prolifératifs différents, il existe une importante corrélation qui subsiste tout au long de la vie entre les différents tissus (72). Cependant, cette synchronisation pourrait potentiellement ne pas s'appliquer aux cellules de la granulosa puisque la dynamique télomérique de ces cellules est influencée par l'activité télomérase. La revue systématique de la littérature concernant la longueur des télomères dans les leucocytes de femmes ayant une insuffisance ovarienne prématurée présente des résultats contradictoires.

Tout d'abord, Hanna *et al.* ainsi que Sayban *et al.* concluent que les femmes souffrant d'IOP présentent des télomères leucocytaires plus longs. Selon eux, ces résultats vont à l'encontre des résultats initialement attendus visant à démontrer que les femmes en IOP ont un vieillissement cellulaire global accéléré (145,184).

La première hypothèse qu'ils évoquent afin d'expliquer leurs résultats est une tendance génétique constitutionnelle à l'augmentation de l'espérance de vie en engendrant des divisions cellulaires plus lentes. Du fait de divisions cellulaires prolongées au niveau des cellules germinales, le pool de follicules est réduit et les patientes ont davantage de risque de développer une insuffisance ovarienne prématurée par épuisement du pool d'ovocytes. Comme il y a moins de divisions cellulaires en général, les télomères sont relativement plus longs chez ces patientes (145,184).

La deuxième hypothèse proposée par les auteurs est que les télomères plus longs chez les patientes IOP sont le résultat d'un mécanisme d'auto-immunité fréquemment retrouvé dans cette population. Ce phénomène auto-immun pourrait modifier la répartition des cellules sanguines en sélectionnant un type de cellules avec des télomères plus longs. Peut-être les auteurs veulent-ils évoquer les populations de lymphocytes B activés, à l'origine de la production d'anticorps, présentant une activité télomérase importante. Il est cependant peu probable que ces contingents lymphocytaires modifient la longueur moyenne de l'ensemble des lymphocytes circulants, comme en témoignent les études sur longueur des télomères et auto-immunité suggérant que les maladies auto-immunes seraient associées à des télomères plus courts plutôt qu'à des télomères plus longs (145,184).

La troisième hypothèse est que l'hormonothérapie substitutive à long terme donnée à ces patientes ralentit le taux d'attrition des télomères en protégeant les télomères des espèces réactives de l'oxygène. Les œstrogènes induisent également l'expression de hTERT et donc l'activité télomérase. Cependant, les auteurs n'ont pas mesuré les taux d'estradiol chez ces patientes et dans l'étude de Miranda-Furtado *et al.*, il n'a pas été démontré de corrélation entre la longueur des télomères et les taux d'estradiol (145,184,186).

Sayban *et al.* ne mentionnent pas l'âge moyen des patientes incluses dans les groupes IOP et contrôles. Dans la mesure où la longueur des télomères est fortement influencée par l'âge, cela constitue un important biais dans cette étude (184).

Par ailleurs, Hanna *et al.*, n'ont pas démontré de différence significative dans la longueur des télomères entre les différents groupes d'âge. Or, il est maintenant bien établi que les télomères raccourcissent avec l'âge. Cette observation illogique pourrait être due aux petits effectifs dans certains groupes. Pour finir, les auteurs concluent que les résultats obtenus ne sont pas très significatifs en raison de l'imprécision du phénotype des patientes incluses (145).

Contrairement aux deux précédentes études, Xu *et al.* et Miranda-Furtado *et al.* ont retrouvé des télomères plus courts dans les leucocytes de femmes présentant une insuffisance ovarienne par rapport aux contrôles (28,186). Ces résultats confortent l'hypothèse de « synchronisation des télomères » entre les différents tissus. Si cette conclusion est vérifiée, cela permettrait de s'affranchir du prélèvement de cellules de la granulosa pour mesurer la longueur des télomères et ainsi effectuer l'analyse sur une simple prise de sang. Cependant, ces deux études pilotes ont été réalisées avec des effectifs limités et nécessitent d'être confirmées avec un plus grand nombre de sujets, d'autant plus que les deux autres études sur cette thématique présentent des résultats contradictoires. Plus récemment, une étude réalisée chez 35 donneuses d'ovocytes fertiles n'a pas retrouvé d'association entre la longueur des télomères dans les cellules de la granulosa et dans les leucocytes (199).

Il est intéressant de remarquer que toutes ces études sont basées sur une mesure de la longueur des télomères par qPCR. Or, cette méthode présente une forte incertitude de mesure (200,201) et requiert une taille d'échantillons importante afin de compenser cette erreur, ce qui n'était pas le cas dans les 5 études examinées.

Par ailleurs, les importantes différences dans les critères d'inclusion de ces études constituent également un biais important. Par exemple, les seuils des taux de FSH utilisés comme critères d'IOP varient de 10 UI/L dans Xu *et al.* à 40 UI/L chez Hanna *et al.*, Miranda Furtado *et al.* et Sayban *et al.* (Tableau VI). Dans l'étude de Xu *et al.*, les patientes présentent uniquement des critères d'IOP biochimique et pas de symptômes cliniques puisqu'elles ont toujours des cycles réguliers. La littérature ne met pas en évidence de lien direct entre les taux de FSH et la longueur des télomères. Cependant, d'importants taux de FSH impliquent une faible estradiolémie qui pourrait expliquer une diminution de l'activité télomérase (202) et compromettre la protection des télomères contre les ROS.

De plus, la prise au long cours d'un traitement hormonal de substitution pourrait ralentir l'attrition des télomères. Hanna *et al.* ont inclus des patientes âgées de 21 à 50 ans dont certaines ont sûrement pris une supplémentation hormonale ce qui pourrait également avoir introduit un biais.

En conclusion, les patientes incluses sont à des stades très différents d'IOP ce qui rend la comparaison difficile entre les différentes études.

Il est bien établi que la longueur des télomères et l'activité télomérase sont des facteurs cruciaux pour la capacité de prolifération des cellules dans un tissu. Dans les ovaires, la télomérase compense partiellement le raccourcissement des télomères avec l'âge et de ce fait, « le vieillissement ovarien » est largement corrélé à l'activité télomérase dans les cellules de la granulosa.

En se basant sur cette hypothèse, la réserve de follicules ovariens semble être la résultante d'une fonction complexe où un nombre de follicules au temps « t » dépend du pool de follicules établis lors du 5^{ème} mois de la vie intra utérine et du nombre de follicules ayant chaque mois disparu jusqu'à ce même temps « t ». Si la constitution du pool de follicules primordiaux lors des premiers mois de la grossesse semble davantage corrélée à la longueur des télomères et à l'activité télomérase des ovogonies ; la cinétique de disparition de ces follicules après la naissance semble plutôt dépendante de la longueur des télomères et de l'activité télomérase dans les cellules de la granulosa.

Des modèles mathématiques ont été réalisés dans le but de prédire une diminution de la fertilité avec l'âge en fonction de la longueur des télomères et de l'activité télomérase dans les cellules de la granulosa. Une infertilité pourrait donc être la cause soit d'une activité télomérase diminuée et des télomères courts, soit d'une exposition répétée au stress oxydatif (203,204). La conclusion de ces modèles est l'importance d'une forte activité télomérase ovarienne afin de préserver la fertilité au cours du vieillissement. Il n'est donc pas surprenant d'observer que dans la dyskératose congénitale (DKC), téloméropathie caractérisée par une faible activité télomérase et des télomères courts, les femmes présentent une réserve ovarienne diminuée avec des taux d'AMH abaissés (205) et des fonctions reproductives altérées (206).

Comme le proposent certains auteurs, la restauration de l'activité ovarienne pourrait être obtenue en induisant une réactivation de la télomérase. L'exposition des ovaires à quatre facteurs identifiés par Yamanaka et Takahashi (Oct3/4, Sox2, c-Myc et 396 Klf4) est souvent citée (207). c-Myc et Klf4 sont des activateurs connus de l'activité télomérase (208,209). Des expérimentations animales sur l'activation de la télomérase ont permis d'augmenter la longévité des souris sans augmenter le développement de tumeurs (210). De plus, chez des souris âgées, déficientes en télomérase, la réactivation de la télomérase a permis la restauration de la fertilité animale (211). Chez l'Homme, diverses méthodes de régénération ont été proposées. Notamment l'administration de plasma riche en plaquettes (PRP) qui permettrait de rétablir la capacité de prolifération des cellules souches dormantes (212). Le PRP contient de nombreux facteurs de croissance favorisant la survie et la prolifération des cellules souches ovariennes directement ou indirectement via une activation de la télomérase (213). Cependant, en activant la télomérase soit par une stratégie de thérapie génique soit par un traitement, le risque de cancer apparaît comme une menace réelle (214). En effet, une activité télomérase élevée est retrouvée dans bon nombre de cancers ovariens (215,216).

VII. Ouverture : régulation épigénétique de la longueur des télomères et de la télomérase

De récents travaux ont démontré que le profil de méthylation réalisé dans un grand nombre de tissus somatiques pourrait permettre de prédire l'âge des Hommes. Ce concept est connu sous le nom « d'horloge épigénétique » et a été développé à partir d'une large base de données comprenant plus de 7 800 méthylomes de tissus humains (182).

En 2013, Horvath a créé un algorithme dérivé du profil de méthylation de 353 sites CpG répartis dans tout le génome afin de déterminer l'âge civil d'une personne avec une précision médiane de 43 mois (182).

Dans leur étude, Morin *et al.* ont confirmé que l'algorithme de Horvath permet de prédire l'âge d'un sujet en utilisant le profil de méthylation des leucocytes. Les résultats sont illustrés dans la Figure 62 dans laquelle la droite noire indique une corrélation parfaite entre l'âge calculé et l'âge réel. En revanche, dans les cellules de la granulosa, l'âge épigénétique calculé est significativement plus jeune que l'âge réel des patientes (182).

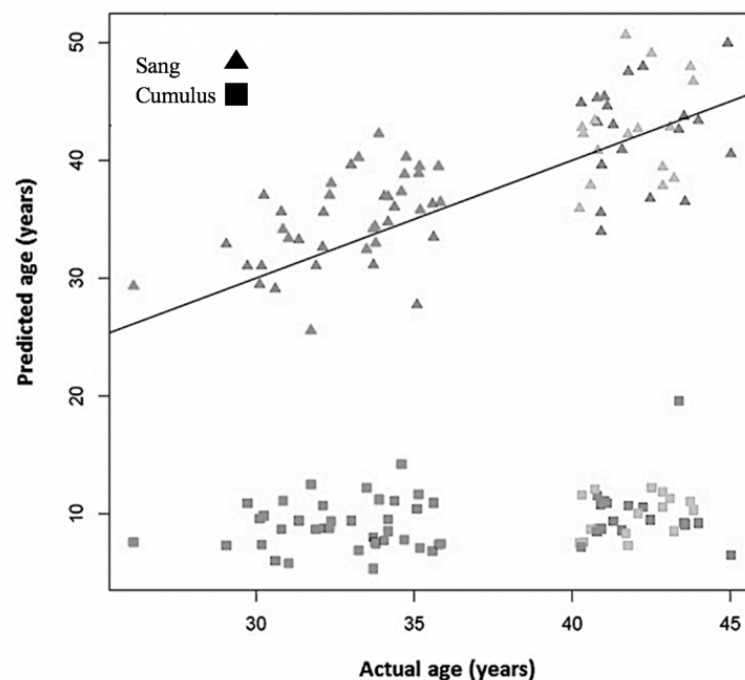


Figure 62 : "353 CpG epigenetic clock" dans les cellules du sang et du cumulus pour prédire l'âge chronologique (182).

Les auteurs ont également mesuré la longueur des télomères dans les leucocytes et dans les cellules de la granulosa. Ils ont ainsi mis en évidence des télomères en moyenne 2 fois plus longs dans le cumulus que dans le sang chez un même sujet. Ce résultat est en adéquation avec celui retrouvé dans l'algorithme épigénétique, à savoir que « l'âge biologique » dans les cellules de la granulosa est significativement plus jeune que dans les autres tissus somatiques et donc les télomères sont plus longs (182).

Le fait que les cellules du cumulus ne suivent pas le modèle de Horvath, contrairement à beaucoup d'autres tissus, pourrait être expliqué par un mécanisme encore inconnu qui concernerait les tissus subissant des modifications hormonales cycliques. En effet, les cellules endométriales et mammaires ne suivent également pas cet algorithme (182).

Des auteurs, ayant étudié le méthylome dans les leucocytes, ont retrouvé une association significative entre l'augmentation de l'âge épigénétique et la ménopause précoce. Cependant, comme les données sont issues de profils de femmes ménopausées, il n'est pas possible d'établir si c'est la ménopause qui engendre ces modifications ou si, à l'inverse, les patientes ont initialement un profil de vieillissement accéléré (182).

Les résultats de cette étude démontrent que l'algorithme de vieillissement développé sur la base d'une analyse du méthylome des cellules somatiques ne permet pas de prédire le déclin de la fonction ovarienne. Bien que cette différence puisse être expliquée par une méthylation alternative des sites CpG dans les cellules de la granulosa, le fait que des télomères plus longs soient observés dans ce type cellulaire suggère qu'il existe d'autres phénomènes qui modulent l'âge biologique de ces cellules et donc l'évolution des fonctions de reproduction (182).

VIII. Conclusion

Des télomères courts et une activité télomérase diminuée dans les cellules de la granulosa semblent être associés à l'IOP. Des études prospectives bien menées dans des populations aux biais contrôlés (biais de population et biais de mesure des LT) sont donc nécessaires pour confirmer ces résultats, mais également pour étudier les mécanismes physiologiques qui influencent la longueur des télomères.

C'est dans cette optique que l'Agence de la Biomédecine a accepté de financer l'étude TELEFF pour « Télomères, un marqueur de fertilité féminine ? ». Cette étude bicentrique impliquant le CHRU de Nancy et le CHR de Metz-Mercy vise à mesurer la longueur des télomères dans les cellules de la granulosa et dans les leucocytes de 100 femmes avec une IOP *versus* 100 femmes ayant une bonne réponse à la stimulation ovarienne.

La mesure de ces paramètres pourrait représenter un indicateur précoce et fiable de la progression du déclin de la fonction ovarienne, ce qui pourrait avoir des implications pour la santé féminine, au-delà de la préservation de la fertilité.

Cependant, l'attrition télomérique suspectée chez les patientes IOP est-elle une cause ou une conséquence de la pathologie ? A l'avenir, il sera probablement possible d'établir des scores incluant des marqueurs génétiques permettant de prédire chez une jeune femme son risque de développer une IOP et donc de lui fournir des informations sur la durée potentielle de sa fenêtre de fertilité. Ces aspects s'intègrent parfaitement dans la stratégie d'optimisation de la préservation de la fertilité féminine (24).

REFERENCES

1. Lampic C, Svanberg AS, Karlström P, Tydén T. Fertility awareness, intentions concerning childbearing, and attitudes towards parenthood among female and male academics. *Hum Reprod Oxf Engl.* févr 2006;21(2):558-64.
2. Rimon-Dahari N, Yerushalmi-Heinemann L, Alyagor L, Dekel N. Ovarian Folliculogenesis. *Results Probl Cell Differ.* 2016;58:167-90.
3. European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guideline Group on POI, Webber L, Davies M, Anderson R, Bartlett J, Braat D, et al. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod Oxf Engl.* mai 2016;31(5):926-37.
4. C. Nicolas, A. Bachelot, P. Touraine. Diagnostic de l'insuffisance ovarienne prématurée. 4 Mai 2015. *Avril 2015(395):16-20.*
5. Tilly JL, Telfer EE. Purification of germline stem cells from adult mammalian ovaries: a step closer towards control of the female biological clock? *Mol Hum Reprod.* juill 2009;15(7):393-8.
6. Zheng W, Nagaraju G, Liu Z, Liu K. Functional roles of the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) signaling in the mammalian ovary. *Mol Cell Endocrinol.* 5 juin 2012;356(1-2):24-30.
7. Zhang H, Risal S, Gorre N, Busayavalasa K, Li X, Shen Y, et al. Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice. *Curr Biol CB.* 3 nov 2014;24(21):2501-8.
8. Oktem O, Urman B. Understanding follicle growth in vivo. *Hum Reprod Oxf Engl.* déc 2010;25(12):2944-54.
9. Kidder GM, Mhawi AA. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reprod Camb Engl.* mai 2002;123(5):613-20.
10. Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev.* oct 2009;30(6):624-712.
11. Granulosa Cell - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [cité 6 juill 2021]. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/granulosa-cell>
12. Jiang J-Y, Cheung CKM, Wang Y, Tsang BK. Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia. *Front Biosci J Virtual Libr.* 1 janv 2003;8:d222-237.
13. Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest.* avr 2010;120(4):963-72.
14. Jaffe LA, Egbert JR. Regulation of Mammalian Oocyte Meiosis by Intercellular Communication Within the Ovarian Follicle. *Annu Rev Physiol.* 10 févr 2017;79:237-60.
15. Virant-Klun I, Vogler A. In vitro maturation of oocytes from excised ovarian tissue in a patient with autoimmune ovarian insufficiency possibly associated with Epstein-Barr virus infection. *Reprod Biol Endocrinol RBE [Internet].* 5 avr 2018 [cité 2 mai 2020];16. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5885381/>
16. De Vos M, Devroey P, Fauser BCJM. Primary ovarian insufficiency. *Lancet*

Lond Engl. 11 sept 2010;376(9744):911-21.

17. Coulam CB, Adamson SC, Annegers JF. Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol.* avr 1986;67(4):604-6.

18. Luborsky JL, Meyer P, Sowers MF, Gold EB, Santoro N. Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition. *Hum Reprod Oxf Engl.* janv 2003;18(1):199-206.

19. Committee on Gynecologic Practice. Committee Opinion No. 698: Hormone Therapy in Primary Ovarian Insufficiency. *Obstet Gynecol.* 2017;129(5):e134-41.

20. Rudnicka E, Kruszewska J, Klicka K, Kowalczyk J, Grymowicz M, Skórska J, et al. Premature ovarian insufficiency – aetiopathology, epidemiology, and diagnostic evaluation. *Przegląd Menopauzalny Menopause Rev.* sept 2018;17(3):105-8.

21. Qin Y, Jiao X, Simpson JL, Chen Z-J. Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities. *Hum Reprod Update.* déc 2015;21(6):787-808.

22. França MM, Mendonça BB. Genetics of Primary Ovarian Insufficiency in the Next-Generation Sequencing Era. *J Endocr Soc.* 1 févr 2020;4(2):bvz037.

23. Rossetti R, Ferrari I, Bonomi M, Persani L. Genetics of primary ovarian insufficiency. *Clin Genet.* 2017;91(2):183-98.

24. Laven JSE. Primary Ovarian Insufficiency. *Semin Reprod Med.* 2016;34(4):230-4.

25. Domniz N, Meirow D. Premature ovarian insufficiency and autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 1 oct 2019;60:42-55.

26. Blumenfeld Z. Chemotherapy and fertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* juin 2012;26(3):379-90.

27. Ağaçayak E, Yaman Görük N, Küsen H, Yaman Tunç S, Başaranoğlu S, İçen MS, et al. Role of inflammation and oxidative stress in the etiology of primary ovarian insufficiency. *Turk J Obstet Gynecol.* sept 2016;13(3):109-15.

28. Xu X, Chen X, Zhang X, Liu Y, Wang Z, Wang P, et al. Impaired telomere length and telomerase activity in peripheral blood leukocytes and granulosa cells in patients with biochemical primary ovarian insufficiency. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2017;32(1):201-7.

29. Podfigurna-Stopa A, Czyzyk A, Grymowicz M, Smolarczyk R, Katulski K, Czajkowski K, et al. Premature ovarian insufficiency: the context of long-term effects. *J Endocrinol Invest.* 1 sept 2016;39(9):983-90.

30. Bertone-Johnson ER, Manson JE, Purdue-Smithe AC, Steiner AZ, Eliassen AH, Hankinson SE, et al. Anti-Müllerian hormone levels and incidence of early natural menopause in a prospective study. *Hum Reprod Oxf Engl.* 01 2018;33(6):1175-82.

31. Committee on Gynecologic Practice. Committee opinion no. 605: primary ovarian insufficiency in adolescents and young women. *Obstet Gynecol.* juill 2014;124(1):193-7.

32. J. Belaisch-Allart, J.M. Mayenga, E. Muller, M. Brzakowski, A. Chouraqui, I. Greffenstette, Y. Belaid, O. Kulski. Insuffisance ovarienne prématurée et désir d'enfant [Internet]. 2019 [cité 11 juin 2019]. Disponible sur: http://www.cngof.fr/component/rsfiles/apercu?path=Journes%2Bnationales%252FMAJ%2Ben%2BGO%252F2013%252F2013_GM%252Fgynecologie_medicale%252FInsuffisance_ovarienne_prematuree_et_desir_d%25E2%252580%252599enfant.pdf&i=0

33. Thilagavathi J, Venkatesh S, Dada R. Telomere length in reproduction. *Andrologia*. oct 2013;45(5):289-304.
34. McClintock B. The Behavior in Successive Nuclear Divisions of a Chromosome Broken at Meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. août 1939;25(8):405-16.
35. Olovnikov AM. [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1971;201(6):1496-9.
36. Watson JD. Origin of Concatemeric T7DNA. *Nature New Biol*. oct 1972;239(94):197-201.
37. Blackburn EH, Gall JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol*. 25 mars 1978;120(1):33-53.
38. Herrmann M, Pusceddu I, März W, Herrmann W. Telomere biology and age-related diseases. *Clin Chem Lab Med*. 26 2018;56(8):1210-22.
39. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. sept 1988;85(18):6622-6.
40. Stewart JA, Chaiken MF, Wang F, Price CM. Maintaining the End: Roles of Telomere Proteins in End-Protection, Telomere Replication and Length Regulation. *Mutat Res*. 1 févr 2012;730(1-2):12-9.
41. Srinivas N, Rachakonda S, Kumar R. Telomeres and Telomere Length: A General Overview. *Cancers* [Internet]. 28 févr 2020 [cité 14 mai 2020];12(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7139734/>
42. Parkinson GN, Lee MPH, Neidle S. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature*. juin 2002;417(6891):876-80.
43. Burge S, Parkinson GN, Hazel P, Todd AK, Neidle S. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res*. nov 2006;34(19):5402-15.
44. Veverka P, Janovič T, Hofr C. Quantitative Biology of Human Shelterin and Telomerase: Searching for the Weakest Point. *Int J Mol Sci* [Internet]. 28 juin 2019 [cité 13 mai 2020];20(13). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6651453/>
45. Rice C, Skordalakes E. Structure and function of the telomeric CST complex. *Comput Struct Biotechnol J*. 14 avr 2016;14:161-7.
46. Gilson E, Géli V. How telomeres are replicated. *Nat Rev Mol Cell Biol*. oct 2007;8(10):825-38.
47. Doksani Y, de Lange T. The role of double-strand break repair pathways at functional and dysfunctional telomeres. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 16 sept 2014;6(12):a016576.
48. Sfeir AJ, Chai W, Shay JW, Wright WE. Telomere-end processing the terminal nucleotides of human chromosomes. *Mol Cell*. 1 avr 2005;18(1):131-8.
49. de Lange T. Shelterin-Mediated Telomere Protection. *Annu Rev Genet*. 23 2018;52:223-47.
50. Saretzki G. Telomeres, Telomerase and Ageing. *Subcell Biochem*. 2018;90:221-308.
51. Hemann MT, Strong MA, Hao LY, Greider CW. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell*. 5 oct

2001;107(1):67-77.

52. Hayflick L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochem Biokhimia*. nov 1997;62(11):1180-90.

53. Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*. janv 2010;31(1):9-18.

54. Marcand S, Brevet V, Gilson E. Progressive cis-inhibition of telomerase upon telomere elongation. *EMBO J*. 15 juin 1999;18(12):3509-19.

55. Cesare AJ, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet*. mai 2010;11(5):319-30.

56. Skvortsov DA, Zvereva ME, Shpanchenko OV, Dontsova OA. Assays for Detection of Telomerase Activity. *Acta Naturae*. 2011;3(1):48-68.

57. Lai T-P, Wright WE, Shay JW. Comparison of telomere length measurement methods. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 05 2018;373(1741).

58. Montpetit AJ, Alhareeri AA, Montpetit M, Starkweather AR, Elmore LW, Filler K, et al. Telomere length: a review of methods for measurement. *Nurs Res*. août 2014;63(4):289-99.

59. Ferlin A, Rampazzo E, Rocca MS, Keppel S, Frigo AC, De Rossi A, et al. In young men sperm telomere length is related to sperm number and parental age. *Hum Reprod Oxf Engl*. déc 2013;28(12):3370-6.

60. Codd V, Nelson CP, Albrecht E, Mangino M, Deelen J, Buxton JL, et al. Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. *Nat Genet*. avr 2013;45(4):422-7, 427e1-2.

61. Nawrot TS, Staessen JA, Gardner JP, Aviv A. Telomere length and possible link to X chromosome. *Lancet Lond Engl*. 14 févr 2004;363(9408):507-10.

62. Kimura M, Cherkas LF, Kato BS, Demissie S, Hjelmberg JB, Brimacombe M, et al. Offspring's leukocyte telomere length, paternal age, and telomere elongation in sperm. *PLoS Genet*. févr 2008;4(2):e37.

63. Levy D, Neuhausen SL, Hunt SC, Kimura M, Hwang S-J, Chen W, et al. Genome-wide association identifies OBFC1 as a locus involved in human leukocyte telomere biology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18 mai 2010;107(20):9293-8.

64. Mangino M, Christiansen L, Stone R, Hunt SC, Horvath K, Eisenberg DTA, et al. DCAF4, a novel gene associated with leucocyte telomere length. *J Med Genet*. mars 2015;52(3):157-62.

65. Mangino M, Hwang S-J, Spector TD, Hunt SC, Kimura M, Fitzpatrick AL, et al. Genome-wide meta-analysis points to CTC1 and ZNF676 as genes regulating telomere homeostasis in humans. *Hum Mol Genet*. 15 déc 2012;21(24):5385-94.

66. Arias-Sosa LA. Understanding the Role of Telomere Dynamics in Normal and Dysfunctional Human Reproduction. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif*. 2019;26(1):6-17.

67. Samassekou O, Gadjji M, Drouin R, Yan J. Sizing the ends: normal length of human telomeres. *Ann Anat Anat Anz Off Organ Anat Ges*. 20 sept 2010;192(5):284-91.

68. Huffman KE, Levene SD, Tesmer VM, Shay JW, Wright WE. Telomere shortening is proportional to the size of the G-rich telomeric 3'-overhang. *J Biol Chem*. 30 juin 2000;275(26):19719-22.

69. Turner S, Wong HP, Rai J, Hartshorne GM. Telomere lengths in human oocytes,

cleavage stage embryos and blastocysts. *Mol Hum Reprod.* sept 2010;16(9):685-94.

70. Cheng G, Kong F, Luan Y, Sun C, Wang J, Zhang L, et al. Differential shortening rate of telomere length in the development of human fetus. *Biochem Biophys Res Commun.* 6 déc 2013;442(1-2):112-5.

71. Youngren K, Jeanclos E, Aviv H, Kimura M, Stock J, Hanna M, et al. Synchrony in telomere length of the human fetus. *Hum Genet.* juin 1998;102(6):640-3.

72. Daniali L, Benetos A, Susser E, Kark JD, Labat C, Kimura M, et al. Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. *Nat Commun.* 2013;4:1597.

73. Freck RW, Blackburn EH, Shannon KM. The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12 mai 1998;95(10):5607-10.

74. Chahine MN, Toupance S, El-Hakim S, Labat C, Gautier S, Moussallem T, et al. Telomere length and age-dependent telomere attrition: the blood-and-muscle model 1. *Can J Physiol Pharmacol.* avr 2019;97(4):328-34.

75. Torra-Massana M, Barragán M, Bellu E, Oliva R, Rodríguez A, Vassena R. Sperm telomere length in donor samples is not related to ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet.* avr 2018;35(4):649-57.

76. Achi MV, Ravindranath N, Dym M. Telomere length in male germ cells is inversely correlated with telomerase activity. *Biol Reprod.* août 2000;63(2):591-8.

77. Baird DM, Britt-Compton B, Rowson J, Amso NN, Gregory L, Kipling D. Telomere instability in the male germline. *Hum Mol Genet.* 1 janv 2006;15(1):45-51.

78. Jørgensen PB, Fedder J, Koelvraa S, Graakjaer J. Age-dependence of relative telomere length profiles during spermatogenesis in man. *Maturitas.* août 2013;75(4):380-5.

79. Rocca MS, Foresta C, Ferlin A. Telomere length: lights and shadows on their role in human reproduction. *Biol Reprod.* 1 févr 2019;100(2):305-17.

80. Turner S, Hartshorne GM. Telomere lengths in human pronuclei, oocytes and spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* août 2013;19(8):510-8.

81. Reig-Viader R, Brieño-Enríquez MA, Khoriauli L, Toran N, Cabero L, Giulotto E, et al. Telomeric repeat-containing RNA and telomerase in human fetal oocytes. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2013;28(2):414-22.

82. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet.* 1996;18(2):173-9.

83. Wright DL, Jones EL, Mayer JF, Oehninger S, Gibbons WE, Lanzendorf SE. Characterization of telomerase activity in the human oocyte and preimplantation embryo. *Mol Hum Reprod.* oct 2001;7(10):947-55.

84. Kalmbach KH, Antunes DMF, Kohlrausch F, Keefe DL. Telomeres and Female Reproductive Aging. *Semin Reprod Med.* nov 2015;33(6):389-95.

85. Edwards RG. Are oocytes formed and used sequentially in the mammalian ovary? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 6 août 1970;259(828):103-5.

86. Polani PE, Crolla JA. A test of the production line hypothesis of mammalian oogenesis. *Hum Genet.* 1 nov 1991;88(1):64-70.

87. Sasaki H, Hamatani T, Kamijo S, Iwai M, Kobanawa M, Ogawa S, et al. Impact of Oxidative Stress on Age-Associated Decline in Oocyte Developmental Competence. *Front Endocrinol [Internet].* 22 nov 2019 [cité 27 mai 2020];10. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6882737/>

88. Wright DL, Jones EL, Mayer JF, Oehninger S, Gibbons WE, Lanzendorf SE. Characterization of telomerase activity in the human oocyte and preimplantation embryo. *Mol Hum Reprod.* oct 2001;7(10):947-55.
89. Barnes RP, Fouquerel E, Opresko PL. The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis. *Mech Ageing Dev.* janv 2019;177:37-45.
90. Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *J Biol Chem.* 5 janv 1992;267(1):166-72.
91. Paul L. Diet, nutrition and telomere length. *J Nutr Biochem.* oct 2011;22(10):895-901.
92. Gielen M, Hageman GJ, Antoniou EE, Nordfjall K, Mangino M, Balasubramanyam M, et al. Body mass index is negatively associated with telomere length: a collaborative cross-sectional meta-analysis of 87 observational studies. *Am J Clin Nutr.* sept 2018;108(3):453-75.
93. Astuti Y, Wardhana A, Watkins J, Wulaningsih W. Cigarette smoking and telomere length: A systematic review of 84 studies and meta-analysis. *Environ Res.* oct 2017;158:480-9.
94. Senthilkumar PK, Klingelhutz AJ, Jacobus JA, Lehmler H, Robertson LW, Ludewig G. Airborne polychlorinated biphenyls (PCBs) reduce telomerase activity and shorten telomere length in immortal human skin keratinocytes (HaCat). *Toxicol Lett.* 4 juill 2011;204(1):64-70.
95. Shay JW. Telomeres and aging. *Curr Opin Cell Biol.* 2018;52:1-7.
96. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet Lond Engl.* 1 févr 2003;361(9355):393-5.
97. Mangaonkar AA, Patnaik MM. Short Telomere Syndromes in Clinical Practice: Bridging Bench and Bedside. *Mayo Clin Proc.* 1 juill 2018;93(7):904-16.
98. D'Mello MJJ, Ross SA, Briel M, Anand SS, Gerstein H, Paré G. Association between shortened leukocyte telomere length and cardiometabolic outcomes: systematic review and meta-analysis. *Circ Cardiovasc Genet.* févr 2015;8(1):82-90.
99. Haycock PC, Heydon EE, Kaptoge S, Butterworth AS, Thompson A, Willeit P. Leucocyte telomere length and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 8 juill 2014;349:g4227.
100. Verhulst S, Dalgård C, Labat C, Kark JD, Kimura M, Christensen K, et al. A short leucocyte telomere length is associated with development of insulin resistance. *Diabetologia.* 2016;59(6):1258-65.
101. Jeanclos E, Krolewski A, Skurnick J, Kimura M, Aviv H, Warram JH, et al. Shortened telomere length in white blood cells of patients with IDDM. *Diabetes.* mars 1998;47(3):482-6.
102. Wang J, Dong X, Cao L, Sun Y, Qiu Y, Zhang Y, et al. Association between telomere length and diabetes mellitus: A meta-analysis. *J Int Med Res.* déc 2016;44(6):1156-73.
103. Albizua I, Rambo-Martin BL, Allen EG, He W, Amin AS, Sherman SL. Association between telomere length and chromosome 21 nondisjunction in the oocyte. *Hum Genet.* nov 2015;134(11-12):1263-70.

104. Liu M, Huo YR, Wang J, Wang C, Liu S, Liu S, et al. Telomere Shortening in Alzheimer's Disease Patients. *Ann Clin Lab Sci.* mai 2016;46(3):260-5.
105. Forero DA, González-Giraldo Y, López-Quintero C, Castro-Vega LJ, Barreto GE, Perry G. Telomere length in Parkinson's disease: A meta-analysis. *Exp Gerontol.* mars 2016;75:53-5.
106. Zhang X, Zhao Q, Zhu W, Liu T, Xie S-H, Zhong L-X, et al. The Association of Telomere Length in Peripheral Blood Cells with Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis of Prospective Studies. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* 2017;26(9):1381-90.
107. Zhu X, Han W, Xue W, Zou Y, Xie C, Du J, et al. The association between telomere length and cancer risk in population studies. *Sci Rep.* 26 févr 2016;6:22243.
108. Rode L, Nordestgaard BG, Bojesen SE. Peripheral blood leukocyte telomere length and mortality among 64,637 individuals from the general population. *J Natl Cancer Inst.* juin 2015;107(6):djv074.
109. Rodríguez S, Goyanes V, Segrelles E, Blasco M, Gosálvez J, Fernández JL. Critically short telomeres are associated with sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril.* oct 2005;84(4):843-5.
110. Fernández-Gonzalez R, Moreira PN, Pérez-Crespo M, Sánchez-Martín M, Ramirez MA, Pericuesta E, et al. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol Reprod.* avr 2008;78(4):761-72.
111. Liu L, Blasco M, Trimarchi J, Keefe D. An essential role for functional telomeres in mouse germ cells during fertilization and early development. *Dev Biol.* 1 sept 2002;249(1):74-84.
112. Turner S, Hartshorne GM. Telomere lengths in human pronuclei, oocytes and spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* août 2013;19(8):510-8.
113. Vasilopoulos E, Fragkiadaki P, Kalliora C, Fragou D, Docea AO, Vakonaki E, et al. The association of female and male infertility with telomere length (Review). *Int J Mol Med.* 1 août 2019;44(2):375-89.
114. Darmishonnejad Z, Zarei-Kheirabadi F, Tavalae M, Zarei-Kheirabadi M, Zohrabi D, Nasr-Esfahani MH. Relationship between sperm telomere length and sperm quality in infertile men. *Andrologia.* 19 mars 2020;e13546.
115. Thilagavathi J, Kumar M, Mishra SS, Venkatesh S, Kumar R, Dada R. Analysis of sperm telomere length in men with idiopathic infertility. *Arch Gynecol Obstet.* avr 2013;287(4):803-7.
116. Schrader M, Müller M, Schulze W, Heicappell R, Krause H, Straub B, et al. Quantification of the expression level of the gene encoding the catalytic subunit of telomerase in testicular tissue specimens predicts successful sperm recovery. *Hum Reprod Oxf Engl.* janv 2002;17(1):150-6.
117. Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JBM. Disruption of Telomere–Telomere Interactions Associated with DNA Damage in Human Spermatozoa. *Syst Biol Reprod Med.* 1 déc 2010;56(6):407-12.
118. Cariati F, Jaroudi S, Alfarawati S, Raberi A, Alviggi C, Pivonello R, et al. Investigation of sperm telomere length as a potential marker of paternal genome integrity and

semen quality. *Reprod Biomed Online*. sept 2016;33(3):404-11.

119. Santiso R, Tamayo M, Gosálvez J, Meseguer M, Garrido N, Fernández JL. Swim-up procedure selects spermatozoa with longer telomere length. *Mutat Res*. 1 juin 2010;688(1-2):88-90.

120. Lafuente R, Bosch-Rue E, Ribas-Maynou J, Alvarez J, Brassesco C, Amengual MJ, et al. Sperm telomere length in motile sperm selection techniques: A qFISH approach. *Andrologia*. mars 2018;50(2).

121. Yang Q, Zhang N, Zhao F, Zhao W, Dai S, Liu J, et al. Processing of semen by density gradient centrifugation selects spermatozoa with longer telomeres for assisted reproduction techniques. *Reprod Biomed Online*. juill 2015;31(1):44-50.

122. Müller H-G, Chiou J-M, Carey JR, Wang J-L. Fertility and life span: late children enhance female longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. mai 2002;57(5):B202-206.

123. Gagnon A. Natural fertility and longevity. *Fertil Steril*. mai 2015;103(5):1109-16.

124. Jacobsen BK, Knutsen SF, Fraser GE. Age at natural menopause and total mortality and mortality from ischemic heart disease: the Adventist Health Study. *J Clin Epidemiol*. avr 1999;52(4):303-7.

125. Aydos SE, Elhan AH, Tükün A. Is telomere length one of the determinants of reproductive life span? *Arch Gynecol Obstet*. juill 2005;272(2):113-6.

126. Gray KE, Schiff MA, Fitzpatrick AL, Kimura M, Aviv A, Starr JR. Leukocyte telomere length and age at menopause. *Epidemiol Camb Mass*. janv 2014;25(1):139-46.

127. Li Q, Du J, Feng R, Xu Y, Wang H, Sang Q, et al. A possible new mechanism in the pathophysiology of polycystic ovary syndrome (PCOS): the discovery that leukocyte telomere length is strongly associated with PCOS. *J Clin Endocrinol Metab*. févr 2014;99(2):E234-240.

128. Kalyan S, Patel MS, Kingwell E, Côté HCF, Liu D, Prior JC. Competing Factors Link to Bone Health in Polycystic Ovary Syndrome: Chronic Low-Grade Inflammation Takes a Toll. *Sci Rep*. 13 2017;7(1):3432.

129. Miranda-Furtado CL, Ramos FKP, Kogure GS, Santana-Lemos BA, Ferriani RA, Calado RT, et al. A Nonrandomized Trial of Progressive Resistance Training Intervention in Women With Polycystic Ovary Syndrome and Its Implications in Telomere Content. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif*. mai 2016;23(5):644-54.

130. Pedroso DCC, Miranda-Furtado CL, Kogure GS, Meola J, Okuka M, Silva C, et al. Inflammatory biomarkers and telomere length in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. févr 2015;103(2):542-547.e2.

131. Wang C, Shen F, Zhu Y, Fang Y, Lu S. Telomeric repeat-containing RNA (TERRA) related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Clin Endocrinol (Oxf)*. avr 2017;86(4):552-9.

132. Wei D, Xie J, Yin B, Hao H, Song X, Liu Q, et al. Significantly lengthened telomere in granulosa cells from women with polycystic ovarian syndrome (PCOS). *J Assist Reprod Genet*. juill 2017;34(7):861-6.

133. Wei D, Xie J, Yin B, Hao H, Song X, Liu Q, et al. Significantly lengthened telomere in granulosa cells from women with polycystic ovarian syndrome (PCOS). *J Assist Reprod Genet*. juill 2017;34(7):861-6.

134. Li Y, Deng B, Ouyang N, Yuan P, Zheng L, Wang W. Telomere length is short in PCOS and oral contraceptive does not affect the telomerase activity in granulosa cells of patients with PCOS. *J Assist Reprod Genet.* juill 2017;34(7):849-59.
135. Valentijn AJ, Saretzki G, Tempest N, Critchley HOD, Hapangama DK. Human endometrial epithelial telomerase is important for epithelial proliferation and glandular formation with potential implications in endometriosis. *Hum Reprod Oxf Engl.* déc 2015;30(12):2816-28.
136. Hapangama DK, Turner MA, Drury JA, Quenby S, Saretzki G, Martin-Ruiz C, et al. Endometriosis is associated with aberrant endometrial expression of telomerase and increased telomere length. *Hum Reprod Oxf Engl.* juill 2008;23(7):1511-9.
137. Kim CM, Oh YJ, Cho SH, Chung DJ, Hwang JY, Park KH, et al. Increased telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase mRNA expression in the endometrium of patients with endometriosis. *Hum Reprod Oxf Engl.* mars 2007;22(3):843-9.
138. Mafra FA, Christofolini DM, Cavalcanti V, Vilarino FL, André GM, Kato P, et al. Aberrant telomerase expression in the endometrium of infertile women with deep endometriosis. *Arch Med Res.* janv 2014;45(1):31-5.
139. Hapangama DK, Turner MA, Drury J, Heathcote L, Afshar Y, Mavrogianis PA, et al. Aberrant expression of regulators of cell-fate found in eutopic endometrium is found in matched ectopic endometrium among women and in a baboon model of endometriosis. *Hum Reprod Oxf Engl.* nov 2010;25(11):2840-50.
140. Hapangama DK, Turner MA, Drury JA, Martin-Ruiz C, Von Zglinicki T, Farquharson RG, et al. Endometrial telomerase shows specific expression patterns in different types of reproductive failure. *Reprod Biomed Online.* sept 2008;17(3):416-24.
141. Treff NR, Su J, Taylor D, Scott RT. Telomere DNA deficiency is associated with development of human embryonic aneuploidy. *PLoS Genet.* juin 2011;7(6):e1002161.
142. Bhaumik P, Bhattacharya M, Ghosh P, Ghosh S, Kumar Dey S. Telomere length analysis in Down syndrome birth. *Mech Ageing Dev.* juin 2017;164:20-6.
143. Ghosh S, Feingold E, Chakraborty S, Dey SK. Telomere length is associated with types of chromosome 21 nondisjunction: a new insight into the maternal age effect on Down syndrome birth. *Hum Genet.* avr 2010;127(4):403-9.
144. Thilagavathi J, Mishra SS, Kumar M, Vemprala K, Deka D, Dhadwal V, et al. Analysis of telomere length in couples experiencing idiopathic recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet.* juin 2013;30(6):793-8.
145. Hanna CW, Bretherick KL, Gair JL, Fluker MR, Stephenson MD, Robinson WP. Telomere length and reproductive aging. *Hum Reprod Oxf Engl.* mai 2009;24(5):1206-11.
146. Menon R, Yu J, Basanta-Henry P, Brou L, Berga SL, Fortunato SJ, et al. Short fetal leukocyte telomere length and preterm prelabor rupture of the membranes. *PloS One.* 2012;7(2):e31136.
147. Ferrari F, Facchinetti F, Saade G, Menon R. Placental telomere shortening in stillbirth: a sign of premature senescence? *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet.* 2016;29(8):1283-8.
148. Toutain J, Prochazkova-Carlotti M, Cappellen D, Jarne A, Chevret E, Ferrer J, et al. Reduced placental telomere length during pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. *PloS One.* 2013;8(1):e54013.

149. Biron-Shental T, Sukenik-Halevy R, Sharon Y, Laish I, Fejgin MD, Amiel A. Telomere shortening in intra uterine growth restriction placentas. *Early Hum Dev.* sept 2014;90(9):465-9.
150. Sukenik-Halevy R, Amiel A, Kidron D, Liberman M, Ganor-Paz Y, Biron-Shental T. Telomere homeostasis in trophoblasts and in cord blood cells from pregnancies complicated with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* févr 2016;214(2):283.e1-283.e7.
151. Biron-Shental T, Sukenik-Halevy R, Sharon Y, Goldberg-Bittman L, Kidron D, Fejgin MD, et al. Short telomeres may play a role in placental dysfunction in preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* avr 2010;202(4):381.e1-7.
152. Biron-Shental T, Sukenik-Halevy R, Naboani H, Liberman M, Kats R, Amiel A. Telomeres are shorter in placentas from pregnancies with uncontrolled diabetes. *Placenta.* févr 2015;36(2):199-203.
153. Biron-Shental T, Liberman M, Elbaz M, Laish I, Sharony R, Amiel A. Telomere homeostasis in placentas from pregnancies with uncontrolled diabetes. *Placenta.* 2016;44:13-8.
154. Entringer S, de Punder K, Buss C, Wadhwa PD. The fetal programming of telomere biology hypothesis: an update. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 5 mars 2018;373(1741):20170151.
155. Entringer S, Epel ES, Kumsta R, Lin J, Hellhammer DH, Blackburn EH, et al. Stress exposure in intrauterine life is associated with shorter telomere length in young adulthood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16 août 2011;108(33):E513-518.
156. Salihu HM, King LM, Nwoga C, Paothong A, Pradhan A, Marty PJ, et al. Association Between Maternal-Perceived Psychological Stress and Fetal Telomere Length. *South Med J.* déc 2016;109(12):767-72.
157. Marchetto NM, Glynn RA, Ferry ML, Ostojic M, Wolff SM, Yao R, et al. Prenatal stress and newborn telomere length. *Am J Obstet Gynecol.* juill 2016;215(1):94.e1-8.
158. Salihu HM, Pradhan A, King L, Paothong A, Nwoga C, Marty PJ, et al. Impact of intrauterine tobacco exposure on fetal telomere length. *Am J Obstet Gynecol.* févr 2015;212(2):205.e1-8.
159. Theall KP, McKasson S, Mabile E, Dunaway LF, Drury SS. Early hits and long-term consequences: tracking the lasting impact of prenatal smoke exposure on telomere length in children. *Am J Public Health.* oct 2013;103 Suppl 1:S133-135.
160. Mirzakhani H, De Vivo I, Leeder JS, Gaedigk R, Vyhldal CA, Weiss ST, et al. Early pregnancy intrauterine fetal exposure to maternal smoking and impact on fetal telomere length. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* nov 2017;218:27-32.
161. Martens DS, Plusquin M, Gyselaers W, De Vivo I, Nawrot TS. Maternal pre-pregnancy body mass index and newborn telomere length. *BMC Med.* 18 oct 2016;14(1):148.
162. Entringer S, Epel ES, Lin J, Blackburn EH, Buss C, Shahbaba B, et al. Maternal Folate Concentration in Early Pregnancy and Newborn Telomere Length. *Ann Nutr Metab.* 2015;66(4):202-8.
163. Bijmens E, Zeegers MP, Gielen M, Kicinski M, Hageman GJ, Pachen D, et al. Lower placental telomere length may be attributed to maternal residential traffic exposure; a twin study. *Environ Int.* juin 2015;79:1-7.
164. Martens DS, Cox B, Janssen BG, Clemente DBP, Gasparrini A, Vanpoucke C, et al. Prenatal Air Pollution and Newborns' Predisposition to Accelerated Biological Aging.

JAMA Pediatr. 1 déc 2017;171(12):1160-7.

165. Lin S, Huo X, Zhang Q, Fan X, Du L, Xu X, et al. Short placental telomere was associated with cadmium pollution in an electronic waste recycling town in China. *PloS One*. 2013;8(4):e60815.

166. Cheng E-H, Chen S-U, Lee T-H, Pai Y-P, Huang L-S, Huang C-C, et al. Evaluation of telomere length in cumulus cells as a potential biomarker of oocyte and embryo quality. *Hum Reprod Oxf Engl*. avr 2013;28(4):929-36.

167. Keefe DL, Liu L. Telomeres and reproductive aging. *Reprod Fertil Dev*. 2009;21(1):10-4.

168. Wang W, Chen H, Li R, Ouyang N, Chen J, Huang L, et al. Telomerase activity is more significant for predicting the outcome of IVF treatment than telomere length in granulosa cells. *Reprod Camb Engl*. mai 2014;147(5):649-57.

169. Zhang X, Jafari N, Barnes RB, Confino E, Milad M, Kazer RR. Studies of gene expression in human cumulus cells indicate pentraxin 3 as a possible marker for oocyte quality. *Fertil Steril*. avr 2005;83 Suppl 1:1169-79.

170. Hamel M, Dufort I, Robert C, Gravel C, Leveille M-C, Leader A, et al. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Hum Reprod Oxf Engl*. mai 2008;23(5):1118-27.

171. McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, Kovanci E, Cisneros P, Buster JE, et al. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod Oxf Engl*. déc 2004;19(12):2869-74.

172. van Montfoort APA, Geraedts JPM, Dumoulin JCM, Stassen APM, Evers JLH, Ayoubi TAY. Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis. *Mol Hum Reprod*. mars 2008;14(3):157-68.

173. Bassil S, Wyns C, Toussaint-Demyelle D, Abdelnour W, Donnez J. Predictive factors for multiple pregnancy in in vitro fertilization. *J Reprod Med*. déc 1997;42(12):761-6.

174. Assou S, Haouzi D, Mahmoud K, Aouacheria A, Guillemin Y, Pantesco V, et al. A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study. *Mol Hum Reprod*. déc 2008;14(12):711-9.

175. Chen H, Wang W, Mo Y, Ma Y, Ouyang N, Li R, et al. Women with high telomerase activity in luteinised granulosa cells have a higher pregnancy rate during in vitro fertilisation treatment. *J Assist Reprod Genet*. sept 2011;28(9):797-807.

176. Ozturk S, Sozen B, Demir N. Telomere length and telomerase activity during oocyte maturation and early embryo development in mammalian species. *Mol Hum Reprod*. janv 2014;20(1):15-30.

177. Toupance S, Fattet A-J, Thornton SN, Benetos A, Guéant J-L, Koscinski I. Ovarian Telomerase and Female Fertility. *Biomedicines*. 20 juill 2021;9(7):842.

178. Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod*. oct 1990;43(4):543-7.

179. Collado-Fernandez E, Picton HM, Dumollard R. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. *Int J Dev Biol*. 6 févr 2013;56(10-11-12):799-808.

180. Coticchio G, Dal Canto M, Mignini Renzini M, Guglielmo MC, Brambillasca F, Turchi D, et al. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Hum Reprod Update*. août

2015;21(4):427-54.

181. Li R, Albertini DF. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mars 2013;14(3):141-52.

182. Morin SJ, Tao X, Marin D, Zhan Y, Landis J, Bedard J, et al. DNA methylation-based age prediction and telomere length in white blood cells and cumulus cells of infertile women with normal or poor response to ovarian stimulation. *Aging.* 08 2018;10(12):3761-73.

183. Fattet A-J, Toupance S, Thornton SN, Monnin N, Guéant J-L, Benetos A, et al. Telomere length in granulosa cells and leukocytes: a potential marker of female fertility? A systematic review of the literature. *J Ovarian Res.* 21 août 2020;13(1):96.

184. Sayban S, Mirfakhraie R, Omrani MD, Ghaedi H, Heidary H, Yaghoobi H, et al. Idiopathic Premature Ovarian Failure and its association to the abnormal longitudinal changes of telomere length in a population of Iranian Infertile Women: A pilot study. *Meta Gene.* 1 déc 2018;18:58-61.

185. Butts S, Riethman H, Ratcliffe S, Shaunik A, Coutifaris C, Barnhart K. Correlation of telomere length and telomerase activity with occult ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* déc 2009;94(12):4835-43.

186. Miranda-Furtado CL, Luchiaro HR, Chielli Pedrosa DC, Kogure GS, Caetano LC, Santana BA, et al. Skewed X-chromosome inactivation and shorter telomeres associate with idiopathic premature ovarian insufficiency. *Fertil Steril.* 2018;110(3):476-485.e1.

187. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 15 mai 2002;30(10):e47.

188. Liu CC, Ma DL, Yan T-D, Fan X, Poon Z, Poon L-F, et al. Distinct Responses of Stem Cells to Telomere Uncapping-A Potential Strategy to Improve the Safety of Cell Therapy. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2016;34(10):2471-84.

189. Kosebent EG, Uysal F, Ozturk S. Telomere length and telomerase activity during folliculogenesis in mammals. *J Reprod Dev.* 14 déc 2018;64(6):477-84.

190. Kinugawa C, Murakami T, Okamura K, Yajima A. Telomerase activity in normal ovaries and premature ovarian failure. *Tohoku J Exp Med.* mars 2000;190(3):231-8.

191. Kossowska-Tomaszczuk K, De Geyter C. Cells with Stem Cell Characteristics in Somatic Compartments of the Ovary. *BioMed Res Int.* 2013;2013:1-8.

192. Lavranos TC. Anchorage-Independent Culture of Bovine Granulosa Cells: The Effects of Basic Fibroblast Growth Factor and Dibutyryl cAMP on Cell Division and Differentiation. *Exp Cell Res.* 1 avr 1994;211(2):245-51.

193. Kossowska-Tomaszczuk K, Geyter CD, Geyter MD, Martin I, Holzgreve W, Scherberich A, et al. The Multipotency of Luteinizing Granulosa Cells Collected from Mature Ovarian Follicles. *STEM CELLS.* 2009;27(1):210-9.

194. Roake CM, Artandi SE. Regulation of human telomerase in homeostasis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2 avr 2020 [cité 8 avr 2020]; Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41580-020-0234-z>

195. Slack JMW. What is a stem cell? *WIREs Dev Biol.* 2018;7(5):e323.

196. Goto H, Iwata H, Takeo S, Nisinonso K, Murakami S, Monji Y, et al. Effect of bovine age on the proliferative activity, global DNA methylation, relative telomere length and telomerase activity of granulosa cells. *Zygote Camb Engl.* août 2013;21(3):256-64.

197. Lavranos TC, Mathis JM, Latham SE, Kalionis B, Shay JW, Rodgers RJ.

Evidence for ovarian granulosa stem cells: telomerase activity and localization of the telomerase ribonucleic acid component in bovine ovarian follicles. *Biol Reprod.* août 1999;61(2):358-66.

198. Liu J-P, Li H. Telomerase in the ovary. *Reprod Camb Engl.* août 2010;140(2):215-22.

199. Lara-Molina EE, Franasiak JM, Marin D, Tao X, Díaz-Gimeno P, Florensa M, et al. Cumulus cells have longer telomeres than leukocytes in reproductive-age women. *Fertil Steril.* 1 janv 2020;113(1):217-23.

200. Aviv A, Hunt SC, Lin J, Cao X, Kimura M, Blackburn E. Impartial comparative analysis of measurement of leukocyte telomere length/DNA content by Southern blots and qPCR. *Nucleic Acids Res.* 1 nov 2011;39(20):e134.

201. Nettle D, Seeker L, Nussey D, Froy H, Bateson M. Consequences of measurement error in qPCR telomere data: A simulation study. *PLoS ONE* [Internet]. 1 mai 2019 [cité 29 juill 2020];14(5). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6493763/>

202. Grasselli A, Nanni S, Colussi C, Aiello A, Benvenuti V, Ragone G, et al. Estrogen Receptor- α and Endothelial Nitric Oxide Synthase Nuclear Complex Regulates Transcription of Human Telomerase. *Circ Res.* 3 juill 2008;103(1):34-42.

203. Portillo AM, Varela E, García-Velasco JA. Mathematical model to study the aging of the human follicle according to the telomerase activity. *J Theor Biol.* 7 févr 2019;462:446-54.

204. Portillo AM, Peláez C. Mathematical modelling of ageing acceleration of the human follicle due to oxidative stress and other factors. *Math Med Biol J IMA.* 29 mars 2021;

205. Sklavos MM, Stratton P, Giri N, Alter BP, Savage SA, Pinto LA. Reduced serum levels of anti-Müllerian hormone in females with inherited bone marrow failure syndromes. *J Clin Endocrinol Metab.* févr 2015;100(2):E197-203.

206. Robinson LG, Pimentel R, Wang F, Kramer YG, Gonullu DC, Agarwal S, et al. Impaired reproductive function and fertility preservation in a woman with a dyskeratosis congenita. *J Assist Reprod Genet.* mai 2020;37(5):1221-5.

207. Polonio AM, Chico-Sordo L, Córdova-Oriz I, Medrano M, García-Velasco JA, Varela E. Impact of Ovarian Aging in Reproduction: From Telomeres and Mice Models to Ovarian Rejuvenation. *Yale J Biol Med.* 30 sept 2020;93(4):561-9.

208. Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D, Hannon GJ. Myc activates telomerase. *Genes Dev.* 15 juin 1998;12(12):1769-74.

209. Wong C-W, Hou P-S, Tseng S-F, Chien C-L, Wu K-J, Chen H-F, et al. Krüppel-like transcription factor 4 contributes to maintenance of telomerase activity in stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio.* sept 2010;28(9):1510-7.

210. Bernardes de Jesus B, Vera E, Schneeberger K, Tejera AM, Ayuso E, Bosch F, et al. Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Mol Med.* août 2012;4(8):691-704.

211. Jaskelioff M, Muller FL, Paik J-H, Thomas E, Jiang S, Adams AC, et al. Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature.* 6 janv 2011;469(7328):102-6.

212. Bretschneider H, Quade M, Lode A, Gelinsky M, Rammelt S, Zwingenberger S,

et al. Characterization of Naturally Occurring Bioactive Factor Mixtures for Bone Regeneration. *Int J Mol Sci.* janv 2020;21(4):1412.

213. Sills ES, Wood SH. Autologous activated platelet-rich plasma injection into adult human ovary tissue: molecular mechanism, analysis, and discussion of reproductive response. *Biosci Rep.* 28 juin 2019;39(6).

214. Shingu T, Jaskelioff M, Yuan L, Ding Z, Protopopov A, Kost-Alimova M, et al. Utilizing murine inducible telomerase alleles in the studies of tissue degeneration/regeneration and cancer. *J Vis Exp JoVE.* 13 avr 2015;(98).

215. Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, Harley CB. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12 avr 1994;91(8):2900-4.

216. Baykal A, Thompson JA, Xu X-C, Hahn WC, Deavers MT, Malpica A, et al. In situ human telomerase reverse transcriptase expression pattern in normal and neoplastic ovarian tissues. *Oncol Rep.* févr 2004;11(2):297-302.

ANNEXES

Annexe 1 : Telomere length in granulosa cells and leukocytes: a potential marker of female fertility? A systematic review of the literature. Fattet, AJ *et al.*

Fattet *et al. Journal of Ovarian Research* (2020) 13:96
<https://doi.org/10.1186/s13048-020-00702-y>

Journal of Ovarian Research

REVIEW

Open Access

Telomere length in granulosa cells and leukocytes: a potential marker of female fertility? A systematic review of the literature



Anne-Julie Fattet^{1†}, Simon Toupan^{2†}, Simon N. Thornton², Nicolas Monnin³, Jean-Louis Guéant⁴, Athanase Benetos² and Isabelle Kosciński^{1,4*} 

Abstract

In the context of a continuously increased delay of motherhood and of an increase of the incidence of premature ovarian failure, it is of the greatest interest to dispose of a predictive marker of the duration of the fertility window. Unfortunately, current available markers of women's fertility (hormonal rates or echography count of small follicles) have a poor predictive value of premature ovarian failure. In the last ten years, some studies have suggested that telomere length may be correlated with premature ovarian failure, but the results of these studies are contradictory. In accordance with guidelines from Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA), this systematic review of the literature selected studies evaluating telomere length or telomerase activity in granulosa cells and/or in leukocytes as a premature ovarian failure marker.

Five publications (252 premature ovarian failure patients) were included in this review of experimental evidence. Two of them studied telomere length and/or telomerase activity in granulosa cells and 4 in leukocytes in women with premature ovarian failure. For each study, authors determined if there was a positive or a negative correlation between telomeric parameters and premature ovarian failure.

3 studies (178 premature ovarian failure patients) found shorter telomere length in granulosa cells and/or leukocytes and/or lower telomerase activity in premature ovarian failure patients. 2 studies (74 premature ovarian failure patients) presented contradictory results about the correlation of leucocyte telomere length with premature ovarian failure.

Shorter telomeres and diminished telomerase activity in granulosa cells appear to be associated with ovarian insufficiency. However, the number of studies and of subjects within are low and the methodology questionable. The confirmation of these results is essential with more subjects, better defined populations and more adapted methodology, in order to consider telomere length in granulosa cells and/or in leukocytes as an early and reliable marker for the decline of ovarian function.

(Continued on next page)

* Correspondence: kosciński.isa@gmail.com

[†]Anne-Julie Fattet and Simon Toupan contributed equally to this work.
¹Laboratory of Biology of Reproduction-CECOS Lorraine, University Hospital of Nancy, 10 rue du Dr Heydenreich, 54000 Nancy, France
⁴Université de Lorraine, Inserm, NGERE, F-54000 Nancy, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

(Continued from previous page)

Keywords: Telomere length, Telomerase, Premature ovarian failure, Primary ovarian insufficiency, Premature ovarian insufficiency

Background

Over the past thirty years, in most developed countries, women are having children later and later. But, at the same time, they are also becoming more aware that their fertility declines with age. This could be the reason why many of them would be in favour of fertility preservation to ensure that they will be able, one day, to become mothers [1].

Premature Ovarian Failure (POF), first described in the 1930s, is a clinical syndrome characterized by a loss of ovarian function before the age of 40 [2] with three sequential stages called occult, biochemical and clinical [3]; corresponding to fertility decline, then an increase in Follicle Stimulating Hormone (FSH) release rate (twice), and finally oligo or amenorrhea [4] respectively. The prevalence of POF among women under 40 years of age is about 1%. Furthermore, it is estimated at 1/1000 for those under 30 years and 1/10,000 for those under 20 [5, 6]. About 10 to 28% of women with primary amenorrhea

have POF; and in women with secondary amenorrhea, the frequency is between 4 and 18%. However, prevalence varies depending on population characteristics with such factors as ethnicity. Indeed, the frequency is higher among Caucasian and African than Asian women [6]. Although the definition of POF is incomplete, the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) working group recommends as diagnostic criteria [4]: Oligo/amenorrhea for at least 4 months and FSH > 25 IU/L at twice 4 months apart.

Climacteric symptoms are less common in patients with primary amenorrhea, suggesting that they are mainly due to a cessation of estrogen excretion rather than estrogen deficiency [6].

Long-term consequences of POF are summarized in Table 1 [7]: Estrogen deficiency leads to a reduction in bone mineral density and therefore to an increased risk of osteopenia, osteoporosis and fracture with age. These patients have also an increased risk of developing

Table 1 Summary of long-term consequences of premature ovarian failure, according to [7]

Cognitive dysfunction	• Memory and concentration problems, increased risk of dementia
Auto-immunity	• Increased risk of autoimmune disease, especially thyroid disease
Cardiovascular system	• Impaired endothelial function, increased triglycerides, cholesterol, and LDL
Bones	• Osteopenia, osteoporosis, increased risk of fracture
Hormones	• Hypoestrogenism, infertility
Urogenital symptoms	• Vaginal dryness, vaginal irritation and itching, sexual disorders
Mortality: increased risk of premature death	

cardiovascular diseases [8] and an increased risk of all-cause mortality. This pathology has also an undeniable negative impact on the psychological well-being of patients [6, 9]. In a large majority of cases the aetiology of this pathology remains unexplained [10]. Nevertheless, in some patients with POF, genetic abnormalities [7, 11–13], metabolic disorders, autoimmunity, iatrogenic, infections or environmental factors have been defined as underlying causes of this syndrome [6].

According to different authors, the discriminative value for blood FSH varies from 25 to 40 IU/L.

After the diagnosis the following dosages are typically performed [14]: Anti-müllerian hormone (AMH): low; Luteinizing Hormone (LH): increased and estradiol: low, especially with a view to a treatment [15].

Currently, there is no treatment to improve ovarian function or spontaneous pregnancy rates in women with POF (between 5 and 10% in idiopathic POF) [15] and no test or marker that predicts the risk of developing POF [4], except for the search for a few mutations known to cause this disease. As POF markers, AMH levels and antral follicle count (AFC) are partially predictive of the outcome of Assisted Reproductive Technology (ART) in patients consulting for infertility, but no predictive markers of the risk of developing a POF several years later. The only preventive measure that can be proposed to future POF patients is female fertility preservation [4] either with ovarian cortex or with oocytes and embryo cryopreservation. In addition to the cost, these different techniques of fertility preservation are not without risks to health. Therefore, it would be particularly interesting to find a predictive marker for the development of POF.

The term “telomere” derives from the Greek words “telos” which means “end”, and “meros” which means “segment”. Telomeres were first identified 80 years ago by Hermann Muller working with the fruit fly (*Drosophila melanogaster*) and by Barbara McClintock working with corn (*Zea mays*) cells. Telomeres are specialized non-coding double-stranded repetitive DNA-protein complexes that form protective caps at the ends of eukaryotic chromosomes [16]. These heterochromatic structures are composed of guanine rich TTAGGG repeats associated with a family of proteins known as the shelterin complex (TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1, and Rap1) [17]. These structures maintain genomic integrity through their capacity to prevent their recognition as a DNA double-stranded break and thence activation of DNA damage response (DDR), or end-to-end fusions [16]. During each cell division, part of the DNA located at the chromosomes’ extremity is lost due to incomplete replication of the lagging strand, a phenomenon known as the “end replication problem” [18]. In somatic cells, this leads to progressive telomere attrition/shortening and in the end to critically short

telomeres, which triggers replicative senescence or apoptosis [19].

Telomerase is a ribonucleoprotein composed of a catalytic subunit called “Telomerase Reverse Transcriptase” (TERT) and an RNA matrix subunit called “Telomerase RNA component” (TERC). This RNA-dependant DNA polymerase can maintain telomere length by extending the guanine-rich single strand of telomeres, allowing DNA polymerase to achieve synthesis of the opposite strand and thus avoids the progressive loss of DNA at each replication cycle [20]. Telomerase is repressed in somatic cells but active in embryonic, stem and germ cells, as well as in 90% of tumor cells [21]. This activity prevents telomere shortening with cell division, preventing cell senescence and thus allowing extensive proliferative capacities [16].

In humans, mean telomere length ranges from 4 to 12 kb in somatic cells and from 10 to 20 kb in germinal cells [22, 23]. These mean values differ within an individual depending on the cell type, tissues, and organs. Leukocyte telomere length (LTL), the most studied telomere length in clinical and epidemiological studies due to the easy accessibility of leukocytes, decreases with age [24]. The LTL attrition rate is higher in utero and during the first years of life and then it decreases during adulthood [25–27]. In adults, LTL attrition rates are estimated at 25 to 35 bp/year [28]. LTL is highly heritable (60 to 70%) and displays a wide range of mean values (4 kb range) between individuals of the same age in a population [22, 23, 29]. This variation is essentially determined by genetic factors through different genes, located on both autosomal and X chromosomes. However, other factors such as increased paternal age, female sex and African ancestry also contribute to TL [16].

LTL is typically shorter in men than in women, the mean difference being approximatively 200 bp [30]. The origin of this gender gap is under debate but one of the hypotheses is that it appears at puberty due to the estrogen rise in women. Women’s telomeres could be protected by the antioxidant properties of estrogens through stimulating manganese superoxide dismutase and glutathione peroxidase via Mitogen-Activated Protein kinases (MAP-kinase) and Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) pathways [31]. Moreover, estrogens could also directly activate telomerase via the *hTERT* promoter given that an estrogen-response element is present in this promoter [32]. Therefore, studying the physiological aging process through the telomere spectrum opens up a new approach to female fertility exploration [33].

Rationale of systematic review of the literature

A recent study on telomere length in germ cells suggested that this parameter could be a biomarker of germ cell and embryo quality [34]. Telomeres play also a role

in fertility and there might exist a positive or negative association between relative TL and different factors of female and male infertility [35].

Indeed, germ cell mitotic activity is very different according to gender: male stem germ cells are constantly dividing, and the stock stays constant during the lifespan from puberty onwards. On the other hand, female germ cells stop their division before birth. On the contrary, granulosa cells must divide slowly but regularly to maintain a stock of granulosa cells around the oocytes in primordial and primary follicles from the 7th month of intra-uterine life until the menopause, and intensely during follicular maturation [34, 36]. Therefore, in the context of female fertility, it would appear to be more interesting to investigate telomere length in granulosa cells than in germ cells. Short telomeres could impact female fertility by limiting mitosis ability of granulosa cells twice in a woman's life:

- Continually during a woman life, when granulosa cells multiply in order to maintain a pool of follicles
- Each month, when granulosa cells multiply under gonadotropins stimulation in order to develop a follicle until dominance and ovulation

Several human studies have tried to highlight a correlation between telomere length and female

infertility. The following literature review evaluates the potential link between telomere length and/or telomerase activity in granulosa cells and leukocytes in women with POF.

Material and methods

A systematic review of the published literature relating to the link between telomere length and female fertility has been performed following the PRISMA guidelines (« Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses ») [37] (Fig. 1) using online search of PubMed and ScienceDirect at the date of 01/12/2019 to identify all experimental studies. The most exhaustive research was made by using the keywords: (telomere length OR telomerase) AND (primary ovarian insufficiency OR premature ovarian failure OR occult ovarian insufficiency OR hypergonadotropic ovarian failure OR premature ovarian insufficiency).

We identified 28 hits and screened the titles and/or abstracts to assess eligibility. A total of 5 publications were included in the review of experimental evidence. Two of them studied telomere length and/or telomerase activity in granulosa cells and four of them in leukocytes in women with POF.

For each study, authors determined if there was a positive or a negative correlation between telomeric parameters and premature ovarian failure.

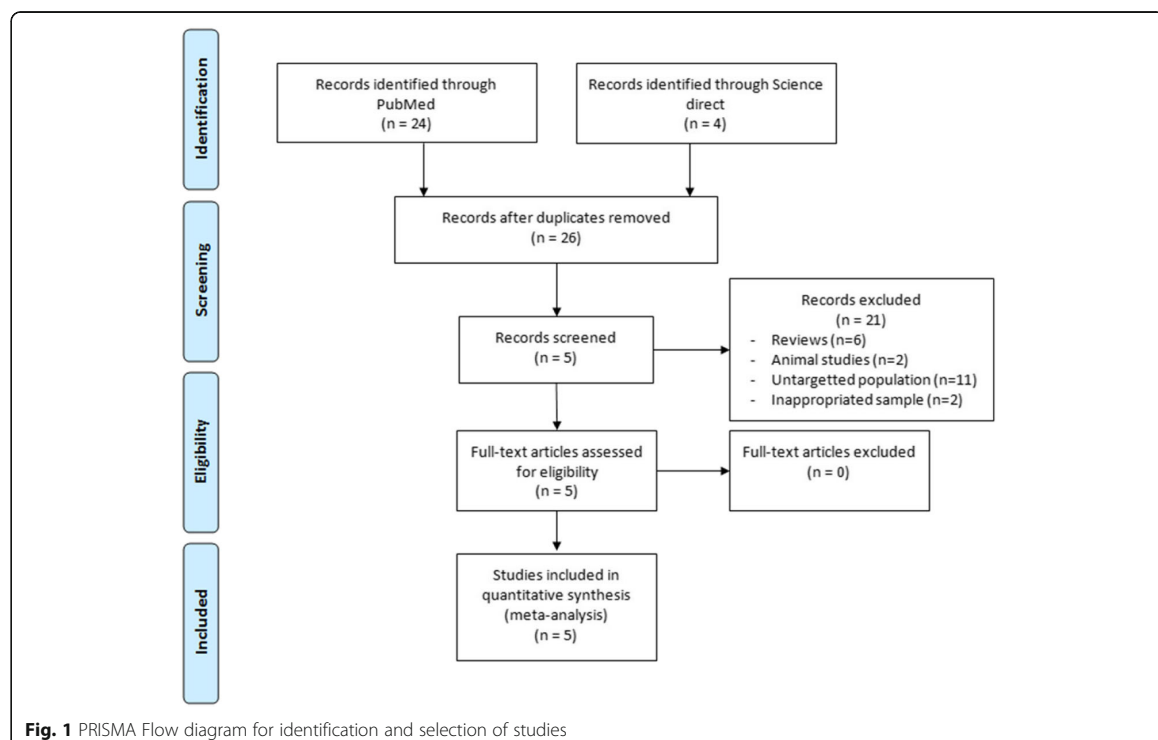


Table 2 Characteristics of patients with biochemical POI and controls in the different studies

Studies	Number	Criteria of patient's inclusion	Age
Butts et al. 2009 [38]	12 POF	FSH ≥ 11.4 IU/L and estradiol ≤ 293.6 pmol/L	30–37
	42 controls	Normal FSH, tubal factor or male infertility	23–37
Hanna et al. 2009 [39]	34 POF	Three-month amenorrhea, FSH > 40 IU/L before the age of 40	21–50
	108 controls	Overall population	17–55
Xu et al. 2017 [42]	120 POF	Regular cycles, FSH ≥ 10 UI/L, unilateral AFC < 5	≤ 40
	279 control (leukocytes)	Lack of criteria	
	90 controls (granulosa)		
Miranda-Furtado et al. 2018 [40]	46 POF	Amenorrhea, FSH > 40 UI/L before the age of 40	18–41
	75 controls	Regular cycles, FSH < 10 UI/L	
Sayban et al. 2018 [41]	40 POF	Six-month amenorrhea, FSH > 40 UI/L before the age of 40	< 40
	40 controls	Regular cycle, normal FSH	

Data on publication date, study objective, sample, selection criteria, number of subjects, age, methods and analysis, study outcome were extracted and resumed in the tables [38–42].

Results

Subjects

Characteristics of the 796 participants in the 5 studies and criteria dividing them into POF and control groups are presented in Table 2.

Telomere length

In the 5 studies, telomere length was assessed using a modification of the quantitative PCR method described by Cawthon [43]. After extraction, telomeric DNA was amplified by PCR in the same time as a single copy gene.

Table 3 Results for telomere length

Studies	Samples	Results
Butts et al. 2009 [38]	Granulosa cells	POF: 1.88 ± 0.69^a
		Controls: 3.15 ± 0.25
Hanna et al. 2009 [39]	Leukocytes	POF: 9.61 ± 1.38^b
		Controls: 8.98 ± 1.15
Xu et al. 2017 [42]	Granulosa cells	POF: 0.78 ± 0.09^c
		Controls: 1.90 ± 0.23
	Leukocytes	POF: 0.75 ± 0.09^d
		Controls: 1.79 ± 0.12
Miranda-Furtado et al. 2018 [40]	Leukocytes	POF: 0.93 ± 0.23^e
		Controls: 1.07 ± 0.27
Sayban et al. 2018 [41]	Leukocytes	IOP: 0.7445^f
		Controls: 0.5994

^a $p = 0.039$

^b $p = 0.01$

^c $p < 0.001$

^d $p < 0.001$

^e $p < 0.0006$

^f $p < 0.05$

This technique estimates telomere length by comparing the amount of telomere repeat amplification product (T) to the amount of the single copy gene (S) product. The Telomere/Single Copy Gene ratio (T/S ratio) correlates with the average telomere length [38–42]. In the two studies measuring TL in granulosa cells, TL was shorter in POF patients than in controls (Table 3). The 4 studies measuring LTL reported conflicting findings. In 2 of them LTL was shorter in POF patients than in controls whereas the 2 other studies reported longer LTL in POF patients.

Telomerase activity

Telomerase activity was measured in granulosa cells in a subgroup of 123 participants in two studies (Table 2). Telomerase activity (TA) was detected using a modified telomeric repeat amplification protocol (TRAP). Presence or absence of TA was determined based on the characteristic laddering pattern of telomerase products [38] or relative TA quantified based on a standard curve [42]. In both studies, TA activity was higher in granulosa cells from controls than in those of POF patients (Table 4).

Table 5 presents the overview of the statistical results obtained in the five studies concerning TL and TA in granulosa cells and leukocytes in both POF and control groups.

Discussion

The studies of Butts et al. and of Xu et al. demonstrated that telomeres are shorter in granulosa cells (GC) of women with POF than in those of healthy controls. Moreover, these two studies observed also decreased telomerase activity in GC from POF patients. These results suggest that short telomeres in GC are associated with a fertility decrease. Therefore, telomere length in GC should be considered as a new marker of reproductive lifespan in women [38, 42].

Table 4 Results for telomerase activity

Authors	Expression	Results
Butts et al. 2009 [38]	Absence of telomerase products	POF: 11/12 (92%) Controls: 21/42 (50%) OR (95%): 11 ^a
Xu et al. 2017 [42]	Relative telomerase activity	POF: 1,57 ± 0,59 ^b Controls: 4,63 ± 0,93

^a*p* = 0,02^b*p* = 0,025

The hypothesis to explain the impact of short telomeres in GC on female fertility could be through the limited proliferation capacity of cells with short TL [44]. The limited proliferation capacity of granulosa cells has been demonstrated to be a characteristic that differentiates women with POF from fertile women. The development of ovarian follicles requires an acute increase of granulosa cell number from a few cells to tens of thousands before ovulation [38]. Moreover, an insufficient activation of telomerase in early follicular development stages could accelerate telomeric attrition and severely compromise cellular functions necessary for good follicular maturation [38, 45, 46]. For many years, granulosa has been considered as containing cells with multipotent stem cell characteristics [47], as the possibility of dividing without the need of anchorage [48] and differentiation into varied cell types [49]. As other stem cells, these cells present a constitutionally high telomerase activity [50, 51]. The pattern of this telomerase activity has been studied through the different types of follicle in ovaries and with aging, especially in bovine [52]. It has been found heterogeneous: the highest levels

of telomerase activity are found in the smaller rapidly growing preantral follicles [53], followed by a decrease in activity with the maturation of the follicle [45]. This suggests that the high proliferative activity of granulosa cells could be partially linked to telomerase activity [54] and supports the hypothesis that a decrease in this activity may participate in POF. However, the obtained conclusions about telomerase activity decrease in the studies reviewed are based on analyses of luteinized granulosa cells which are terminally differentiated and morphologically distinct from proliferating granulosa cells in early stage follicles [38].

The hypothesized link between LTL and female fertility is based on the premise that LTL and GTL should be correlated. It is known that all TL are synchronized in somatic tissues at birth [55] and that despite the difference in TL observed between tissues due to different proliferative indexes, strong correlations in TL across somatic tissues subsist later in life such as in individuals with long (or short) TL in one tissue also have long (or short) TL in other tissues [56]. However, this synchrony may potentially not apply to granulosa cells since TL

Table 5 Summary table of the different studies

Authors	Samples	Subjects	Setting	Method	Results
Butts et al. 2009 [38]	Granulosa cells	12 POF 42 controls	TL	qPCR	Shorter telomere in POF
	Granulosa cells	12 POF 42 controls	TA	PCR TRAPeze Telomerase Detection Kit	Absence of TA more frequent in POF
Hanna et al. 2009 [39]	Leukocytes	34 POF 108 controls	TL	qPCR	Longer telomere in POF
Xu et al. 2017 [42]	Granulosa cells	120 POF 90 controls	TL	qPCR	Shorter telomere in POF
	Leukocytes	120 POF 279 controls	TL	qPCR	Shorter telomere in POF
	Granulosa cells	31 POF 38 controls	TA	PCR Q-TRAP	TA level lower in POF
Miranda-Furtado et al. 2018 [40]	Leukocytes	46 POF 75 controls	TL	qPCR	Shorter telomere in POF
Sayban et al. 2018 [41]	Leukocytes	40 POF 40 controls	TL	qPCR	Longer telomere in POF

TL Telomere length

TA Telomerase activity

dynamics of these cells are influenced by telomerase activity. The systematic review of the literature about LTL in women with POF presented contradictory results.

First, the studies of Hanna et al. and of Sayban et al. concluded that LTL was longer in women with POF. According to the authors, these results were not expected since they initially thought that women with POF would demonstrate accelerated cellular aging [39, 41]. Their first hypothesis to explain these results was that longer LTL reflected a decreased division rate in the early germ cell pool. As a consequence of fewer cell divisions in germ cells, the ovarian follicular pool was reduced, and patients had a higher risk of developing POF by consuming the oocyte pool [39, 41]. Secondly, the authors proposed that longer telomeres in women with POF could be the result of an auto-immune mechanism which has been found frequently in this population. This auto-immune phenomenon could change the repartition of blood cells by selecting a specific cell type with longer telomeres. Nevertheless, some studies on telomere length and auto-immune disease suggest that auto-immune diseases are associated with shorter telomeres rather than with longer ones. Thus, this explanation is unlikely [39, 41]. Finally, their third hypothesis was that long-term substitutive hormone therapy given to these patients could slow down the telomere attrition rate by protecting telomeres from reactive oxygen species (ROS). Estrogens may increase telomerase activity by inducing hTERT expression [57]. However, the authors did not measure estrogen levels in these patients and in a study by Miranda-Furtado et al., no correlation between telomere length and estradiol levels was found. Moreover, in their study, Sayban et al. didn't mention the mean age of participants included in POF and control groups. Since LTL is highly influenced by age, this could constitute an important bias in this study [39–41].

Unlike Hanna et al. and Sayban et al., Xu et al. and Miranda-Furtado et al., reported shorter telomeres in leukocytes of women with POF than in controls [40, 42]. These results are in line with the “synchrony hypothesis” [55]. However, these 2 pilot studies were conducted with a limited number of subjects and must be confirmed with larger number of participants especially considering the contradictory results with the 2 other studies. If these results are confirmed, this would make it possible to avoid taking granulosa cells to measure GTL. If LTL has the same association with POF as GTL, it could serve as a surrogate marker with an easier accessibility and applicability in clinical and laboratory practices. However, a recent study conducted in 35 fertile egg donors did not find any association between GTL and LTL based on qPCR measurements [58].

Interestingly, it must be noted that all of these studies were conducted with a qPCR-based method to

measure TL. This method is known to have high measurement error [59, 60] and thus requires a large sample size to offset the error, which was not the case for the 5 studies reviewed nor the one comparing GTL and LTL.

Another important bias might arise from differences in inclusion criteria between the studies reviewed. For example, level of FSH mentioned as POF criteria varied from 10 IU/L in Xu et al. to 40 IU in Hanna et al., Miranda-Furtado et al. and in Sayban et al. (Table 2). In Butts et al., the POF threshold was based on data from patients undergoing in vitro fertilization (IVF) with low pregnancy rate. In the Xu et al. study, the patients were presented with only biochemical criteria and not clinical symptoms of POF since they kept regular cycles. The literature does not highlight any direct link between FSH levels and telomere length. However, high FSH levels result from lower estradiol levels which could be linked to decreased telomerase activity [57] and compromised telomere protection against ROS. Moreover, long term hormone replacement could slow the kinetics of telomere attrition. Hanna et al. included patients from 21 to 50 years old and some of them certainly took hormonal supplementation. This may have introduced some bias. Finally, patients included presented different stages of POF which makes it difficult to compare these studies.

Conclusion

As an overall conclusion of this systematic review of the literature, shorter telomeres and diminished telomerase activity in granulosa cells appear to be associated with occult ovarian insufficiency. However, the number of studies and of subjects within are very low and the methodology questionable. If these results were to be confirmed with more subjects, better defined populations and more adapted methodology, the measurement of these parameters could be an early and reliable marker for the decline of ovarian function, as suggested in a recent reflection by Pr Barlow [61]. This may also have important consequences for women's health beyond fertility preservation. However, the question whether short telomeres observed in women with POF are a cause or a consequence of this disease remains to be addressed in future studies.

Abbreviations

POF: Premature Ovarian Failure; FSH: Follicle Stimulating Hormone; ESHRE: European Society of Human Reproduction and Embryology; AMH: Anti-Müllerian Hormone; LH: Luteinizing Hormone; AFC: Antral Follicle Count; ART: Assisted Reproductive Technology; DDR: DNA Damage Response; TERT: Telomerase Reverse Transcriptase; TERC: Telomerase RNA Component; LTL: Leukocyte telomere length; TL: Telomere Length; MAP-kinase: Mitogen-Activated Protein kinases; NF- κ B: Nuclear Factor- κ B; hTERT: Human Telomerase Reverse Transcriptase; TA: Telomerase Activity; TRAP: Telomeric Repeat Amplification Protocol; GC: Granulosa Cells;

GTL: Granulosa Telomere Length; qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction

Authors' contributions

Conception, design and supervision: Isabelle Kosciński. Data collection: Anne Julie Fattet and Simon Toupan. Data analysis: Anne Julie Fattet and Nicolas Monnin. First draft of the manuscript: Anne Julie Fattet. Critical review and editing: Isabelle Kosciński, Simon Thornton, Simon Toupan, Jean Louis Guéant, Athanase Benetos. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This study has been supported by the French PIA project « Lorraine Université d'Excellence », reference ANR-15-IDEX-04-LUE.

Availability of data and materials

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Author details

¹Laboratory of Biology of Reproduction-CECOS Lorraine, University Hospital of Nancy, 10 rue du Dr Heydenreich, 54000 Nancy, France. ²Université de Lorraine, Inserm, DCAC, F-54000 Nancy, France. ³Centre AMP Majorelle-Laboratory ATOUTBIO, 95, rue Ambroise Paré, 54000 Nancy, France. ⁴Université de Lorraine, Inserm, NGERE, F-54000 Nancy, France.

Received: 24 March 2020 Accepted: 4 August 2020

Published online: 21 August 2020

References

- Lampic C, Svanberg AS, Karlström P, Tydén T. Fertility awareness, intentions concerning childbearing, and attitudes towards parenthood among female and male academics. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2006;21(2):558–64.
- Beck-Peccoz P, Persani L. Premature ovarian failure. *Orphanet J Rare Dis*. 2006;1:9.
- Shestakova IG, Radzinsky VE, Khamoshina MB. Occult form of premature ovarian insufficiency. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. 2016;32(suppl 2):30–2.
- European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guideline Group on POI, Webber L, Davies M, Anderson R, Bartlett J, Braat D, et al. ESHRE guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2016;31(5):926–37.
- Belaïsch-Allart J, Mayenga J-M, Grefenstete I, Mokdad A, Moumin H. Premature ovarian failure: which approaches? *Gynecol Obstet Fertil*. 2008;36(9):882–5.
- Rudnicka E, Kruszkowska J, Klicka K, Kowalczyk J, Grymowicz M, Skórska J, et al. Premature ovarian insufficiency – aetiopathology, epidemiology, and diagnostic evaluation. *Przegląd Menopauzalny. Menopause Rev*. 2018;17(3):105–8.
- Podfigurna-Stopa A, Czyzyk A, Grymowicz M, Smolarczyk R, Katulski K, Czajkowski K, et al. Premature ovarian insufficiency: the context of long-term effects. *J Endocrinol Investig*. 2016;39(9):983–90.
- Roeters van Lennep JE, Heida KY, Bots ML, Hoek A, collaborators of the Dutch Multidisciplinary Guideline Development Group on Cardiovascular Risk Management after Reproductive Disorders. Cardiovascular disease risk in women with premature ovarian insufficiency: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Prev Cardiol*. 2016;23(2):178–86.
- Committee on Gynecologic Practice. Committee Opinion No. 698: hormone therapy in primary ovarian insufficiency. *Obstet Gynecol*. 2017;129(5):e134–41.
- Persani L, Rossetti R, Cacciari C. Genes involved in human premature ovarian failure. *J Mol Endocrinol*. 2010;45(5):257–79.
- Jiao X, Ke H, Qin Y, Chen Z-J. Molecular genetics of premature ovarian insufficiency. *Trends Endocrinol Metab TEM*. 2018;29(11):795–807.
- Laven JSE. Primary ovarian insufficiency. *Semin Reprod Med*. 2016;34(4):230–4.
- Orlandini C, Regini C, Vellucci FL, Petraglia F, Luisi S. Genes involved in the pathogenesis of premature ovarian insufficiency. *Minerva Ginecol*. 2015;67(5):421–30.
- Broer SL, Broekmans FJM, Laven JSE, Fauser BCJM. Anti-Müllerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications. *Hum Reprod Update*. 2014;20(5):688–701.
- Committee on Gynecologic Practice. Committee opinion no. 605: primary ovarian insufficiency in adolescents and young women. *Obstet Gynecol*. 2014;124(1):193–7.
- Thilagavathi J, Venkatesh S, Dada R. Telomere length in reproduction. *Andrologia*. 2013;45(5):289–304.
- Blackburn EH. Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett*. 2005;579(4):859–62.
- de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*. 2005;19(18):2100–10.
- Shay JW, Wright WE, Werbin H. Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1072(1):1–7.
- Lindsey J, McGill NI, Lindsey LA, Green DK, Cooke HJ. In vivo loss of telomeric repeats with age in humans. *Mutat Res*. 1991;256(1):45–8.
- Shay JW, Wright WE. Telomeres and telomerase: implications for cancer and aging. *Radiat Res*. 2001;155(1 Pt 2):188–93.
- Factor-Litvak P, Susser E, Kezios K, McKeague I, Kark JD, Hoffman M, et al. Leukocyte Telomere Length in Newborns: Implications for the Role of Telomeres in Human Disease. *Pediatrics*. 2016;137(4):e20153927.
- Samassekou O, Gadji M, Drouin R, Yan J. Sizing the ends: normal length of human telomeres. *Ann Anat Anat Anz Off Organ Anat Ges*. 2010;192(5):284–91.
- Baird DM, Kipling D. The extent and significance of telomere loss with age. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1019:265–8.
- Aubert G, Baerlocher GM, Vulto I, Poon SS, Lansdorp PM. Collapse of telomere homeostasis in hematopoietic cells caused by heterozygous mutations in telomerase genes. *PLoS Genet*. 2012;8(5):e1002696.
- Arias-Sosa LA. Understanding the role of telomere dynamics in Normal and dysfunctional human reproduction. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif*. 2019;26(1):6–17.
- Benetos A, Verhulst S, Labat C, Lai T-P, Girerd N, Toupan S, et al. Telomere length tracking in children and their parents: implications for adult onset diseases. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2019;33(12):14248–53.
- Müezzini A, Zaineddin AK, Brenner H. A systematic review of leukocyte telomere length and age in adults. *Ageing Res Rev*. 2013;12(2):509–19.
- Hjelmberg JB, Dalgård C, Möller S, Steenstrup T, Kimura M, Christensen K, et al. The heritability of leukocyte telomere length dynamics. *J Med Genet*. 2015;52(5):297–302.
- Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*. 1985;43(2 Pt 1):405–13.
- Viña J, Borrás C, Gambini J, Sastre J, Pallardó FV. Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. *FEBS Lett*. 2005;579(12):2541–5.
- Bayne S, Jones MEE, Li H, Liu J-P. Potential roles for estrogen regulation of telomerase activity in aging. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1114:48–55.
- Benetos A, Okuda K, Lajemi M, Kimura M, Thomas F, Skurnick J, et al. Telomere length as an indicator of biological aging: the gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. *Hypertens Dallas Tex*. 1979. 2001;37(2 Pt 2):381–5.
- Rocca MS, Foresta C, Ferlin A. Telomere length: lights and shadows on their role in human reproduction. *Biol Reprod*. 2019;100(2):305–17.
- Vasilopoulos E, Fragkiadaki P, Kalliora C, Fragou D, Docea AO, Vakonaki E, et al. The association of female and male infertility with telomere length (Review). *Int J Mol Med*. 2019;44(2):375–89.
- Ozturk S, Sozen B, Demir N. Telomere length and telomerase activity during oocyte maturation and early embryo development in mammalian species. *Mol Hum Reprod*. 2014;20(1):15–30.
- Shamseer L, Moher D, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015: elaboration and explanation. *BMJ*. 2015;350:g7647.
- Butts S, Riethman H, Ratcliffe S, Shaunik A, Coutifaris C, Barnhart K. Correlation of telomere length and telomerase activity with occult ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(12):4835–43.
- Hanna CW, Bretherick KL, Gair JL, Fluker MR, Stephenson MD, Robinson WP. Telomere length and reproductive aging. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2009;24(5):1206–11.

40. Miranda-Furtado CL, Luchiaro HR, Chielli Pedrosa DC, Kogure GS, Caetano LC, Santana BA, et al. Skewed X-chromosome inactivation and shorter telomeres associate with idiopathic premature ovarian insufficiency. *Fertil Steril*. 2018;110(3):476–85 e1.
41. Sayban S, Mirfakhraie R, Omrani MD, Ghaedi H, Heidary H, Yaghoobi H, et al. Idiopathic premature ovarian failure and its association to the abnormal longitudinal changes of telomere length in a population of Iranian infertile women: a pilot study. *Meta Gene*. 2018;18:58–61.
42. Xu X, Chen X, Zhang X, Liu Y, Wang Z, Wang P, et al. Impaired telomere length and telomerase activity in peripheral blood leukocytes and granulosa cells in patients with biochemical primary ovarian insufficiency. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2017;32(1):201–7.
43. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(10):e47.
44. Liu CC, Ma DL, Yan T-D, Fan X, Poon Z, Poon L-F, et al. Distinct responses of stem cells to telomere uncapping-a potential strategy to improve the safety of cell therapy. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2016;34(10):2471–84.
45. Kosebent EG, Uysal F, Ozturk S. Telomere length and telomerase activity during folliculogenesis in mammals. *J Reprod Dev*. 2018;64(6):477–84.
46. Kinugawa C, Murakami T, Okamura K, Yajima A. Telomerase activity in normal ovaries and premature ovarian failure. *Tohoku J Exp Med*. 2000;190(3):231–8.
47. Kossowska-Tomaszczuk K, De Geyter C. Cells with stem cell characteristics in somatic compartments of the ovary. *Biomed Res Int*. 2013;2013:1–8.
48. Lavranos TC. Anchorage-independent culture of bovine Granulosa cells: the effects of basic fibroblast growth Factor and Dibutyl cAMP on cell division and differentiation. *Exp Cell Res*. 1994;211(2):245–51.
49. Kossowska-Tomaszczuk K, Geyter CD, Geyter MD, Martin I, Holzgreve W, Scherberich A, et al. The multipotency of luteinizing Granulosa cells collected from mature ovarian follicles. *Stem Cells*. 2009;27(1):210–9.
50. Roake CM, Artandi SE. Regulation of human telomerase in homeostasis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(7):384–97.
51. Slack JMW. What is a stem cell? *WIREs Dev Biol*. 2018;7(5):e323.
52. Goto H, Iwata H, Takeo S, Nisinonso K, Murakami S, Monji Y, et al. Effect of bovine age on the proliferative activity, global DNA methylation, relative telomere length and telomerase activity of granulosa cells. *Zygote Camb Engl*. 2013;21(3):256–64.
53. Lavranos TC, Mathis J, Latham S, Kalionis B, Shay J, Rodgers R. Evidence for ovarian Granulosa stem cells: telomerase activity and localization of the telomerase ribonucleic acid component in bovine ovarian follicles. *Biol Reprod*. 1999;61:358–66.
54. Liu J-P, Li H. Telomerase in the ovary. *Reprod Camb Engl*. 2010;140(2):215–22.
55. Youngren K, Jeanlos E, Aviv H, Kimura M, Stock J, Hanna M, et al. Synchrony in telomere length of the human fetus. *Hum Genet*. 1998;102(6):640–3.
56. Daniali L, Benetos A, Susser E, Kark JD, Labat C, Kimura M, et al. Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. *Nat Commun*. 2013;4:1597.
57. Grasselli A, Nanni S, Colussi C, Aiello A, Benvenuti V, Ragone G, et al. Estrogen receptor- α and endothelial nitric oxide synthase nuclear complex regulates transcription of human telomerase. *Circ Res*. 2008;103(1):34–42.
58. Lara-Molina EE, Frasiak JM, Marin D, Tao X, Díaz-Gimeno P, Florensa M, et al. Cumulus cells have longer telomeres than leukocytes in reproductive-age women. *Fertil Steril*. 2020;113(1):217–23.
59. Aviv A, Hunt SC, Lin J, Cao X, Kimura M, Blackburn E. Impartial comparative analysis of measurement of leukocyte telomere length/DNA content by southern blots and qPCR. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(20):e134.
60. Nettle D, Seeker L, Nussey D, Froy H, Bateson M. Consequences of measurement error in qPCR telomere data: a simulation study. *PLoS One*. 2019;14(5):e0216118.
61. Barlow DH. Telomere length and its assessment for female reproduction. *Fertil Steril*. 2020;113(1):91–2.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions





Review

Ovarian Telomerase and Female Fertility

Simon Toupance ^{1,†} , Anne-Julie Fattet ^{2,†}, Simon N. Thornton ¹, Athanase Benetos ^{1,3}, Jean-Louis Guéant ⁴
and Isabelle Kosciński ^{2,4,*}

¹ DCAC, Université de Lorraine, Inserm, 54000 Nancy, France; s.toupance@chru-nancy.fr (S.T.); simon.thornton@univ-lorraine.fr (S.N.T.); a.benetos@chru-nancy.fr (A.B.)

² Laboratory of Biology of Reproduction, University Hospital of Nancy, 54000 Nancy, France; annejulie1208@hotmail.fr

³ Université de Lorraine, CHRU Nancy, Pôle “Maladies du Vieillissement, Gériologie et Soins Palliatifs”, 54000 Nancy, France

⁴ Inserm U1256, NGERE, Université de Lorraine, 54000 Nancy, France; jean-louis.gueant@univ-lorraine.fr

* Correspondence: kosciński.isa@gmail.com; Tel.: +33-624-263-768

† These authors have contributed equally to this work.



Citation: Toupance, S.; Fattet, A.-J.; Thornton, S.N.; Benetos, A.; Guéant, J.-L.; Kosciński, I. Ovarian Telomerase and Female Fertility. *Biomedicines* **2021**, *9*, 842. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070842>

Academic Editor: Yegor E. Yegorov

Received: 5 June 2021

Accepted: 14 July 2021

Published: 20 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Women's fertility is characterized both quantitatively and qualitatively mainly by the pool of ovarian follicles. Monthly, gonadotropins cause an intense multiplication of granulosa cells surrounding the oocyte. This step of follicular development requires a high proliferation ability for these cells. Telomere length plays a crucial role in the mitotic index of human cells. Hence, disrupting telomere homeostasis could directly affect women's fertility. Strongly expressed in ovaries, telomerase is the most effective factor to limit telomeric attrition and preserve ovarian reserve. Considering these facts, two situations of infertility could be correlated with the length of telomeres and ovarian telomerase activity: Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), which is associated with a high density of small antral follicles, and Premature Ovarian Failure (POF), which is associated with a premature decrease in ovarian reserve. Several authors have studied this topic, expecting to find long telomeres and strong telomerase activity in PCOS and short telomeres and low telomerase activity in POF patients. Although the results of these studies are contradictory, telomere length and the ovarian telomerase impact in women's fertility disorders appear obvious. In this context, our research perspectives aimed to explore the stimulation of ovarian telomerase to limit the decrease in the follicular pool while avoiding an increase in cancer risk.

Keywords: telomerase; hTERT; female fertility

1. Introduction

Female fertility is strongly linked to the number of ovarian follicles and their quality. The pool of ovarian primordial follicles is established during prenatal life and results from an intensive proliferation of oogonia and somatic follicular cells that surround them. Follicular atresia begins even before birth and ends with menopause. The quality of the follicles is linked to their capacity to ovulate, to produce a fertilizable oocyte that leads to an evolutionary embryo, and finally to a healthy child. Folliculogenesis implies an intense proliferation of granulosa cells during follicular maturation. Overall, the quantity and quality of follicles depend greatly on the capacity of follicular cells to proliferate; any disruption of this mechanism will result in a shortened reproductive life span and ovulation disturbance. Telomeres, the nucleoprotein structures that cap chromosome extremities, play a crucial role in the proliferative potential of cells. Telomere length shortens with each cell division and triggers cell senescence when a certain threshold is reached. Therefore, telomere attrition is considered a primary hallmark of aging [1]. This review attempts to highlight the relation between telomere length/telomerase activity in ovarian cells physiologically and in two situations of infertility, PCOS and POF.

with SP1 [32,33] and, through this way, silence the expression of some genes, especially tumor suppressors.

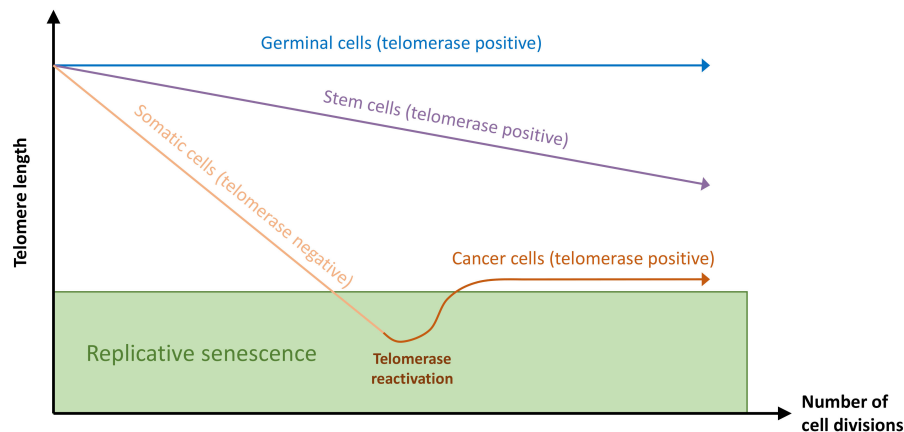


Figure 2. Telomere length dynamics in germinal, stem, somatic, and cancer cells according to the presence of telomerase activity. In germinal and stem cells, active telomerase can offset telomere attrition due to cell divisions. In somatic cells, telomerase is inactive, and telomere length is shortened until it reaches a threshold that triggers replicative senescence. Cancer cells can bypass cell senescence by the reactivation of telomerase.

Under oxidative stress conditions, TERT can move out from the nucleus and localize to mitochondria [34,35]. In mitochondria, TERT can bind to mitochondrial DNA (mtDNA) and display a protective effect against reactive oxygen species, protecting cells against oxidative stress-induced damage [35–37]. TERT can also sensitize cells to oxidative stress by increasing levels of mtDNA damage, which may lead to apoptotic cell death [38]. This discrepancy in the mitochondrial role of TERT on oxidative stress can be explained by different levels of TERT expression. Mitochondrial TERT also exerts control on mitophagy by decreasing the processing of PINK1 (phosphatase and tensin homolog-induced putative kinase 1) [39]. TERC can also be imported into mitochondria [40], where it is converted to TERC-53 and exported back to the cytoplasm. TERC-53 acts as a signaling molecule involved in cell senescence [41].

3. Human Folliculogenesis, the Importance of Proliferative Capacity

Ovaries contain female gametes in special histologic structures named follicles, where the gamete (oocyte) is surrounded by somatic cells (follicular cells). Folliculogenesis comprises several steps summarized here and illustrated by Figure 3, with a special focus on granulosa cell proliferation.

3.1. Establishment of a Pool of Primordial Follicles at the Fetal Time

After their migration into the genital ridges, primordial germ cells undergo many mitoses from the 6th week of embryo development, with a maximum mitosis rate in the 3rd and 4th month, leading to the formation of primordial germ cell cysts. From the end of the 2nd month, variable numbers of ovogonia enter meiosis and block at the diplotene stage of the first meiosis division [42]. At the same time, these germ cell cysts break apart into oocytes that become surrounded by somatic pre-granulosa cells to form primordial follicles whose number is maximal at the 5th month of pregnancy in humans [42]. All these steps are enabled by the high proliferation capacity of ovogonia and follicular cells [43] and may be limited by short telomeres, restricting the size of the follicular pool [44].

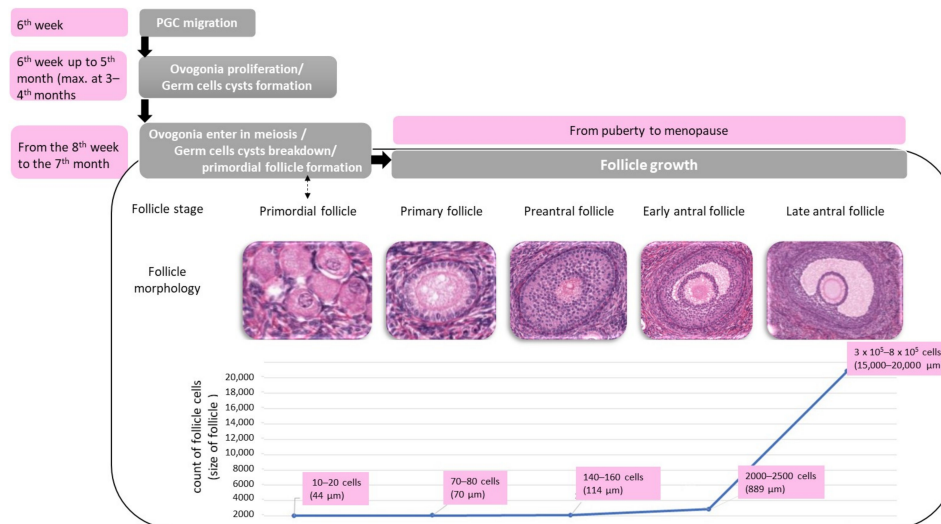


Figure 3. Human folliculogenesis and granulosa cells proliferation. The figure describes the different stages of follicle growth and the corresponding granulosa cell count and follicle size. Granulosa cells need to display a high proliferative potential to accommodate the tremendous proliferation needed during folliculogenesis.

3.2. Follicle Growth

From puberty until menopause, follicular development starts when follicles leave the pool of resting primordial follicles to enter the growth phase. From there, the early growing follicle will become dominant, undergoing a developmental process, including a dramatic course of cellular proliferation and differentiation [45]. This occurs similarly in all mammals: for example, bovine follicular cells of the primordial follicle divide 21 times until the stage of an antral follicle [46].

The next step of follicle maturation has also been well explored in bovine and implies a differentiation of granulosa cells into two different pools: granulosa cells building the wall of the antrum and granulosa cells forming the cumulus oophorus around the oocyte. In the antral wall, the proliferation rate is greater in the middle and antral layers than in the basal layer, where it seems similar, as observed in the cumulus oophorus [47].

This development of primordial into secondary follicles and subsequent maturation of the dominant follicle implies a very high proliferation capacity for granulosa cells [48]. The mitotic index of the granulosa cells continues to increase with follicular diameter before reaching a peak in the small antral follicles [45,49]; the granulosa cell number reaches to the hundreds of thousands before ovulation [50] (Figure 3).

3.3. Telomerase and Follicle Growth

In this context, the telomere length of ovarian cells has crucial importance [48]. As the most efficient factor limiting telomere attrition, the telomerase presents, unsurprisingly, rather high activity in the ovaries, especially in granulosa cells, which may enable their numerous replications. This high telomerase activity was highlighted many years ago in cows [47] and recalls other multipotent stem cell characteristics of granulosa cells [51,52]; that is, they divide without the need of anchorage [53] and can be differentiated into varied cell types [54].

The activity pattern of the telomerase has been studied through the different types of follicles in ovaries and with aging, especially in large mammals (mainly in bovines and pigs) [55,56].

Heterogeneity among all follicles has been found; the highest levels of telomerase activity are found in the smaller, rapidly growing preantral follicles [49,55], followed by a decrease in activity with the maturation of the follicle [48]. This suggests that the high proliferative activity of granulosa cells could be partially linked to telomerase activity [57].

Interestingly, the study of telomerase in bovine antral follicles highlighted heterogeneity within the granulosa, with a pattern similar to the proliferation index. More importantly, the expression of the catalytic subunit of TERT appears conserved in the middle and next to the antrum layers (layers with a high proliferation rate), whereas it seems to be down-regulated in basal layers and in the cumulus oophorus, where only residual telomerase RNA would persist [47,58], explaining a moderate proliferation rate during the last stage of follicle maturation. In pigs, comparable proliferation and TERT activity have been observed in granulosa cells of the wall of the antrum (expression of TERT only in middle and antral layers, and not in basal layers); however, TERT has also been detected in cumulus cells at a higher level than in bovine [56,59].

After ovulation, residual granulosa cells undergo differentiation to large luteal cells and enter apoptosis. Not surprisingly, they present a low telomerase activity. This evolution of granulosa cells, which have achieved their differentiation and are morphologically distinct from proliferating granulosa cells in early-stage follicles, can explain the decrease in telomerase activity, as reported in some studies [60].

3.4. Regulation of Telomerase Activity in Ovaries

3.4.1. Effect of Age

Interestingly, aging significantly impacts ovarian telomerase activity in bovine [55], leading to a decrease in granulosa cells' proliferative activity. In mice, ovarian TERT expression was found to decrease with aging [61]. In humans, ovarian TERT also decreases with aging and is associated with telomere attrition [62].

3.4.2. Estradiol and Telomerase Activity

The relation between sex hormone and telomere length has been considered for some time, based on observations of longer telomeres in women than in men [63]. The sex-specific discrepancy of the dynamics of telomere length erosion throughout life [64] was first hypothesized, suggesting a protective impact of female sex hormones [65]. However, longitudinal studies are controversial, showing either higher or lower rates of telomere length (TL) attrition in women compared to same-aged men [66,67]. Recently, it was even suggested that the sex-related gap in TL could be established at birth since gender differences in TL are found in newborns [68].

However, these longitudinal data originate from leukocyte telomere length (LTL) analysis, and tissue-specific differences in TL dynamics can exist. During folliculogenesis, in ovarian aging, as well as during neoplastic development, the pattern of induced telomerase activity is dependent on cell type, time, and location [56].

A direct impact of estrogens has been suggested since the region of the *TERT* promoter presents an estrogen response element [67]. An indirect impact via the activation of *MYC*, which is a direct target of ESR, has been suggested by studies in granulosa of rats and mice [69,70]. Activation of the proto-oncogene *MYC* seems especially involved in ovarian carcinogenesis [57], like *BCL2* and *TERT*.

In addition, high levels of estrogens can act indirectly on TL through a reduction in reactive oxygen species [71]. Furthermore, epidermal growth factor (EGF), which stimulates telomerase activity, has been found in abundance in small follicles [59], suggesting its role in the regulation of the telomerase activity and telomere maintenance, particularly in small, rapidly growing follicles.

The estradiol impact on telomerase and telomere length dynamics has been explored by animal experiments: in rats, the administration of estrogens prevents the inhibition of telomerase, suggesting that telomerase withdrawal plays an integral role in granulosa cell apoptosis and follicular atresia induced by estrogen withdrawal [72]. On the contrary,

estrogen deficiency in mice results in an inhibition of telomerase within ovaries in a tissue-specific manner. This leads to the shortening of telomeres and compromised proliferation of the follicular granulosa cells. These effects are offset by estrogen replacement therapy [73]. Interestingly, in return, telomerase could exert control on estrogen expression through the non-canonical pathway. A recent study showed that *in vitro* overexpression of TERT in granulosa cells enhanced the expression of steroidogenesis genes and increased the level of estrogen in pre-ovulatory luteinized granulosa cells [74].

Considering the importance of estrogen in the regulation of telomere length, especially through the regulation of telomerase activity, two physio-pathological situations can be studied from a telomerase point of view: the syndrome of polycystic ovaries (PCOS) relative to a very high ovarian follicular density, and high estrogen levels and premature ovarian failure (POF) relative to a very poor ovarian follicular density and poor estrogen levels. Based on the elements exposed above, long telomeres with high telomerase activity in PCOS patients and short telomeres with decreased telomerase activity in POF patients would be expected to be found.

4. Polycystic Ovary Syndrome (PCOS)

The syndrome of polycystic ovaries is the most common endocrine disorder causing female infertility. Among women of reproductive age, its prevalence is reported to be 6–8% in developing countries. PCOS is a multifactorial disorder, and symptoms include hyperandrogenemia, oligo-anovulation, and a polycystic morphology of the ovaries. In addition, oocyte quality is frequently impaired, and, finally, PCOS constitutes real ovulatory infertility. Furthermore, some metabolic disorders such as metabolic syndrome, type 2 diabetes, and cardiovascular disease are regularly associated with PCOS [75] due to a high incidence of insulin resistance (IR), which participates in the pathophysiology of this syndrome. The link between IR and sex hormones has been studied for over 20 years. IR is promoted more by high estrogen levels than high androgen levels, and hyperinsulinism seems to promote hyperandrogenism. Indeed, insulin can stimulate ovarian sex hormone secretion directly by linking to the ovarian insulin receptor and IGF-I receptor, and indirectly mainly by reducing the hepatic production of IGF-BP-1 (the major circulating IGF-1 protein) [76,77]. PCOS is also associated with a proinflammatory state [78] since oxidative stress is not compensated by antioxidative factors [79]. The main symptoms and long-term conditions of PCOS are provided in Table 1.

Table 1. Diagnostic criteria according to AE-PCOS Society (2006) and long-term consequences [77].

Diagnostic criteria according to Androgen Excess-PCOS Society (2006)	Clinic and Biologic Symptoms	Long-Term Clinical Consequences
	Biochemical and clinical hyperandrogenism (hirsutism and acne)	Hirsutism
	Ovarian dysfunction (oligo-amenorrhea)	Infertility
	Polycystic ovary morphology	
	Insulin resistance/increased incidence of type 2 diabetes	Metabolic syndrome
	Increased incidence of cardiovascular disease	

PCOS pathophysiology is quite complex, and precise etiology remains to be elucidated. It results from environmental and genetic factors with a high degree of heritability. No single factor can fully explain the spectrum of abnormalities in PCOS; some studies reported that it might be related to longer telomere length in granulosa cells [75]. It has also been suggested that the persistent oxidative stress observed in PCOS may influence telomere homeostasis. Therefore, high inflammatory factors, especially reactive oxygen species, may increase telomeric attrition [80] and impair telomerase activity [81]. Telomere

shortening may be another mechanism associated with the pathogenesis of PCOS and its comorbidities. In response to gonadotrophin treatment, PCOS patients frequently develop many follicles, but these follicles often contain oocytes of small size and with a low rate of maturation (metaphase II). Moreover, metaphase II oocytes from PCOS patients frequently present an impaired competence. Since the interaction between oocyte and surrounding granulosa cells is crucial for the maturation and acquisition of oocyte competence, oocyte abnormalities could result from an impaired interaction between oocyte and granulosa cells and/or an insufficient proliferation of granulosa cells. Insofar as telomere length and telomerase activity play a major role in folliculogenesis, some authors propose that telomere disruption and limited activity of telomerase might be involved in the PCOS syndrome [82].

Studies on the relation between TL and PCOS are contradictory. Many have focused on the peripheral blood leukocytes of PCOS patients and reported shorter LTL [78,83]. However, tissue-specific TL dynamics can exist, especially in ovaries that express telomerase activity.

Recently, Pedrosa et al. [82] measured telomere length and telomerase activity in the ovarian cells of women with PCOS in comparison with women with regular menstrual cycles (control), who underwent in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection (IVF/ICSI). They found no difference in the telomere length of cumulus cells from PCOS and non-PCOS women. However, telomerase activity in cumulus cells was higher in the PCOS group. In the immature oocytes (germinative vesicle and metaphase I), telomere length and telomerase activity did not differ between the two groups. Interestingly, telomere length in leukocytes was shorter in PCOS patients than in controls. The authors proposed that telomere length in cumulus cells from PCOS patients might be maintained thanks to a higher telomerase activity [82]. Moreover, the authors reported a positive correlation between androgen levels and telomerase activity in cumulus cells and concluded that androgens stimulated telomerase [82]. The mechanism by which androgens stimulate telomerase activity could involve aromatization and be linked to $Er\alpha$, as proposed in hematopoietic cells [84]. The role of the high production of estrogen, characteristic of PCOS, is also very probable. Thus, androgens and estrogens contribute to telomere maintenance by increasing telomerase expression and activity.

Using a similar study design, Li et al. [85] found shorter granulosa cell TL but similar telomerase activity levels in PCOS patients. These observations suggest that the impact of other factors such as insulin resistance or oxidative stress on TL is important. However, the authors showed that patients with lower TA and shorter TL exhibited a longer duration of infertility and earlier onset of infertility symptoms [85]. This suggests that a reduction in TA in granulosa cells might be associated with ovarian function decline [57].

In contrast, Wei et al. [75] demonstrated significantly longer GTL in PCOS patients. This finding reinforced the possible impact of PCOS high hormone levels on telomere homeostasis [75]. Furthermore, as described above, higher telomerase activity is observed in the smallest preantral follicles, which are six times more abundant in PCOS ovaries than in other patients [47,72,86].

To conclude, the results of the different studies are controversial, and they are summarized in Table 2. Considering the variability of phenotypes associated with PCOS, many factors are implicated in the physiopathology of this syndrome. Although these studies demonstrate evidence of telomeric disruption in PCOS, the hyperandrogenism present in these women may compensate for the deleterious effect of the inflammatory state and metabolic disorders related to PCOS. To identify and clarify the implication of telomeric homeostasis in PCOS, further studies are required, with flawless methodology conducted on larger populations and using the most suitable method of TL measure.

Table 2. Studies measuring telomere length/telomerase activity in granulosa cells in PCOS.

Authors	Variable Measured/Method	Population No.	Population Age (Years)	Results
Li et al., 2017 [85]	GTL: PCR GTA: TRAP	(n = 65) PCOS (IVF) (n = 98) Non-PCOS (IVF)	30.3 ± 4.3 31.7 ± 3.8	GTL: shorter in PCOS GTA: no difference Earlier infertility symptoms when shorter TL and lower TA
Wei et al., 2017 [75]	GTL: PCR	(n = 75) PCOS (IVF) (n = 81) Non-PCOS (IVF)	28.36 ± 2.55 28.09 ± 2.26	GTL: longer in PCOS
Pedroso et al., 2020 [82]	GTL: PCR	(n = 43) PCOS (IVF) (n = 67) Non-PCOS (IVF)	33.7 ± 4.1	GTL: no difference GTA: higher in PCOS Similar TA and TL in GV and MI oocytes

GTL, granulosa telomere length; GTA, granulosa telomerase activity; IVF: *in vitro* fertilization; GV, germinal vesicle; MI, oocyte at the metaphase of the first meiosis division; TRAP, telomere repeat amplification protocol; PCR, polymerase chain reaction.

5. Premature Ovarian Failure

Premature ovarian failure (POF) is a clinical syndrome defined by loss of ovarian function before the age of 40 years. Its prevalence is about 1% [87]. Symptoms include menstrual disturbance (oligo or amenorrhea) with raised gonadotrophins and decreased estradiol. As a diagnosis criterion, the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) working group has suggested an oligo-amenorrhea of at least 4 months and FSH >25 IU/L twice, 4 weeks apart [88]. Currently, spontaneous pregnancy rates in women with idiopathic POF are low (between 5 and 10%), and there is no treatment to improve the chances of spontaneous conception [89]. The long-term consequences of POF are the same as menopause and include osteoporosis, cognitive dysfunction, urogenital symptoms, such as vaginal dryness, increased risk of cardiovascular and autoimmune disease, as well as all-cause mortality [90]. The symptoms and long-term consequences of POF are summarized in Table 3.

Short GTL and/or low GTA could limit the mitosis ability of granulosa cells and, therefore, impair oocyte competence, resulting in infertility since granulosa cells must divide intensely during follicular maturation [91–93].

Table 3. POF symptoms and long-term conditions [93].

	Clinic and Biologic Symptoms	Long-Term Clinical Consequences
	Ovarian dysfunction (Oligo-amenorrhea for at least 4 months)	Infertility
Diagnostic criteria according to ESHRE	Clinical estrogen deficiency (climacteric syndrome) and sex hormonal dysfunction with: elevated FSH level >25 IU/L on two occasions >4 weeks apart	Urogenital symptoms (vaginal dryness, irritation and itching, sexual disorders) Cognitive dysfunction (memory and concentration problems, increased risk of dementia) Autoimmunity (increased risk of autoimmune disease) Bone alteration (osteopenia, osteoporosis, and increased risk of fracture) Increased all-cause mortality

Several studies have focused on the potential correlation between telomere length and/or telomerase activity in granulosa cells in women with POF. Some authors have hypothesized the existence of a possible link between LTL and female fertility since TL are synchronized in somatic tissues at birth and that strong correlations subsist later in life [94].

The confirmation of their hypothesis would lead to a POF predictive marker, more easily available than GTL. Unfortunately, the results are contradictory [95–97].

Looking for an explanation for these contradictory results, some authors have investigated telomerase activity in ovaries: In 2000, Kinugawa et al. [98] demonstrated that telomerase is active in ovaries and its activity normally decreased with age and in POF patients with follicle depletion. Butts et al. [60] and Xu et al. [99] found shorter telomeres and a lower TA in the granulosa cells of POF women than in healthy controls. These studies suggest that short telomeres could be associated with a fertility decrease and a shorter window of reproductive lifespan [60,99]. The hypothesis is that short telomeres could limit the proliferation capacity of granulosa cells and, in doing so, induce POF. Moreover, lower telomerase activity in granulosa cells would compensate less for telomeric attrition, leading to a limitation in the cell proliferation required for correct follicle maturation [48,60,98,100].

In conclusion, shorter telomeres and lower telomerase activity in granulosa cells seem to be associated with premature ovarian failure. The results are shown in Table 4.

Table 4. Studies associating telomere length and telomerase activity in granulosa cells/ovaries with POF.

Authors	Method	Population	Population Age (Years)	Results
Kinugawa et al., 2000 [98]	TRAP	(n = 5) POF (n = 20) Controls	31.4 <38	Ovarian TA: lower level in POF
Butts et al., 2009 [60]	PCR TRAP	(n = 12) POF (n = 42) Controls	30–37 23–37	GTL: shorter in POF GTA: absence of TA is more frequent in POF
Xu et al., 2017 [99]	PCR TRAP	(n = 120) POF (n = 90) Controls	32.95 ± 4.27 29.98 ± 4.28	GTL: shorter in POF GTA: lower level in POF

GTL, granulosa telomere length; GTA, granulosa telomerase activity; POF, premature ovarian failure; TRAP, telomere repeat amplification protocol; PCR, polymerase chain reaction.

These parameters could be an early and reliable marker of the decline in ovarian function. However, these results should be confirmed with larger studies with more subjects and the most suitable method [93]. The extrapolation of leukocyte telomere length does not seem possible, perhaps because initial telomere length and telomerase activity in granulosa cells can be impacted by some acquired factors such as *in situ* or general oxidative stress.

6. Discussion

As commonly agreed, telomere length/telomerase activity is a crucial factor in the proliferation capacity of cells in a tissue. Gonadal tissues present specificities in both sexes; in men, telomerase is constitutively activated throughout life in spermatogonia, whereas in women, TA partially compensating for telomere shortening declines with age in ovaries. “Ovarian aging” is, therefore, greatly reliant on TA in granulosa cells.

Based on this hypothesis, the ovarian reserve of follicles appears the result of a complex function in which the follicle number at a time “t” depends on the pool of follicles established at the fifth month of intrauterine life, with the cumulative number of follicles disappearing monthly until the time “t.” If the pool of primordial follicles established during the first months of pregnancy seems more reliable to ovogonial telomere length and ovogonial telomerase activity, the kinetics of disappearance of follicles after birth seems dependent on the telomere length/telomerase activity in granulosa cells. Mathematical models were used to predict infertility with aging according to TL and TA in granulosa cells. Predicted infertility was associated with either low levels of telomerase activity and short telomeres in GCs or with cumulative exposure to oxidative stress [101,102]. The conclusion of these models is the important role of sustained ovarian TA to preserve fertility in aging. Interestingly, it was shown that telomerase activity in luteinized granulosa cells was positively associated with pregnancy rate during *in vitro* fertilization (IVF)

treatment [103]. Moreover, *TERT* SNPs are also associated with IVF outcomes [104]. In Dyskeratosis congenita (DKC), canonical human telomeropathy is characterized by low telomerase activity and short telomeres, and women display diminished ovarian reserves, as estimated by circulating levels of anti-Müllerian hormone [105] and impaired reproductive function [106]. These results are consistent with the hypothesis of granulosa telomerase activity as a potential mechanism to preserve fertility.

Although this theory appears confirmed by the studies of GTL and GTA in the case of POF, the results of studies provided in PCOS populations appear controversial. In PCOS, the initial ovarian reserve of primordial follicles is abnormally rich, but the proliferation capacity of granulosa cells is sometimes high, explaining the high rate of twoness in PCOS populations and an increased risk of ovarian cancer [107]. In contrast, the proliferation capacity of granulosa cells is probably sometimes diminished, explaining the high rate of small follicles with immature oocytes picked up after ovarian stimulation in the context of IVF. The variable expression of GTA could be explained by two major types of factors: on the one hand, high levels of estrogen and androgen, which increase telomerase activity via stimulation of the *TERT* promoter, and on the other hand, some factors such as oxidative stress, which are generated at a high level in PCOS patients, impair telomere length homeostasis or lead the cells to enter apoptosis via a non-canonical pathway, implying mitochondria dysfunction.

The impact of oxidative stress is probably major in cases of inflammatory disease of ovaries such as endometriosis with ovarian implants of endometrial tissue. In endometriosis, endometrial telomerase is abnormally activated because of the endogenous autonomous high estrogen secretion of endometrial cells linked to a constitutive abnormally stimulated aromatase [108]. This estrogen source stimulates the telomerase activity of endometrial cells, explaining the invasive and proliferative characteristics of these cells colonizing ovaries and targeting the inflammatory state at the origin of major oxidative stress. This oxidative stress strongly decreases TA in GCs [81] via NF- κ B pathways, finally impairing oocyte quality. Li et al. proposed that intrafollicular TNF- α might also downregulate TA and *TERT* expression via the NF- κ B pathway. Thus, special attention should be given to limit/avoid any situation leading to important oxidative stress in the ovaries.

As proposed by some authors, restoring ovarian activity could be obtained by inducing the apparition of new stem cells, inducing pluripotent stem cells (IPS) able to differentiate into oocytes, or stimulating the proliferation of existing ovarian cells [109] without increasing the risk of oncogenesis. Among the strategies to reactivate telomerase, the exposition of ovaries to four factors, identified by Yamanaka and Takahashi (Oct3/4, Sox2, c-Myc, and Klf4) [110], is often cited [109] since it appears sufficient to induce IPS. As presented above, c-Myc and Klf4 are known activators of TA [111,112] and could also reactivate dormant tissular stem cells. Animal experiments on telomerase activation have succeeded in increasing the longevity of mice without increasing the development of tumors [113]. Moreover, in aged telomerase-deficient mice, telomerase reactivation reversed tissue degeneration and allowed the restoration of animal fertility [114]. In humans, various regenerative assays have been provided. In some of them, platelet-rich plasma (PRP) has been used, restoring the proliferation capacity of dormant stem cells [115]. In some clinical trials, these therapeutics were implemented into routine clinical practice as a rejuvenating agent or to promote healing in dermatology, plastic surgery, dentistry, orthopedics, and, in a similar way, gynecology [116] in order to optimize IVF outcomes in POF patients. PRP contains many growth factors supporting the survey and proliferation of ovarian stem cells directly or indirectly through the activation of telomerase [117]. Nevertheless, by activating telomerase using either a genic therapy strategy or treatment, the risk of cancer seems a real threat [118].

Indeed, telomerase activity is found in all types of ovarian cancers [119,120]. Similar to the majority of telomerase-positive cancers, ovarian cancers display short TL and high TA [119]. Ovarian cancers originate from ovarian surface epithelial cells [121]. These cells are telomerase negative [120]. Telomerase activation is an early event in ovarian carcino-

genesis [57], and the association of TERT expression with inactivation of p53 and activation of the Ras, Bcl2, and c-myc pathways are critical in oncogenic transformation [121]. Interestingly, these genes are estrogen-responsive genes [122,123]. Ovarian carcinogenesis could originate from estrogen paracrine activity. Estrogen from the granulosa cell compartment could reach the epithelial cells, inducing telomerase activation and oncogenic transformation of the ovarian epithelium [124]. The levels of telomerase activity correlate with the severity and recurrence of ovarian cancers [125]. Recently, effective telomerase-molecular targeted therapy has been tested as an approach for the treatment of ovarian cancer [126].

The presence of the *TERT* promoter in a dense CG-rich CpG island suggests a role for methylation in the regulation of TERT expression [127]. In cows, an age-dependent decrease in the global methylation stage correlates with a decrease in telomerase activity and a decrease in the proliferation capacity of granulosa cells [55].

Recently, some dietary recommendations have been proposed to improve telomerase activity [128] through their antioxidative role and impact on promoter methylation. However, investigations to understand the expression and methylation pattern of TERT in human ovaries [129] do not agree with animal studies; the methylation levels of the human *TERT* promoter do not seem to correlate with the level of TA. Therefore, all dietary recommendations, such as the Mediterranean diet, show that nutrient-promoting DNA methylations have probably more impact on TA through their antioxidative role than through their ability to improve ovarian TA. Similarly, the last decade has seen a great of studies analyzing the possible relation between the Mediterranean diet and TL. Most of the studies showed an association of the Mediterranean diet with longer telomeres [130,131]. However, these were almost exclusively cross-sectional and correlational studies, making causal interpretation problematic [132]. Longitudinal studies and randomized controlled trials are very limited, and their results are inconclusive [133,134]. Therefore, dietary recommendations may have an effect on ovarian aging without a direct effect on TA activity or TL, probably through oxidative stress modulation.

During adult life, in addition to their proliferative role in granulosa cells, TERT and TERC seem to globally protect ovarian mitochondria from oxidative stress [35,36,41], indirectly promoting mitochondrial steroidogenesis and, especially, estrogen synthesis. A non-proliferative role of both subunits of telomerase appears similar to a complementary amplification loop of its proliferative function since estrogen upregulates TERT expression [135]. Furthermore, a similar non-proliferative role of telomerase subunits may directly protect oocytes through their mitochondria, playing a role in oocyte competence, especially with aging [136]. Age-dependent mtDNA instability and the accumulation of mtDNA mutations in the oocyte result in the alteration of oocyte competence. Mitochondrial TERT may protect oocytes from these effects by binding to mtDNA.

7. Conclusions (Abstract Figure)

In the field of female fertility, telomerase presents a special interest since the capacity for cell proliferation is at the heart of embryonic development, particularly in fetal oocyte proliferation and during adult life proliferation of granulosa cells. Classical telomerase proliferative activity is upregulated mainly by estrogens by activation of the promoter and downregulated by different agents of oxidative stress. Moreover, through their interaction with mitochondria, telomerase subunits can more subtly modulate oocyte competence. The hypothesis in which telomerase activity correlates with ovarian reserves of follicles and global female fertility appears confirmed by pathology, especially premature ovarian failure, which is characterized by a poor ovarian reserve and low TA. However, PCOS, which is associated with a rich ovarian reserve, does not always match with long granulosa telomere length and high ovarian TA, probably because of the implication of downstream regulators such as oxidative stress.

Improving ovarian TA has been explored as a very promising rejuvenation technique. Unfortunately, no activator agent is without risk of activation telomerase in dormant cancer cells. At best, we can hope to limit the loss of natural fertility or infertility linked

to a pathology by combating any factor jeopardizing the activity of telomerase. For this, hygiene of life and safe alimentation appear complementary to traditional strategies of fertility cryopreservation.

Author Contributions: Conceptualization, S.T., A.-J.F., and I.K.; writing—original draft preparation, S.T., A.-J.F., and I.K.; writing—review and editing, S.T., A.-J.F., S.N.T., A.B., J.-L.G., and I.K. S.T. and A.-J.F. contributed equally to this work. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the French PIA project Lorraine Université d’Excellence, which includes two University-Hospital Federation (FHU ARRIMAGE and CARTAGE), reference ANR-15-IDEX-04-LUE, the Investments for the Future program under grant agreement No ANR-15-RHU-0004.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. López-Otín, C.; Blasco, M.A.; Partridge, L.; Serrano, M.; Kroemer, G. The Hallmarks of Aging. *Cell* **2013**, *153*, 1194–1217. [\[CrossRef\]](#)
2. Greider, C.W.; Blackburn, E.H. Identification of a Specific Telomere Terminal Transferase Activity in Tetrahymena Extracts. *Cell* **1985**, *43*, 405–413. [\[CrossRef\]](#)
3. Blackburn, E.H.; Collins, K. Telomerase: An RNP Enzyme Synthesizes DNA. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Wright, W.E.; Piatyszek, M.A.; Rainey, W.E.; Byrd, W.; Shay, J.W. Telomerase Activity in Human Germline and Embryonic Tissues and Cells. *Dev. Genet.* **1996**, *18*, 173–179. [\[CrossRef\]](#)
5. Hiyama, E.; Hiyama, K. Telomere and Telomerase in Stem Cells. *Br. J. Cancer* **2007**, *96*, 1020–1024. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Shay, J.W.; Wright, W.E. Role of Telomeres and Telomerase in Cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2011**, *21*, 349–353. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Weng, N.P.; Levine, B.L.; June, C.H.; Hodes, R.J. Regulated Expression of Telomerase Activity in Human T Lymphocyte Development and Activation. *J. Exp. Med.* **1996**, *183*, 2471–2479. [\[CrossRef\]](#)
8. Shay, J.W.; Wright, W.E. Telomerase Activity in Human Cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **1996**, *8*, 66–71. [\[CrossRef\]](#)
9. Shay, J.W.; Wright, W.E. Telomeres and Telomerase: Implications for Cancer and Aging. *Radiat. Res.* **2001**, *155*, 188–193. [\[CrossRef\]](#)
10. Shay, J.W.; Bacchetti, S. A Survey of Telomerase Activity in Human Cancer. *Eur. J. Cancer* **1997**, *33*, 787–791. [\[CrossRef\]](#)
11. Feng, J.; Funk, W.D.; Wang, S.S.; Weinrich, S.L.; Avilion, A.A.; Chiu, C.P.; Adams, R.R.; Chang, E.; Allsopp, R.C.; Yu, J. The RNA Component of Human Telomerase. *Science* **1995**, *269*, 1236–1241. [\[CrossRef\]](#)
12. Shay, J.W.; Wright, W.E. Telomeres and Telomerase: Three Decades of Progress. *Nat. Rev. Genet.* **2019**, *20*, 299–309. [\[CrossRef\]](#)
13. Weinrich, S.L.; Pruzan, R.; Ma, L.; Ouellette, M.; Tesmer, V.M.; Holt, S.E.; Bodnar, A.G.; Lichtsteiner, S.; Kim, N.W.; Trager, J.B.; et al. Reconstitution of Human Telomerase with the Template RNA Component HTR and the Catalytic Protein Subunit HTRT. *Nat. Genet.* **1997**, *17*, 498–502. [\[CrossRef\]](#)
14. Wu, R.A.; Upton, H.E.; Vogan, J.M.; Collins, K. Telomerase Mechanism of Telomere Synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 439–460. [\[CrossRef\]](#)
15. Mitchell, J.R.; Wood, E.; Collins, K. A Telomerase Component Is Defective in the Human Disease Dyskeratosis Congenita. *Nature* **1999**, *402*, 551–555. [\[CrossRef\]](#)
16. Egan, E.D.; Collins, K. Biogenesis of Telomerase Ribonucleoproteins. *RNA* **2012**, *18*, 1747–1759. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Holt, S.E.; Aisner, D.L.; Baur, J.; Tesmer, V.M.; Dy, M.; Ouellette, M.; Trager, J.B.; Morin, G.B.; Toft, D.O.; Shay, J.W.; et al. Functional Requirement of P23 and Hsp90 in Telomerase Complexes. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 817–826. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Venteicher, A.S.; Abreu, E.B.; Meng, Z.; McCann, K.E.; Terns, R.M.; Veenstra, T.D.; Terns, M.P.; Artandi, S.E. A Human Telomerase Holoenzyme Protein Required for Cajal Body Localization and Telomere Synthesis. *Science* **2009**, *323*, 644–648. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Trinkle-Mulcahy, L.; Sleeman, J.E. The Cajal Body and the Nucleolus: “In a Relationship” or “It’s Complicated”? *RNA Biol.* **2017**, *14*, 739–751. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Tomlinson, R.L.; Ziegler, T.D.; Supakorndej, T.; Terns, R.M.; Terns, M.P. Cell Cycle-Regulated Trafficking of Human Telomerase to Telomeres. *Mol. Biol. Cell* **2006**, *17*, 955–965. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Wu, P.; De Lange, T. Human Telomerase Caught in the Act. *Cell* **2009**, *138*, 432–434. [\[CrossRef\]](#)
22. Zhao, Y.; Sfeir, A.J.; Zou, Y.; Buseman, C.M.; Chow, T.T.; Shay, J.W.; Wright, W.E. Telomere Extension Occurs at Most Chromosome Ends and Is Uncoupled from Fill-in in Human Cancer Cells. *Cell* **2009**, *138*, 463–475. [\[CrossRef\]](#)
23. Teixeira, M.T.; Arneric, M.; Sperisen, P.; Lingner, J. Telomere Length Homeostasis Is Achieved via a Switch between Telomerase-Extendible and -Nonextendible States. *Cell* **2004**, *117*, 323–335. [\[CrossRef\]](#)

24. Greider, C.W. Regulating Telomere Length from the inside out: The Replication Fork Model. *Genes Dev.* **2016**, *30*, 1483–1491. [\[CrossRef\]](#)
25. Ségal-Bendirdjian, E.; Geli, V. Non-Canonical Roles of Telomerase: Unraveling the Imbroglio. *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Lindvall, C.; Hou, M.; Komurasaki, T.; Zheng, C.; Henriksson, M.; Sedivy, J.M.; Björkholm, M.; Teh, B.T.; Nordenskjöld, M.; Xu, D. Molecular Characterization of Human Telomerase Reverse Transcriptase-Immortalized Human Fibroblasts by Gene Expression Profiling: Activation of the Epiregulin Gene. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 1743–1747.
27. Ghosh, A.; Saginc, G.; Leow, S.C.; Khattar, E.; Shin, E.M.; Yan, T.D.; Wong, M.; Zhang, Z.; Li, G.; Sung, W.-K.; et al. Telomerase Directly Regulates NF- κ B-Dependent Transcription. *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 1270–1281. [\[CrossRef\]](#)
28. Park, J.-I.; Venteicher, A.S.; Hong, J.Y.; Choi, J.; Jun, S.; Shkrel, M.; Chang, W.; Meng, Z.; Cheung, P.; Ji, H.; et al. Telomerase Modulates Wnt Signalling by Association with Target Gene Chromatin. *Nature* **2009**, *460*, 66–72. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Liu, Z.; Li, Q.; Li, K.; Chen, L.; Li, W.; Hou, M.; Liu, T.; Yang, J.; Lindvall, C.; Björkholm, M.; et al. Telomerase Reverse Transcriptase Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Stem Cell-like Traits in Cancer Cells. *Oncogene* **2013**, *32*, 4203–4213. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Zhou, L.; Zheng, D.; Wang, M.; Cong, Y.-S. Telomerase Reverse Transcriptase Activates the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Independent of Telomerase Activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *386*, 739–743. [\[CrossRef\]](#)
31. Liu, N.; Ding, D.; Hao, W.; Yang, F.; Wu, X.; Wang, M.; Xu, X.; Ju, Z.; Liu, J.-P.; Song, Z.; et al. HTER Promotes Tumor Angiogenesis by Activating VEGF via Interactions with the Sp1 Transcription Factor. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 8693–8703. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Yu, J.; Yuan, X.; Sjöholm, L.; Liu, T.; Kong, F.; Ekström, T.J.; Björkholm, M.; Xu, D. Telomerase Reverse Transcriptase Regulates DNMT3B Expression/Aberrant DNA Methylation Phenotype and AKT Activation in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Lett.* **2018**, *434*, 33–41. [\[CrossRef\]](#)
33. Young, J.I.; Sedivy, J.M.; Smith, J.R. Telomerase Expression in Normal Human Fibroblasts Stabilizes DNA 5-Methylcytosine Transferase. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 19904–19908. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Santos, J.H.; Meyer, J.N.; Van Houten, B. Mitochondrial Localization of Telomerase as a Determinant for Hydrogen Peroxide-Induced Mitochondrial DNA Damage and Apoptosis. *Hum. Mol. Genet.* **2006**, *15*, 1757–1768. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Ahmed, S.; Passos, J.F.; Birket, M.J.; Beckmann, T.; Brings, S.; Peters, H.; Birch-Machin, M.A.; von Zglinicki, T.; Saretzki, G. Telomerase Does Not Counteract Telomere Shortening but Protects Mitochondrial Function under Oxidative Stress. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 1046–1053. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Haendeler, J.; Dröse, S.; Büchner, N.; Jakob, S.; Altschmied, J.; Goy, C.; Spyridopoulos, I.; Zeiher, A.M.; Brandt, U.; Dimmeler, S. Mitochondrial Telomerase Reverse Transcriptase Binds to and Protects Mitochondrial DNA and Function from Damage. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2009**, *29*, 929–935. [\[CrossRef\]](#)
37. Indran, I.R.; Hande, M.P.; Pervaiz, S. HTER Overexpression Alleviates Intracellular ROS Production, Improves Mitochondrial Function, and Inhibits ROS-Mediated Apoptosis in Cancer Cells. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 266–276. [\[CrossRef\]](#)
38. Santos, J.H.; Meyer, J.N.; Skorvaga, M.; Annab, L.A.; Houten, B.V. Mitochondrial HTER Exacerbates Free-Radical-Mediated MtDNA Damage. *Aging Cell* **2004**, *3*, 399–411. [\[CrossRef\]](#)
39. Shin, W.H.; Chung, K.C. Human Telomerase Reverse Transcriptase Positively Regulates Mitophagy by Inhibiting the Processing and Cytoplasmic Release of Mitochondrial PINK1. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*, 425. [\[CrossRef\]](#)
40. Cheng, Y.; Liu, P.; Zheng, Q.; Gao, G.; Yuan, J.; Wang, P.; Huang, J.; Xie, L.; Lu, X.; Tong, T.; et al. Mitochondrial Trafficking and Processing of Telomerase RNA TERC. *Cell Rep.* **2018**, *24*, 2589–2595. [\[CrossRef\]](#)
41. Zheng, Q.; Liu, P.; Gao, G.; Yuan, J.; Wang, P.; Huang, J.; Xie, L.; Lu, X.; Di, F.; Tong, T.; et al. Mitochondrion-Processed TERC Regulates Senescence without Affecting Telomerase Activities. *Protein Cell* **2019**, *10*, 631–648. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Baker, T.G. A Quantitative And Cytological Study Of Germ Cells In Human Ovaries. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **1963**, *158*, 417–433. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Pepling, M.E. Follicular Assembly: Mechanisms of Action. *Reprod. Camb. Engl.* **2012**, *143*, 139–149. [\[CrossRef\]](#)
44. Keefe, D.L.; Marquard, K.; Liu, L. The Telomere Theory of Reproductive Senescence in Women. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **2006**, *18*, 280–285. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Gougeon, A. Ovarian Follicular Growth in Humans: Ovarian Ageing and Population of Growing Follicles. *Maturitas* **1998**, *30*, 137–142. [\[CrossRef\]](#)
46. Rodgers, R.J.; Irving-Rodgers, H.F. Morphological Classification of Bovine Ovarian Follicles. *Reprod. Camb. Engl.* **2010**, *139*, 309–318. [\[CrossRef\]](#)
47. Lavranos, T.C.; Mathis, J.M.; Latham, S.E.; Kalionis, B.; Shay, J.W.; Rodgers, R.J. Evidence for Ovarian Granulosa Stem Cells: Telomerase Activity and Localization of the Telomerase Ribonucleic Acid Component in Bovine Ovarian Follicles. *Biol. Reprod.* **1999**, *61*, 358–366. [\[CrossRef\]](#)
48. Kosebent, E.G.; Uysal, F.; Ozturk, S. Telomere Length and Telomerase Activity during Folliculogenesis in Mammals. *J. Reprod. Dev.* **2018**, *64*, 477–484. [\[CrossRef\]](#)
49. Cleément, F.; Gruet, M.A.; Monget, P.; Terqui, M.; Jolivet, E.; Monniaux, D. Growth Kinetics of the Granulosa Cell Population in Ovarian Follicles: An Approach by Mathematical Modelling. *Cell Prolif.* **1997**, *30*, 255–270. [\[CrossRef\]](#)

50. Van Deerlin, P.G.; Cekleniak, N.; Coutifaris, C.; Boyd, J.; Strauss, J.F. Evidence for the Oligoclonal Origin of the Granulosa Cell Population of the Mature Human Follicle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1997**, *82*, 3019–3024. [\[CrossRef\]](#)
51. Kossowska-Tomaszczuk, K.; De Geyter, C. Cells with Stem Cell Characteristics in Somatic Compartments of the Ovary. *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 1–8. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Slack, J.M.W. What Is a Stem Cell? *WIREs Dev. Biol.* **2018**, *7*, e323. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Lavranos, T.C. Anchorage-Independent Culture of Bovine Granulosa Cells: The Effects of Basic Fibroblast Growth Factor and Dibutylryl CAMP on Cell Division and Differentiation. *Exp. Cell Res.* **1994**, *211*, 245–251. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Kossowska-Tomaszczuk, K.; Geyter, C.D.; Geyter, M.D.; Martin, I.; Holzgreve, W.; Scherberich, A.; Zhang, H. The Multipotency of Luteinizing Granulosa Cells Collected from Mature Ovarian Follicles. *Stem Cells* **2009**, *27*, 210–219. [\[CrossRef\]](#)
55. Goto, H.; Iwata, H.; Takeo, S.; Nisinono, K.; Murakami, S.; Monji, Y.; Kuwayama, T. Effect of Bovine Age on the Proliferative Activity, Global DNA Methylation, Relative Telomere Length and Telomerase Activity of Granulosa Cells. *Zygote Camb. Engl.* **2013**, *21*, 256–264. [\[CrossRef\]](#)
56. Russo, V.; Berardinelli, P.; Martelli, A.; Giacinto, O.D.; Nardinocchi, D.; Fantasia, D.; Barboni, B. Expression of Telomerase Reverse Transcriptase Subunit (TERT) and Telomere Sizing in Pig Ovarian Follicles. *J. Histochem. Cytochem.* **2006**, *54*, 443–455. [\[CrossRef\]](#)
57. Liu, J.-P.; Li, H. Telomerase in the Ovary. *Reprod. Camb. Engl.* **2010**, *140*, 215–222. [\[CrossRef\]](#)
58. Rodgers, R.J.; Irving-Rodgers, H.F.; van Wezel, L.L.; Krupa, M.; Lavranos, T.C. Dynamics of the Membrana Granulosa during Expansion of the Ovarian Follicular Antrum. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2001**, *171*, 41–48. [\[CrossRef\]](#)
59. Tománek, M.; Chronowska, E.; Kott, T.; Czerneková, V. Telomerase Activity in Pig Granulosa Cells Proliferating and Differentiating in Vitro. *Anim. Reprod. Sci.* **2008**, *104*, 284–298. [\[CrossRef\]](#)
60. Butts, S.; Riethman, H.; Ratcliffe, S.; Shaunik, A.; Coutifaris, C.; Barnhart, K. Correlation of Telomere Length and Telomerase Activity with Occult Ovarian Insufficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2009**, *94*, 4835–4843. [\[CrossRef\]](#)
61. Kosebent, E.G.; Uysal, F.; Ozturk, S. The Altered Expression of Telomerase Components and Telomere-Linked Proteins May Associate with Ovarian Aging in Mouse. *Exp. Gerontol.* **2020**, *138*, 110975. [\[CrossRef\]](#)
62. Uysal, F.; Kosebent, E.G.; Toru, H.S.; Ozturk, S. Decreased Expression of TERT and Telomeric Proteins as Human Ovaries Age May Cause Telomere Shortening. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2021**, *38*, 429–441. [\[CrossRef\]](#)
63. Gardner, M.; Bann, D.; Wiley, L.; Cooper, R.; Hardy, R.; Nitsch, D.; Martin-Ruiz, C.; Shiels, P.; Sayer, A.A.; Barbieri, M.; et al. Gender and Telomere Length: Systematic Review and Meta-Analysis. *Exp. Gerontol.* **2014**, *51*, 15–27. [\[CrossRef\]](#)
64. Mayer, S.; Bröderlein, S.; Perner, S.; Waibel, I.; Holdenried, A.; Ciloglu, N.; Hasel, C.; Mattfeldt, T.; Nielsen, K.V.; Möller, P. Sex-Specific Telomere Length Profiles and Age-Dependent Erosion Dynamics of Individual Chromosome Arms in Humans. *Cytogenet. Genome Res.* **2006**, *112*, 194–201. [\[CrossRef\]](#)
65. Lulkiewicz, M.; Bajsert, J.; Kopczynski, P.; Barczak, W.; Rubis, B. Telomere Length: How the Length Makes a Difference. *Mol. Biol. Rep.* **2020**, *47*, 7181–7188. [\[CrossRef\]](#)
66. Chen, W.; Kimura, M.; Kim, S.; Cao, X.; Srinivasan, S.R.; Berenson, G.S.; Kark, J.D.; Aviv, A. Longitudinal versus Cross-Sectional Evaluations of Leukocyte Telomere Length Dynamics: Age-Dependent Telomere Shortening Is the Rule. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2011**, *66*, 312–319. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Dalgård, C.; Benetos, A.; Verhulst, S.; Labat, C.; Kark, J.D.; Christensen, K.; Kimura, M.; Kyvik, K.O.; Aviv, A. Leukocyte Telomere Length Dynamics in Women and Men: Menopause vs. Age Effects. *Int. J. Epidemiol.* **2015**, *44*, 1688–1695. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
68. Factor-Litvak, P.; Susser, E.; Kezios, K.; McKeague, I.; Kark, J.D.; Hoffman, M.; Kimura, M.; Wapner, R.; Aviv, A. Leukocyte Telomere Length in Newborns: Implications for the Role of Telomeres in Human Disease. *Pediatrics* **2016**, *137*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Piontkewitz, Y.; Sundfeldt, K.; Hedin, L. The Expression of C-Myc during Follicular Growth and Luteal Formation in the Rat Ovary in Vivo. *J. Endocrinol.* **1997**, *152*, 395–406. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
70. Bayne, S.; Jones, M.E.E.; Li, H.; Liu, J.-P. Potential Roles for Estrogen Regulation of Telomerase Activity in Aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1114*, 48–55. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
71. Viña, J.; Borrás, C.; Gambini, J.; Sastre, J.; Pallardó, F.V. Why Females Live Longer than Males? Importance of the Upregulation of Longevity-Associated Genes by Oestrogenic Compounds. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 2541–2545. [\[CrossRef\]](#)
72. Yamagata, Y.; Nakamura, Y.; Umayahara, K.; Harada, A.; Takayama, H.; Sugino, N.; Kato, H. Changes in Telomerase Activity in Experimentally Induced Atretic Follicles of Immature Rats. *Endocr. J.* **2002**, *49*, 589–595. [\[CrossRef\]](#)
73. Bayne, S.; Li, H.; Jones, M.E.E.; Pinto, A.R.; van Sinderen, M.; Drummond, A.; Simpson, E.R.; Liu, J.-P. Estrogen Deficiency Reversibly Induces Telomere Shortening in Mouse Granulosa Cells and Ovarian Aging in Vivo. *Protein Cell* **2011**, *2*, 333–346. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Mordechai, A.; Wasserman, M.; Abramov, M.; Ben-Menahem, D.; Har-Vardi, I.; Levitas, E.; Priel, E. Increasing Telomerase Enhanced Steroidogenic Genes Expression and Steroid Hormones Production in Rat and Human Granulosa Cells and in Mouse Ovary. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2020**, *197*, 105551. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Wei, D.; Xie, J.; Yin, B.; Hao, H.; Song, X.; Liu, Q.; Zhang, C.; Sun, Y. Significantly Lengthened Telomere in Granulosa Cells from Women with Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS). *J. Assist. Reprod. Genet.* **2017**, *34*, 861–866. [\[CrossRef\]](#)
76. Dunaif, A. Insulin Resistance and the Polycystic Ovary Syndrome: Mechanism and Implications for Pathogenesis. *Endocr. Rev.* **1997**, *18*, 774–800. [\[CrossRef\]](#)

77. Ajmal, N.; Khan, S.Z.; Shaikh, R. Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) and Genetic Predisposition: A Review Article. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. X* **2019**, *3*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
78. Li, Q.; Du, J.; Feng, R.; Xu, Y.; Wang, H.; Sang, Q.; Xing, Q.; Zhao, X.; Jin, L.; He, L.; et al. A Possible New Mechanism in the Pathophysiology of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Discovery That Leukocyte Telomere Length Is Strongly Associated with PCOS. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2014**, *99*, E234–E240. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
79. Mohammadi, M. Oxidative Stress and Polycystic Ovary Syndrome: A Brief Review. *Int. J. Prev. Med.* **2019**, *10*, 86. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
80. Pedroso, D.C.C.; Miranda-Furtado, C.L.; Kogure, G.S.; Meola, J.; Okuka, M.; Silva, C.; Calado, R.T.; Ferriani, R.A.; Keefe, D.L.; dos Reis, R.M. Inflammatory Biomarkers and Telomere Length in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Fertil. Steril.* **2015**, *103*, 542–547.e2. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
81. Li, Y.; Li, R.; Ouyang, N.; Dai, K.; Yuan, P.; Zheng, L.; Wang, W. Investigating the Impact of Local Inflammation on Granulosa Cells and Follicular Development in Women with Ovarian Endometriosis. *Fertil. Steril.* **2019**, *112*, 882–891.e1. [\[CrossRef\]](#)
82. Pedroso, D.C.C.; Santana, V.P.; Donaires, F.S.; Picinato, M.C.; Giorgenson, R.C.; Santana, B.A.; Pimentel, R.N.; Keefe, D.L.; Calado, R.T.; Ferriani, R.A.; et al. Telomere Length and Telomerase Activity in Immature Oocytes and Cumulus Cells of Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Reprod. Sci. Thousand Oaks Calif.* **2020**, *27*, 1293–1303. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Vasilopoulos, E.; Fragkiadaki, P.; Kalliora, C.; Fragou, D.; Docea, A.O.; Vakonaki, E.; Tsoukalas, D.; Calina, D.; Buga, A.M.; Georgiadis, G.; et al. The Association of Female and Male Infertility with Telomere Length (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2019**, *44*, 375–389. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Calado, R.T.; Yewdell, W.T.; Wilkerson, K.L.; Regal, J.A.; Kajigaya, S.; Stratakis, C.A.; Young, N.S. Sex Hormones, Acting on the TERT Gene, Increase Telomerase Activity in Human Primary Hematopoietic Cells. *Blood* **2009**, *114*, 2236–2243. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. Li, Y.; Deng, B.; Ouyang, N.; Yuan, P.; Zheng, L.; Wang, W. Telomere Length Is Short in PCOS and Oral Contraceptive Does Not Affect the Telomerase Activity in Granulosa Cells of Patients with PCOS. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2017**, *34*, 849–859. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
86. Webber, L.J.; Stubbs, S.; Stark, J.; Trew, G.H.; Margara, R.; Hardy, K.; Franks, S. Formation and Early Development of Follicles in the Polycystic Ovary. *Lancet Lond. Engl.* **2003**, *362*, 1017–1021. [\[CrossRef\]](#)
87. Beck-Peccoz, P.; Persani, L. Premature Ovarian Failure. *Orphanet. J. Rare Dis.* **2006**, *1*, 9. [\[CrossRef\]](#)
88. European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guideline Group on POI; Webber, L.; Davies, M.; Anderson, R.; Bartlett, J.; Braat, D.; Cartwright, B.; Cifkova, R.; de Muinck Keizer-Schrama, S.; Hogervorst, E.; et al. ESHRE Guideline: Management of Women with Premature Ovarian Insufficiency. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **2016**, *31*, 926–937. [\[CrossRef\]](#)
89. Committee on Gynecologic Practice Committee Opinion No. 605: Primary Ovarian Insufficiency in Adolescents and Young Women. *Obstet. Gynecol.* **2014**, *124*, 193–197. [\[CrossRef\]](#)
90. Podfigurna-Stopa, A.; Czyzyk, A.; Grymowicz, M.; Smolarczyk, R.; Katulski, K.; Czajkowski, K.; Meczekalski, B. Premature Ovarian Insufficiency: The Context of Long-Term Effects. *J. Endocrinol. Investig.* **2016**, *39*, 983–990. [\[CrossRef\]](#)
91. Rocca, M.S.; Foresta, C.; Ferlin, A. Telomere Length: Lights and Shadows on Their Role in Human Reproduction. *Biol. Reprod.* **2019**, *100*, 305–317. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
92. Ozturk, S.; Sozen, B.; Demir, N. Telomere Length and Telomerase Activity during Oocyte Maturation and Early Embryo Development in Mammalian Species. *Mol. Hum. Reprod.* **2014**, *20*, 15–30. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
93. Fattet, A.-J.; Toupance, S.; Thornton, S.N.; Monnin, N.; Guéant, J.-L.; Benetos, A.; Kosciński, I. Telomere Length in Granulosa Cells and Leukocytes: A Potential Marker of Female Fertility? A Systematic Review of the Literature. *J. Ovarian Res.* **2020**, *13*, 96. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
94. Daniali, L.; Benetos, A.; Susser, E.; Kark, J.D.; Labat, C.; Kimura, M.; Desai, K.; Granick, M.; Aviv, A. Telomeres Shorten at Equivalent Rates in Somatic Tissues of Adults. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1597. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
95. Hanna, C.W.; Bretherick, K.L.; Gair, J.L.; Fluker, M.R.; Stephenson, M.D.; Robinson, W.P. Telomere Length and Reproductive Aging. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **2009**, *24*, 1206–1211. [\[CrossRef\]](#)
96. Miranda-Furtado, C.L.; Luchiari, H.R.; Chielli Pedroso, D.C.; Kogure, G.S.; Caetano, L.C.; Santana, B.A.; Santana, V.P.; Benetti-Pinto, C.L.; Reis, F.M.; Maciel, M.A.; et al. Skewed X-Chromosome Inactivation and Shorter Telomeres Associate with Idiopathic Premature Ovarian Insufficiency. *Fertil. Steril.* **2018**, *110*, 476–485.e1. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
97. Sayban, S.; Mirfakhraie, R.; Omrani, M.D.; Ghaedi, H.; Heidary, H.; Yaghoobi, H.; Azizi, F.; Pouresmaeili, F. Idiopathic Premature Ovarian Failure and Its Association to the Abnormal Longitudinal Changes of Telomere Length in a Population of Iranian Infertile Women: A Pilot Study. *Meta Gene* **2018**, *18*, 58–61. [\[CrossRef\]](#)
98. Kinugawa, C.; Murakami, T.; Okamura, K.; Yajima, A. Telomerase Activity in Normal Ovaries and Premature Ovarian Failure. *Tohoku J. Exp. Med.* **2000**, *190*, 231–238. [\[CrossRef\]](#)
99. Xu, X.; Chen, X.; Zhang, X.; Liu, Y.; Wang, Z.; Wang, P.; Du, Y.; Qin, Y.; Chen, Z.-J. Impaired Telomere Length and Telomerase Activity in Peripheral Blood Leukocytes and Granulosa Cells in Patients with Biochemical Primary Ovarian Insufficiency. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **2017**, *32*, 201–207. [\[CrossRef\]](#)
100. Liu, C.C.; Ma, D.L.; Yan, T.-D.; Fan, X.; Poon, Z.; Poon, L.-F.; Goh, S.-A.; Rozen, S.G.; Hwang, W.Y.K.; Tergaonkar, V.; et al. Distinct Responses of Stem Cells to Telomere Uncapping—A Potential Strategy to Improve the Safety of Cell Therapy. *Stem Cells* **2016**, *34*, 2471–2484. [\[CrossRef\]](#)

101. Portillo, A.M.; Varela, E.; García-Velasco, J.A. Mathematical Model to Study the Aging of the Human Follicle According to the Telomerase Activity. *J. Theor. Biol.* **2019**, *462*, 446–454. [\[CrossRef\]](#)
102. Portillo, A.M.; Peláez, C. Mathematical Modelling of Ageing Acceleration of the Human Follicle Due to Oxidative Stress and Other Factors. *Math. Med. Biol. J. IMA* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
103. Chen, H.; Wang, W.; Mo, Y.; Ma, Y.; Ouyang, N.; Li, R.; Mai, M.; He, Y.; Bodombossou-Djobo, M.M.A.; Yang, D. Women with High Telomerase Activity in Luteinised Granulosa Cells Have a Higher Pregnancy Rate during in Vitro Fertilisation Treatment. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2011**, *28*, 797–807. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
104. Dai, K.; Xu, H.; Ouyang, N.; Li, Y.; Yuan, P.; Wang, L.; Zhao, X.; Wang, W. Correlation of Human Telomerase Reverse Transcriptase Single Nucleotide Polymorphisms with in Vitro Fertilisation Outcomes. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2019**, *36*, 517–527. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
105. Sklavos, M.M.; Stratton, P.; Giri, N.; Alter, B.P.; Savage, S.A.; Pinto, L.A. Reduced Serum Levels of Anti-Müllerian Hormone in Females with Inherited Bone Marrow Failure Syndromes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2015**, *100*, E197–E203. [\[CrossRef\]](#)
106. Robinson, L.G.; Pimentel, R.; Wang, F.; Kramer, Y.G.; Gonullu, D.C.; Agarwal, S.; Navarro, P.A.; McCulloh, D.; Keefe, D.L. Impaired Reproductive Function and Fertility Preservation in a Woman with a Dyskeratosis Congenita. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2020**, *37*, 1221–1225. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
107. Barry, J.A.; Azizia, M.M.; Hardiman, P.J. Risk of Endometrial, Ovarian and Breast Cancer in Women with Polycystic Ovary Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Hum. Reprod. Update* **2014**, *20*, 748–758. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
108. Hapangama, D.K.; Turner, M.A.; Drury, J.A.; Quenby, S.; Saretzki, G.; Martin-Ruiz, C.; Von Zglinicki, T. Endometriosis Is Associated with Aberrant Endometrial Expression of Telomerase and Increased Telomere Length. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **2008**, *23*, 1511–1519. [\[CrossRef\]](#)
109. Polonio, A.M.; Chico-Sordo, L.; Córdova-Oriz, I.; Medrano, M.; García-Velasco, J.A.; Varela, E. Impact of Ovarian Aging in Reproduction: From Telomeres and Mice Models to Ovarian Rejuvenation. *Yale J. Biol. Med.* **2020**, *93*, 561–569.
110. Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **2006**, *126*, 663–676. [\[CrossRef\]](#)
111. Wang, J.; Xie, L.Y.; Allan, S.; Beach, D.; Hannon, G.J. Myc Activates Telomerase. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 1769–1774. [\[CrossRef\]](#)
112. Wong, C.-W.; Hou, P.-S.; Tseng, S.-F.; Chien, C.-L.; Wu, K.-J.; Chen, H.-F.; Ho, H.-N.; Kyo, S.; Teng, S.-C. Krüppel-like Transcription Factor 4 Contributes to Maintenance of Telomerase Activity in Stem Cells. *Stem Cells* **2010**, *28*, 1510–1517. [\[CrossRef\]](#)
113. Bernardes de Jesus, B.; Vera, E.; Schneeberger, K.; Tejera, A.M.; Ayuso, E.; Bosch, F.; Blasco, M.A. Telomerase Gene Therapy in Adult and Old Mice Delays Aging and Increases Longevity without Increasing Cancer. *EMBO Mol. Med.* **2012**, *4*, 691–704. [\[CrossRef\]](#)
114. Jaskelioff, M.; Muller, F.L.; Paik, J.-H.; Thomas, E.; Jiang, S.; Adams, A.C.; Sahin, E.; Kost-Alimova, M.; Protopopov, A.; Cadiñanos, J.; et al. Telomerase Reactivation Reverses Tissue Degeneration in Aged Telomerase-Deficient Mice. *Nature* **2011**, *469*, 102–106. [\[CrossRef\]](#)
115. Bretschneider, H.; Quade, M.; Lode, A.; Gelinsky, M.; Rammelt, S.; Zwingenberger, S.; Schaser, K.-D.; Vater, C. Characterization of Naturally Occurring Bioactive Factor Mixtures for Bone Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1412. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
116. Cakiroglu, Y.; Saltik, A.; Yuceturk, A.; Karaosmanoglu, O.; Kopuk, S.Y.; Scott, R.T.; Tiras, B.; Seli, E. Effects of Intraovarian Injection of Autologous Platelet Rich Plasma on Ovarian Reserve and IVF Outcome Parameters in Women with Primary Ovarian Insufficiency. *Aging* **2020**, *12*, 10211–10222. [\[CrossRef\]](#)
117. Sills, E.S.; Wood, S.H. Autologous Activated Platelet-Rich Plasma Injection into Adult Human Ovary Tissue: Molecular Mechanism, Analysis, and Discussion of Reproductive Response. *Biosci. Rep.* **2019**, *39*. [\[CrossRef\]](#)
118. Shingu, T.; Jaskelioff, M.; Yuan, L.; Ding, Z.; Protopopov, A.; Kost-Alimova, M.; Hu, J. Utilizing Murine Inducible Telomerase Alleles in the Studies of Tissue Degeneration/Regeneration and Cancer. *J. Vis. Exp. JoVE* **2015**. [\[CrossRef\]](#)
119. Counter, C.M.; Hirte, H.W.; Bacchetti, S.; Harley, C.B. Telomerase Activity in Human Ovarian Carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 2900–2904. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
120. Baykal, A.; Thompson, J.A.; Xu, X.-C.; Hahn, W.C.; Deavers, M.T.; Malpica, A.; Gershenson, D.M.; Silva, E.G.; Liu, J. In Situ Human Telomerase Reverse Transcriptase Expression Pattern in Normal and Neoplastic Ovarian Tissues. *Oncol. Rep.* **2004**, *11*, 297–302. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
121. Sasaki, R.; Narisawa-Saito, M.; Yugawa, T.; Fujita, M.; Tashiro, H.; Katabuchi, H.; Kiyono, T. Oncogenic Transformation of Human Ovarian Surface Epithelial Cells with Defined Cellular Oncogenes. *Carcinogenesis* **2009**, *30*, 423–431. [\[CrossRef\]](#)
122. Osborne, C.K.; Schiff, R. Estrogen-Receptor Biology: Continuing Progress and Therapeutic Implications. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 1616–1622. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
123. Li, Y.F.; Hu, W.; Fu, S.Q.; Li, J.D.; Liu, J.H.; Kavanagh, J.J. Aromatase Inhibitors in Ovarian Cancer: Is There a Role? *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.* **2008**, *18*, 600–614. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
124. Li, H.; Simpson, E.R.; Liu, J.-P. Oestrogen, Telomerase, Ovarian Ageing and Cancer. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2010**, *37*, 78–82. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
125. Losi, L.; Botticelli, L.; Garagnani, L.; Fabbiani, L.; Panini, R.; Gallo, G.; Sabbatini, R.; Maiorana, A.; Benhattar, J. TERT Promoter Methylation and Protein Expression as Predictive Biomarkers for Recurrence Risk in Patients with Serous Borderline Ovarian Tumours. *Pathology* **2021**, *53*, 187–192. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

126. Ghareghomi, S.; Ahmadian, S.; Zarghami, N.; Hemmati, S. HTERT-Molecular Targeted Therapy of Ovarian Cancer Cells via Folate-Functionalized PLGA Nanoparticles Co-Loaded with MNPs/SiRNA/Wortmannin. *Life Sci.* **2021**, *277*, 119621. [\[CrossRef\]](#)
127. Devereux, T.R.; Horikawa, I.; Anna, C.H.; Annab, L.A.; Afshari, C.A.; Barrett, J.C. DNA Methylation Analysis of the Promoter Region of the Human Telomerase Reverse Transcriptase (HTERT) Gene. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 6087–6090.
128. Boccardi, V.; Paolisso, G.; Mecocci, P. Nutrition and Lifestyle in Healthy Aging: The Telomerase Challenge. *Aging* **2016**, *8*, 12–15. [\[CrossRef\]](#)
129. Widschwendter, A.; Müller, H.M.; Hubalek, M.M.; Wiedemair, A.; Fiegl, H.; Goebel, G.; Mueller-Holzner, E.; Marth, C.; Widschwendter, M. Methylation Status and Expression of Human Telomerase Reverse Transcriptase in Ovarian and Cervical Cancer. *Gynecol. Oncol.* **2004**, *93*, 407–416. [\[CrossRef\]](#)
130. Rafie, N.; Golpour Hamedani, S.; Barak, F.; Safavi, S.M.; Miraghajani, M. Dietary Patterns, Food Groups and Telomere Length: A Systematic Review of Current Studies. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2017**, *71*, 151–158. [\[CrossRef\]](#)
131. Davinelli, S.; Trichopoulou, A.; Corbi, G.; De Vivo, I.; Scapagnini, G. The Potential Nutrigenoprotective Role of Mediterranean Diet and Its Functional Components on Telomere Length Dynamics. *Ageing Res. Rev.* **2019**, *49*, 1–10. [\[CrossRef\]](#)
132. Pepper, G.V.; Bateson, M.; Nettle, D. Telomeres as Integrative Markers of Exposure to Stress and Adversity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *R. Soc. Open Sci.* **2018**, *5*, 180744. [\[CrossRef\]](#)
133. Canudas, S.; Becerra-Tomás, N.; Hernández-Alonso, P.; Galié, S.; Leung, C.; Crous-Bou, M.; De Vivo, I.; Gao, Y.; Gu, Y.; Meinilä, J.; et al. Mediterranean Diet and Telomere Length: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Adv. Nutr.* **2020**, *11*, 1544–1554. [\[CrossRef\]](#)
134. Navarro-Ibarra, M.J.; Hernández, J.; Caire-Juvera, G. Diet, Physical Activity and Telomere Length in Adults. *Nutr. Hosp.* **2019**, *36*, 1403–1417. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
135. Sreerangaraja Urs, D.B.; Wu, W.-H.; Komrskova, K.; Postlerova, P.; Lin, Y.-F.; Tzeng, C.-R.; Kao, S.-H. Mitochondrial Function in Modulating Human Granulosa Cell Steroidogenesis and Female Fertility. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3592. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
136. May-Panloup, P.; Boucret, L.; Chao de la Barca, J.-M.; Desquiret-Dumas, V.; Ferré-L'Hottellier, V.; Morinière, C.; Descamps, P.; Procaccio, V.; Reynier, P. Ovarian Ageing: The Role of Mitochondria in Oocytes and Follicles. *Hum. Reprod. Update* **2016**, *22*, 725–743. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 3 septembre 2021

FACULTE DE PHARMACIE

19 AOUT 2021

ARRIVEE

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE

présenté par : Anne Julie FATTET-SEGURA

Sujet : LA LONGUEUR DES TELOMERES DANS LES
CELLULES DE LA GRANULOSA ET DANS LES
LEUCOCYTES, UN MARQUEUR DE FERTILITE
FEMININE ? REVUE SYSTEMATIQUE DE LA
LITTERATURE

Jury :

Président : Pr. Jean-Louis MERLIN, PU-PH
Directeur : Dr. Isabelle KOSCINSKI, MCU-PH
Juges : Pr. Athanase BENETOS, PU-PH
Dr. Mikael AGOPIANTZ, MCU-PH
Dr. Nicolas MONNIN, Pharmacien Biologiste

Vu,

Nancy, le 07/07/2021

Le Président du Jury/Codirecteur

Directrice de Thèse

Pr. Jean-Louis MERLIN

Dr. Isabelle KOSCINSKI

Vu et approuvé,

Nancy, le 16.07.2021

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université de Lorraine,

Vu,

Nancy, le 27.07.2021

Le Président de l'Université de Lorraine,



N° d'enregistrement : 11828 C

N° d'identification : 11828C

TITRE

Longueur des télomères dans les cellules de la granulosa et dans les leucocytes ; un marqueur de fertilité féminine ? Revue systématique de la littérature

**Thèse soutenue le 3 septembre 2021
Par Anne Julie FATTET-SEGURA**

RESUME :

Étant donné l'allongement continu de l'âge de la première grossesse, de la prévalence de l'insuffisance ovarienne prématurée et avec la révision de la loi de Bioéthique qui va autoriser la cryoconservation ovocytaire sociétale ; il serait intéressant de disposer d'un marqueur prédictif de la durée de fertilité féminine. Comment conseiller les jeunes femmes sur l'intérêt de préserver leur fertilité ? Comment discerner celles qui auront une longue vie reproductive de celles qui auront une insuffisance ovarienne prématurée dans 5 ans ? Malheureusement, les marqueurs de fertilité actuellement disponibles (dosages hormonaux ou compte des follicules antraux par échographie) sont de faible valeur prédictive et lorsqu'ils sont perturbés, la réserve ovarienne est déjà altérée.

La fertilité féminine est étroitement liée à la réserve ovarienne, mais également à la qualité de ces follicules. La folliculogénèse requiert une multiplication intense des cellules de la granulosa durant la maturation folliculaire. Ainsi, la quantité et la qualité des follicules dépend fortement de la capacité de ces cellules somatiques à proliférer et tout mécanisme impactant ce processus résultera en un raccourcissement de la durée de vie reproductive. Les télomères sont des nucléo-protéines présentes à l'extrémité des chromosomes et ont un rôle crucial dans le potentiel prolifératif des cellules. Les télomères se raccourcissent à chaque division cellulaire et déclenchent la sénescence cellulaire lorsqu'ils atteignent un certain seuil. Par conséquent, l'attrition télomérique est considérée comme une caractéristique essentielle du vieillissement cellulaire et au cours des dix dernières années, plusieurs auteurs ont cherché à étudier la corrélation entre ce paramètre et la survenue d'une insuffisance ovarienne prématurée.

C'est pourquoi nous avons réalisé une revue systématique de la littérature qui recense 5 études. Trois études ont retrouvé des télomères plus courts dans les cellules de la granulosa et/ou dans les leucocytes ainsi qu'une activité télomérase diminuée chez 178 patientes en IOP. Les deux autres études (74 patientes en IOP) ont retrouvé des résultats contradictoires au sujet de la corrélation longueur des télomères dans les leucocytes et insuffisance ovarienne prématurée. Cependant, le nombre d'études et de sujets inclus est faible, et les méthodologies sont très diverses selon les auteurs. Pour confirmer ces résultats, il est essentiel d'inclure davantage de patients avec des populations plus précisément définies. Dans cet objectif, l'étude TELEFF pour « Télomères : un marqueur de fertilité féminine ? » est actuellement en cours au CHRU de Nancy. Cette étude vise à confirmer le lien entre longueur des télomères dans les cellules de la granulosa et/ou dans les leucocytes comme marqueur prédictif précoce et fiable du déclin de la fonction ovarienne. Si ces conclusions sont vérifiées, cela permettrait d'envisager des voies thérapeutiques pour ralentir le raccourcissement des télomères ; par exemple en activant la télomérase ovarienne mais sans augmenter le risque de cancer.

MOTS CLES : biologie de la reproduction, cellules de la granulosa, longueur des télomères, activité télomérase, insuffisance ovarienne prématurée, AMP, fertilité féminine

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Dr Isabelle KOSCINSKI	Laboratoire de Biologie de la Reproduction Maternité CHRU de Nancy	Expérimentale ☐ Bibliographique ☒ Thème ☐

Thèmes	1 – Sciences fondamentales 3 – Médicament 5 - Biologie	2 – Hygiène/Environnement 4 – Alimentation – Nutrition 6 – Pratique professionnelle
--------	---	---