

Protéome du liquide folliculaire et de l'ovocyte

Proteomics of follicular fluid and oocyte

Moncef Benkhalifa^{1,3,4}

N. Louanjli^{2,4}

E. Berthe^{1,4}

A. Madkour^{2,4}

B. Saadani^{2,4}

A. Dalleac^{3,4}

P. Merviel^{1,4}

H. Copin^{1,4}

D. Montjean^{2,3,4}

¹ CHU et UFR de Médecine, université de Picardie-Jules-Verne, laboratoire d'AMP et de cytogénétique, 80000 Amiens, France

² Clinique des Iris, laboratoire IRIFIV, Casablanca, Maroc

³ Laboratoire Eylau/Unilabs, 75116 Paris, France

⁴ ATL R&D reproductive biology & genetics, 6, rue Louis Lormand, 78320 La Verrière, France <atl78@aol.com>

Résumé. Depuis le développement des techniques d'aide médicale à la procréation, des investigations pour élucider la contribution potentielle des désordres de la génomique, de la transcriptomique et de la protéomique dans les échecs des tentatives de FIV ont été rapportées dans la littérature. Les études ont été menées grâce à diverses approches techniques, telles que l'étude de l'expression des gènes et de l'ensemble des protéines dans les cellules de la granulosa mais aussi dans l'ovocyte lui-même, essentiellement chez l'animal. Bien que toutes ces études n'aient pas encore permis d'établir un profil moléculaire permettant de prédire la qualité d'un ovocyte, elles ont généré une quantité d'informations intéressantes concernant le protéome du liquide folliculaire et de l'ovocyte. Pour améliorer la prise en charge des couples infertiles, l'identification de marqueurs moléculaires permettant de prédire la qualité de l'ovocyte, de l'embryon ou de l'endomètre deviendra probablement utile et nécessaire dans nos pratiques d'investigations et de thérapeutiques dans le proche futur.

Mots clés : liquide folliculaire, ovocyte, protéomique

Abstract. Since the development of assisted reproductive technology techniques, the potential contribution of genomics, transcriptomics and proteomics disorders on IVF cycles failure were reported in the literature. Different technical approaches were applied to investigate the genome expression, whole proteome profiling of follicular fluid or of the oocyte itself specially in animal model. The studies results regenerate a wide range of information from follicular fluid and oocyte, but still didn't conclude for an ideal profile to predict the best oocyte and embryo suitable for implantation on parallel to the endometrium receptivity competency. For better management of infertile couples, the identification of specific markers from the follicular fluid, the oocyte and the endometrium will become probably very informative for better investigation and therapeutic treatment in the future

Key words: follicular fluid, oocyte, proteomics

En procréation médicalement assistée, la contribution réelle des désordres de la génomique, de la transcriptomique et de la protéomique dans les échecs des tentatives de FIV reste à élucider. Mais il est admis qu'un désordre chromosomique, un protocole de stimulation inadéquat, un asynchronisme entre la phase folliculaire et la phase lutéale, ainsi qu'un micro-environnement défavorable à l'activation de l'ovocyte et au développement embryonnaire précoce, et des facteurs immunologiques ou infectieux sont des causes majeures d'échecs en assistance médicale à la procréation (AMP). Pour améliorer la prise en charge des couples infertiles, l'identification de marqueurs moléculaires permettant de prédire la qualité

de l'ovocyte, de l'embryon ou de l'endomètre deviendra probablement utile et nécessaire dans nos pratiques d'investigations et de thérapeutiques dans le proche futur.

La sélection d'un ovocyte de qualité supérieure (maturation de fécondance et compétence de développement embryonnaire pour une grossesse) permettrait d'augmenter les chances de sélection embryonnaire ainsi que la validation d'une approche de médecine prédictive/préventive et thérapeutique. Il a été suggéré que l'analyse protéomique du liquide folliculaire (LF) ou de l'ovocyte fournisse des informations sur le niveau de maturation et de compétence de l'ovocyte ainsi que sur les chances de grossesses et d'accouchement [1].



Tirés à part : M. Benkhalifa

En effet, des changements même minimes au niveau du protéome du LF et de l'ovocyte pourraient avoir des répercussions physiologiques sur l'activation de l'ovocyte et le développement embryonnaire pré-implantatoire. À ce jour, 100 000 protéines ont été rapportées lors de screening du protéome humain à des fins diagnostiques [2]. Le LF, un mélange entre plasma sanguin qui traverse la barrière folliculaire avec les sécrétions des cellules de la granulosa et de la thèque, constitue le micro-environnement dans lequel l'ovocyte se développe [3]. De ce fait, il est communément admis que la composition du LF reflète l'activité des cellules de la granulosa et de la thèque et vraisemblablement la qualité de l'ovocyte. Le fait que le LF puisse être facilement mis à disposition après une ponction ovocytaire et que son isolement ne nécessite aucune technique invasive pour la patiente a permis la mise en place de nombreuses études sur sa composition protéique en relation avec la qualité ovocytaire.

Ces dernières années, la recherche prédictive pour de bons taux de fécondation et de développement embryonnaire a motivé de nombreuses équipes à travers le monde à l'investigation de la protéomique du LF [4]. Ces études ont été menées grâce à diverses approches techniques très chronophages et surtout coûteuses telles que l'étude de l'expression des gènes [5] et de l'ensemble des protéines (autrement dit le protéome) dans les cellules de la granulosa mais aussi dans l'ovocyte lui-même, essentiellement chez des modèles animaux [6]. Bien que toutes ces études n'aient pas encore permis d'établir un profil moléculaire permettant de prédire la qualité d'un ovocyte, elles ont généré une grande quantité d'informations intéressantes concernant le protéome du LF et de l'ovocyte.

Le protéome du liquide folliculaire

L'approche la plus courante de l'étude du protéome du LF est l'électrophorèse bidimensionnelle suivie d'une digestion des protéines, puis une analyse par spectrométrie de masse. Étant donné la complexité de cette méthode, d'autres techniques basées sur le fractionnement protéique par focalisation isoélectrique suivi d'une analyse par chromatographie en phase liquide ou par spectrométrie de masse ont été développées et se sont généralisées.

Malgré cela, les connaissances sur le profil protéique du LF en fonction de la qualité ovocytaire demeurent limitées. Les investigations sur le LF ont permis la détection de protéines, de peptides et d'acides aminés en corrélation avec des données biologiques. Nous avons listé ces molécules ainsi que les quelques hormones non peptidiques (stéroïdes) qui ont aussi fait l'objet de plusieurs publications (tableaux 1 et 2).

L'analyse du LF [1] a révélé une différence du niveau des protéines associées à la coagulation entre les patientes

ainsi que la contribution de la fonction immunitaire innée du complément cascade dont le LF.

L'analyse du LF par chromatographie liquide en tandem de spectrométrie de masse [7] a révélé 11 protéines candidates (essentiellement apolipoprotéine H, la dihydrolipoyl, déhydrogénase, lysosyme C et la chaîne fibrinogène α) avec un niveau d'expression élevé en parallèle d'un niveau d'expression bas de protéines différentes (l'antithrombine, la vitamine D *binding protein*). Cette étude a démontré que l'analyse du LF a été capable d'identifier des biomarqueurs pour les bonnes répondeuses *versus* les mauvaises répondeuses.

L'analyse de 17 cytokines au niveau du LF au moment du pic de la stimulation ovarienne par une analyse multiplex du protéome [8] chez des patientes avec une folliculogénèse inefficace a démontré que les concentrations de l'IL2, l'IL4, l'IL7 et du CSF sont significativement plus basses chez ces patientes par rapport aux normo-répondeuses.

Dans les échecs de grossesse, il a été observé un niveau plus bas de l'IL2, l'IL4, l'IL7 et du CSF avec un niveau élevé de l'IL8 et l'IL13 [8]. Cette étude a démontré le rôle important des cytokines dans la régulation de l'ovogénèse et la préparation de l'endomètre pour une implantation réussie. La comparaison du profil protéomique du LF par deux techniques différentes, de patientes avec un syndrome d'hyperstimulation ovarienne par rapport à un groupe contrôle [1], a rapporté que parmi un total de 19 protéines candidates, trois, qui sont la céruloplasmine, le complément C3 et la kilinogène 1, sont exprimées d'une manière différentielle par les deux techniques dans le LF des deux groupes de patientes.

Dans cette étude, une modélisation informatique a démontré le rôle de la kilinogène 1 comme médiateur d'interaction avec d'autres protéines (telles que la céruloplasmine, l'hépatocyte *growth factor like*, ainsi que le complément C3 et la gelsoline) liées à des fonctions biologiques variées incluant le processus inflammatoire, d'angiogénèse, le transport et le stockage du fer, la coagulation et l'adhésion cellulaire.

L'étude de Lédée *et al.* [9] qui consistait à analyser le LF a pu démontrer que le niveau des facteurs de croissance G-CSF est lié à la compétence du développement embryonnaire. Un taux supérieur à 24 pg/mL de G-CSF présents dans le LF permet d'avoir un taux élevé de transfert allant jusqu'à 44 % ; en revanche, un taux de G-CSF de moins de 20 pg/mL va influencer négativement le taux de transfert sans dépasser 6 % [9].

Une étude récente a rapporté que des facteurs exogènes tels que les conditions de culture, la stimulation hormonale, l'état physiologique, les stress, le régime alimentaire et l'obésité affectent la composition du LF [10]. C'est la raison pour laquelle il est important que les résultats montrant un lien entre la composition du LF et la qualité ovocytaire soient interprétés avec un esprit critique.

Tableau 1.

Noms	Données biologiques associées	Références
<i>Hormones peptidiques</i>		
FSH, hCG, LH	Corrélation positive avec la maturité ovocytaire et les chances de fécondation	[24-27]
GH	Aucun lien clair avec les chances de grossesse	[27, 28]
AMH	Associée à une bonne qualité ovocytaire et embryonnaire	[29, 30]
	Corrélation positive avec les taux de fécondation	[31]
	Inversement corrélé avec la maturation et le potentiel de développement des ovocytes	[32]
PRL	Associée à de bons taux de fécondation et à de bons taux de grossesse	[33, 34]
Inhibine A and B	Marqueurs de la réponse ovarienne et non de la qualité ovocytaire	[35, 36]
IGF	Corrélation positive avec la maturité et la qualité ovocytaire, la fécondation, le clivage et le développement embryonnaire et avec la morphologie embryonnaire à J3	[35, 37-40]
	Ne reflète pas la qualité embryonnaire et l'issue de la fécondation <i>in vitro</i>	[41]

Tableau 2.

<i>Protéines, peptides, acides aminés</i>		
Apolipoprotéine H, la dihydrolipoyle, déhydrogénase, lysosyme C, la chaîne fibrinogène, l'antithrombine, la vitamine D <i>binding protein</i> , céruloplasmine, complément C3, kilinogène 1, interleukines 2, 4, 7, 8 et 13, G-CSF et le CSF.	Biomarqueurs de la réponse ovarienne et de l'implantation	[1, 7-9]
CD44 soluble	Corrélation négative avec la fécondation et la bonne qualité embryonnaire	[42]
Alpha-1-antitrypsine	Potentiellement un marqueur négatif de la qualité ovocytaire	[43, 44]
Leptine	Un indicateur d'une qualité ovocytaire médiocre et de taux de fécondation bas	[45-47]
	Controverse	[48, 49]
Endothéline-2	Prédit de bons taux de fécondation et éventuellement un marqueur de la maturation ovocytaire	[50, 51]
Homocystéine	En faible concentration dans le LF : ovocyte mature de bonne qualité	[52, 53]
Bêta-endorphine	Résultats contradictoires concernant les taux de fécondation	[54, 55]
Lactoferrine	Bonne qualité ovocytaire, taux de fécondation satisfaisant et bon développement embryonnaire	[56]
Angiotensine II	Pas de relation avec les taux de fécondation	[57]
Acide D-aspartique	Corrélation positive avec les taux de fécondation	[58]
Prorénine	Corrélation négative avec les taux de fécondation	[59]
<i>Stéroïdes</i>		
Estrogène/testostérone, progestérone, estrogène, et estrogène/progestérone	Corrélation positive avec la maturité ovocytaire et les chances de grossesse	[28, 38, 60-70]
	Résultats contradictoires	[26, 71-74]

Le protéome ovocytaire

L'activité transcriptionnelle ovocytaire commence dès le stade du follicule secondaire, pour continuer à augmenter jusqu'au stade tertiaire, mais par la suite, cette activité va chuter [11]. Cette dernière est régulée essentiellement par les cellules de la granulosa associées à l'ovocyte sous dépendance des gonadotropes.

Au sein du follicule, il y a une présence des facteurs de croissance tels que le TGF β , l'EGF et le FGF [12]. Deux protéines de la famille des TGF β sont produites dans l'ovule, soit GDF-9 et BMP-13 (ou GDF-9 β) [13]. L'ARNm de GDF-9 est présent dans l'ovocyte à partir du follicule primordial ou primaire jusqu'à l'ovulation. Il y a également la protéine *newborn ovary homeobox-encoding gene* (NOBOX) qui est spécifique à l'ovocyte, elle est impliquée dans l'expression des gènes tels que *GDF-9* et *Oct-4*.

La reprise de la méiose nécessite la synthèse des protéines tout au long de la maturation et elle est régulée par l'activation du *maturation promoting factor* (MPF) responsable de l'induction de la *germinal vesicle breakdown* (GVBD/rupture de la vésicule germinale), impliquant la progression de la maturation jusqu'à la métaphase II ainsi par la polyadénylation de la cystéine B1 traduite [14].

Le protéome de l'ovocyte est un sujet qui fait encore l'objet de nombreux débats. Bien que plusieurs approches aient été imaginées pour en élucider le contenu, à ce jour, il est encore mal connu et une large proportion de protéines qui le composent reste encore à déterminer [15]. Dans le but de caractériser le protéome de l'ovocyte mature, une équipe a suivi la dynamique des protéines lors de la maturation d'ovocytes. Il s'est avéré que très peu de protéines sont réellement spécifiques de l'ovocyte mature [16, 17]. En extrapolant des résultats de micro-array, il a été estimé que le protéome de l'ovocyte mature est constitué de plus de 50 000 protéines [18]. Or, l'étude de l'ovocyte mature de souris par spectrométrie de masse n'a permis d'identifier initialement que 1 092 protéines [19] ; puis, 2 973 protéines ont été récemment décrites [14]. Cette dernière approche est de loin la plus fréquemment utilisée dans ce type de recherches car elle s'avère être celle qui fournit les résultats les plus fiables.

Durant de nombreuses années, la transcriptomique a été très largement utilisée pour étudier la qualité de l'ovocyte [6]. Cependant, l'avantage majeur de la protéomique repose sur le fait que la présence de transcrits spécifiques dans une cellule ne corrèle pas systématiquement avec le niveau d'expression de la protéine associée. De plus, la protéomique permet la détection des modifications post-traductionnelles. Bien que nous sachions que l'ovocyte humain est une cellule hautement spécialisée qui stocke de grosses quantités de matériel pour assurer son développement et les premières étapes du développe-

ment embryonnaire [15, 20], il est extrêmement difficile d'en analyser le contenu pour des raisons éthiques évidentes et techniques (chaque analyse nécessite beaucoup de matériel biologique : plusieurs centaines d'ovocytes). De ce fait, le protéome de l'ovocyte humain reste encore très mal décrit et trop peu d'informations sont disponibles à ce sujet. De fait, la majorité des études ont dû être menées sur des modèles animaux.

Une analyse protéomique comparative de l'ovocyte de souris à différents stades de développement [14] a rapporté qu'au stade VG, il y a une surexpression de gènes impliqués dans la production de protéines responsables de la maturation ovocytaire, principalement la famille de protéines SLC responsables dans le transport de différentes molécules à travers la membrane ovocytaire et les cellules du cumulus. Aussi il a été observé que d'autres protéines impliquées dans la formation et l'adhésion des *gaps junctions* sont plus abondantes dans les ovocytes au stade VG qu'au stade de la métaphase II. Pour les ovocytes matures au stade MIII, l'étude a démontré une surexpression de protéines participant aux événements du cycle cellulaire ainsi que des protéines responsables dans la répression ou l'activation transcriptionnelle. Cette étude a démontré une dégradation rapide des protéines maternelles après la fécondation avec un enrichissement en protéines impliquées dans la voie d'ubiquitination.

Chez le porc, le changement du profil protéique après maturation ovocytaire *in vitro* a démontré un remarquable changement protéique tel que l'ubiquitine, la spermine synthétase et l'aldéhyde déshydrogénase après passage du stade de VG au stade MI à MII [21]. Une étude comparative protéomique avec la technique *exac tag* (Prekin Elmer) comparant le protéome et le sécrétome d'ovocytes de bonne et de mauvaise qualité a démontré une variation de haute différence de 16 protéines (essentiellement l'ubiquitine ligase, la protéine *nuclear export factors* et la protéine kinase) [22], ainsi que la glyoxylase 1 et l'ubiquitine qui ont été considérées comme des biomarqueurs apoptotiques de l'ovocyte au stade de maturation [23].

Compte tenu des données de la littérature, nous avons dressé une liste non exhaustive des protéines présentes dans l'ovocyte de souris (détails *tableau 3*). À ce jour, le rôle de certaines des protéines décrites comme étant présentes dans l'ovocyte reste à élucider.

Conclusion

Les études qui ont été citées dans cette revue sont descriptives et les résultats sont préliminaires. Au vu de ses données, il est évident que des recherches supplémentaires à grande échelle sont indispensables. De plus, il serait intéressant pour l'évolution de la discipline de

Tableau 3.

Nom/symbole des protéines	Commentaires	Références
Ubiquitine ligase, la protéine <i>nuclear export factors</i> et la protéine kinase	Marqueurs de la qualité ovocytaire	[22]
Glyoxylase 1 et l'ubiquitine	Marqueurs de la maturité ovocytaire	[23]
TCTP	Surexprimée dans l'ovocyte mature	[75]
PDCD6IP, importin- α 2, nudix, nucleoplasmine 2 (NPM2), et spindline	Modifications post-traductionnelles lors de la maturation ovocytaire	[75]
TACC3, <i>heat shock protein</i> (HSP) 105, STI1, ADSS, lipocaline (LCN1) et lysozyme 1	Sous-exprimées dans l'ovocyte mature	[75]
CD55, CD9, CD81, intégrine α v β 3, intégrine α 6 β 1, HSP70 (HSP1b), HSP90a, GRP94, BiP (GRP78), ORP150 (<i>hypoxia up-regulated 1</i>), calreticuline, calnexine et PDI	Protéines membranaires jouant un rôle dans l'interaction gamétique	[76-79]
Phospholipase A2g cytosolique (cPLA2g, PLA2G4C), NPM2 et peptidylarginine déiminase 6 (PADI6)	Nécessaires au développement embryonnaire précoce	[80]
<i>Early endosome antigen 1</i> , MATER, Grp94	Rôle hypothétique dans l'ovogenèse et le développement pré-implantatoire	[80, 81]
Calnexin, <i>heat shock protein 90</i> , BiP, calreticuline, <i>protein disulfide isomerase</i> , <i>stress-induced phosphoprotein 1</i> , <i>alpha-tubulin</i> , <i>beta-tubulin</i> , <i>ATP synthase</i> , <i>alpha-subunit nuclear distribution gene</i> , <i>C homolog SGT1</i> , <i>regucalcin</i> , <i>pyrophosphatase (inorganic) 1</i> , <i>pyruvate dehydrogenase lactate dehydrogenase B</i> , <i>ubiquitin C-terminal hydrolase L1</i> , <i>Rho GDP dissociation inhibitor</i> , <i>S-phase kinase-associated protein 1A</i> , <i>superoxide dismutase 1, soluble</i>		
Dnmt1 (DNMT1O), 2410004A20Rik (FILIA), Ooep (FLOPED), Nlrp5 (MATER) Npm2, Oas1d et Padi6	Essentielles dans le développement embryonnaire précoce	[81-85]
Pla2g4c (cPLA2g), Dppa5a, Nlrp14, Spin1 et Tle6	Rôle putatif dans le développement embryonnaire précoce	[82, 86, 87]

développer des techniques de protéomique plus sensibles et plus simples afin de pouvoir analyser avec plus d'efficacité le peu de matériel biologique que peut apporter l'ovocyte humain. L'autorisation récente de la pratique de la vitrification ovocytaire en France en routine offre une nouvelle possibilité de disposer d'ovocytes humains en nombre plus important comme outil de recherche.

Conflits d'intérêts : non transmis.

References

- Jarkovska K, Kupcova SH, Halada P, *et al.* Development of ovarian hyperstimulation syndrome: interrogation of key proteins and biological processes in human follicular fluid of women undergoing *in vitro* fertilization. *Mol Hum Reprod* 2011 ; 17 : 679-92.
- Horgan RP, Clancy OH, Myers JE, Baker PN. An overview of proteomic and metabolic technologies and their application to pregnancy research. *BJOG* 2009 ; 116 : 173-81.
- Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 1994 ; 50 : 225-32.
- Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol* 2009 ; 7 : 40.
- Hamamh S. Omics as a tool for ART. *Gyn Obstet Fertil* 2011 ; 39 : 1-2.
- Seli E, Robert C, Sirard MA. OMICS in assisted reproduction: possibilities and pitfalls. *Mol Hum Reprod* 2010 ; 16 : 513-30.
- Estes SJ, Ye B, Qiu W, Cramer D, Hornstein MD, Missmer SA. A proteomic analysis of IVF follicular fluid in women ≤ 32 years old. *Fertil Steril* 2009 ; 92 : 1569-78.
- Ostanin AA, Aizikovitch BI, Aizikovitch IV, Kozhin AY, Chernykh FR. Role of cytokines in the regulation of reproductive function. *Bull Exp Biol Med* 2007 ; 143 : 75-9.
- Ledee N, Munaut C, Serazin V, *et al.* Performance evaluation of microbead and Elisa assays for follicular G-CSF: a non-invasive biomarker of oocyte developmental competence for embryo implantation. *J Reprod Immunol* 2010 ; 86 : 126-32.
- Ola SI, Sun QY. Factors influencing the biochemical markers for predicting Mammalian oocyte quality. *J Reprod Dev* 2012 ; 58 : 385-92.

11. Thomas RE, Armstrong DT, Gilchrist RB. Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation. *Dev Biol* 2002 ; 244 : 215-25.
12. Van Wezel IL, Rodgers RJ. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment *in vivo*. *Biol Reprod* 1996 ; 55 : 1003-11.
13. Wu X, Matzuk MM. Gdf-9 and bmp-15: oocyte organizers. *Rev Endocr Metab Disord* 2002 ; 3 : 27-32.
14. Shufang W, Zhaohui K, Zhiyi J, *et al*. Proteome of mouse oocytes at different developmental stages. *PNAS* 2010 ; 107 : 17639-44.
15. Vallee M, Gravel C, Palin MF, *et al*. Identification of novel and known oocyte-specific genes using complementary DNA subtraction and micro-array analysis in three different species. *Biol Reprod* 2005 ; 73 : 63-71.
16. Schultz RM, Wassarman PM. Biochemical studies of mammalian oogenesis: protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. *J Cell Sci* 1977 ; 24 : 167-94.
17. Coenen K, Massicotte L, Sirard MA. Study of newly synthesized proteins during bovine oocyte maturation *in vitro* using image analysis of two-dimensional gel electrophoresis. *Mol Reprod Dev* 2004 ; 67 : 313-22.
18. Katz-Jaffe MG, Gardner DK. Embryology in the era of proteomics. *Theriogenology* 2007 ; 68 (Suppl. 1) : S125-30.
19. Memili E, Peddinti D, Shack LA, *et al*. Bovine germinal vesicle oocyte and cumulus cell proteomics. *Reproduction* 2007 ; 133 : 1107-20.
20. Herubel F, El Mouatassim S, Guerin P, *et al*. Genetic expression of monocarboxylate transporters during human and murine oocyte maturation and early embryonic development. *Zygote* 2002 ; 10 : 175-81.
21. Ellederova Z, Halada P, Man P, Kubelka M, Motlik J, Kovarova H. Protein patterns of pig oocytes during *in vitro* maturation. *Bio Reprod* 2004 ; 71 : 1533-9.
22. Powell MD, Manandhar G, Spate L, *et al*. Discovery of putative oocyte quality markers by comparative ExacTag proteomics. *Proteo Clin Appl* 2010 ; 4 : 337-51.
23. Demant M. *Qualitative and quantitative proteome analyses of bovine oocytes and early embryos*, 2012 (Thesis).
24. Ellsworth LR, Balmaceda JP, Schenken RS, Silverman AY, Prihoda TJ, Asch RH. Human chorionic gonadotropin and steroid concentrations in human follicular fluid in relation to follicle size and oocyte maturity in stimulated ovarian cycles. *Acta Eur Fertil* 1984 ; 15 : 343-6.
25. Cha KY, Barnes RB, Marrs RP, Lobo RA. Correlation of the bioactivity of luteinizing hormone in follicular fluid with oocyte maturity in the spontaneous cycle. *Fertil Steril* 1986 ; 45 : 338-41.
26. Suchanek E, Simunic V, Macas E, Kopjar B, Grizelj V B. Prostaglandin F2 alpha, progesterone and estradiol concentrations in human follicular fluid and their relation to success of *in vitro* fertilization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1988 ; 28 : 331-9.
27. Mendoza C, Ruiz-Requena E, Ortega E, *et al*. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum Reprod* 2002 ; 17 : 1017-22.
28. Tarlatzis BC, Pazaitou K, Bili H, *et al*. Growth hormone, oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid after ovarian stimulation with various regimes for assisted reproduction. *Hum Reprod* 1993 ; 8 : 1612-6.
29. Ebner T, Sommergruber M, Moser M, Shebl O, Schreier-Lechner E, Tews G. Basal level of anti-Müllerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles. *Hum Reprod* 2006 ; 21 : 2022-6.
30. Silberstein T, MacLaughlin DT, Shai I, *et al*. Müllerian inhibiting substance levels at the time of HCG administration in IVF cycles predict both ovarian reserve and embryo morphology. *Hum Reprod* 2006 ; 21 : 159-63.
31. Takahashi C, Fujito A, Kazuka M, Sugiyama R, Ito H, Isaka K. Anti-müllerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 2008 ; 89 : 586-91.
32. Cupisti S, Dittrich R, Mueller A, *et al*. Correlations between anti-müllerian hormone, inhibin B, and activin A in follicular fluid in IVF/ICSI patients for assessing the maturation and developmental potential of oocytes. *Eur J Med Res* 2007 ; 12 : 604-8.
33. Laufer N, Botero-Ruiz W, DeCherney AH, Haseltine F, Polan ML, Behrman HR. Gonadotropin and prolactin levels in follicular fluid of human ova successfully fertilized *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 1984 ; 58 : 430-4.
34. Lindner C, Lichtenberg V, Westhof G, Braendle W, Bettendorf G. Endocrine parameters of human follicular fluid and fertilization capacity of oocytes. *Horm Metab Res* 1988 ; 20 : 243-6.
35. Fried G, Remaues K, Harlin J, *et al*. Inhibin B predicts oocyte number and the ratio IGF-1/IGFBP-1 may indicate oocyte quality during ovarian hyperstimulation for *in vitro* fertilization. *J Assist Reprod Genet* 2003 ; 20 : 167-76.
36. Wen X, Tozer AJ, Butler SA, Bell CM, Docherty SM, Iles RK. Follicular fluid levels of inhibin A, inhibin B, and activin A levels reflect changes in follicle size but are not independent markers of the oocyte's ability to fertilize. *Fertil Steril* 2006 ; 85 : 1723-9.
37. Jimena P, Castilla JA, Peran F, *et al*. Insulin and insulin-like growth factor I in follicular fluid after induction of ovulation in women undergoing *in vitro* fertilization. *J Reprod Fertil* 1992 ; 96 : 641-7.
38. Artini PG, Battaglia C, D'Ambrogio G, *et al*. Relationship between human oocyte maturity, fertilization and follicular fluid growth factors. *Hum Reprod* 1994 ; 9 : 902-6.
39. Oosterhuis GJ, Vermes I, Lambalk CB, Michgelsen HW, Schoemaker J. Insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein-3 concentrations in fluid from human stimulated follicles. *Hum Reprod* 1998 ; 13 : 285-9.
40. Wang TH, Chang CL, Wu HM, Chiu YM, Chen CK, Wang HS. Insulin-like growth factor-II (IGF-II), IGF-binding protein-3 (IGFBP-3), and IGFBP-4 in follicular fluid are associated with oocyte maturation and embryo development. *Fertil Steril* 2006 ; 86 : 1392-401.
41. Asimakopoulos B, Abu-Hassan D, Metzen E, Al-Hasani S, Die-drich K, Nikolettos N. The levels of steroid hormones and cytokines in individual follicles are not associated with the fertilization outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2008 ; 90 : 60-4.
42. Ohta N, Saito H, Kaneko T, *et al*. Soluble CD44 in human ovarian follicular fluid. *J Assist Reprod Genet* 2001 ; 18 : 21-5.
43. Imoedemhe D, Shaw RW. Follicular fluid alpha 1-antitrypsin-correlation with fertilizing capacity of oocytes. *Br J Obstet Gynaecol* 1986 ; 93 : 863-8.
44. Nagy B, Pulay T, Szarka G, Csömör S. The serum protein content of human follicular fluid and its correlation with the maturity of oocytes. *Acta Physiol Hung* 1989 ; 73 : 71-5.

45. Barroso G, Barrionuevo M, Rao P, et al. Vascular endothelial growth factor, nitric oxide, and leptin follicular fluid levels correlate negatively with embryo quality in IVF patients. *Fertil Steril* 1999;72: 1024-6.
46. Mantzoros CS, Cramer DW, Liberman RF, Barbieri RL. Predictive value of serum and follicular fluid leptin concentrations during assisted reproductive cycles in normal women and in women with the polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 2000; 15: 539-44.
47. Tsai EM, Yang CH, Chen SC, et al. Leptin affects pregnancy outcome of *in vitro* fertilization and steroidogenesis of human granulosa cells. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19: 169-76.
48. Wunder DM, Mueller MD, Birkhäuser MH, Bersinger NA. Steroids and protein markers in the follicular fluid as indicators of oocyte quality in patients with and without endometriosis. *J Assist Reprod Genet* 2005; 22: 257-64.
49. De Placido G, Alviggi C, Clarizia R, et al. Intra-follicular leptin concentration as a predictive factor for *in vitro* oocyte fertilization in assisted reproductive techniques. *J Endocrinol Invest* 2006; 29: 719-26.
50. Plonowski A, Kaplinski AP, Radzikowska M, Borowiec M, Baranowska B. Correlation between 21 amino acid endothelin, intra-follicular steroids and follicle size in stimulated cycles. *Hum Reprod* 1999; 14: 2323-7.
51. Sudik R, Chari S, Pascher E, Sturm G. Human follicular fluid levels of endothelins in relation to oocyte maturity status. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996; 104: 78-84.
52. Szymanski W, Kazdepka-Zieminska A. Effect of homocysteine concentration in follicular fluid on a degree of oocyte maturity. *Ginek Pol* 2003; 74: 1392-6.
53. Boxmeer JC, Steegers-Theunissen RP, Lindemans J, et al. Homocysteine metabolism in the pre-ovulatory follicle during ovarian stimulation. *Hum Reprod* 2008; 23: 2570-6.
54. Facchinetti F, Artini PG, Monaco M, Volpe A, Genazzani AR. Oocyte fertilization *in vitro* is associated with high follicular immunoreactive beta-endorphin levels. *J Endocrinol Invest* 1989; 12: 693-8.
55. Tam PP, Ng TB, Mao KR. Beta-endorphin levels in the preovulatory follicles and the outcome of *in vitro* fertilization. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1988; 5: 91-5.
56. Yanaihara A, Mitsukawa K, Iwasaki S, Otsuki K, Kawamura T, Okai T. High concentrations of lactoferrin in the follicular fluid correlate with embryo quality during *in vitro* fertilization cycles. *Fertil Steril* 2007; 87: 279-82.
57. Jarry H, Meyer B, Holzapfel G, Hinney B, Kuhn W, Wuttke W. Angiotensin II/III and substance P in human follicular fluid obtained during IVF: relation of the peptide content with follicular size. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1988; 119: 277-82.
58. D'Aniello G, Grieco N, Di Filippo MA, et al. Reproductive implication of D-aspartic acid in human pre-ovulatory follicular fluid. *Hum Reprod* 2007; 22: 3178-83.
59. Itskovitz J, Rubattu S, Rosenwaks Z, Liu HC, Sealey JE. Relationship of follicular fluid prorenin to oocyte maturation, steroid levels, and outcome of *in vitro* fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 165-71.
60. Botero-Ruiz W, Laufer N, DeCherney AH, Polan ML, Haseltine FP, Behrman HR. The relationship between follicular fluid steroid concentration and successful fertilization of human oocytes *in vitro*. *Fertil Steril* 1984; 41: 820-6.
61. Tarlatzis BC, Laufer N, DeCherney AH, Polan ML, Haseltine FP, Behrman HR. Adenosine 3',5'-monophosphate levels in human follicular fluid: relationship to oocyte maturation and achievement of pregnancy after *in vitro* fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60: 1111-5.
62. Lee MS, Ben-Rafael Z, Meloni F, Mastroianni Jr L, Flickinger GL. Relationship of human oocyte maturity, fertilization, and cleavage to follicular fluid prolactin and steroids. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1987; 4: 168-72.
63. Reinthaller A, Deutinger J, Bieglmayer C, et al. Hormonal parameters in follicular fluid and the fertilization rate of *in vitro* cultured oocytes. *Arch Gynecol* 1987; 240: 207-10.
64. Kreiner D, Liu HC, Itskovitz J, Veeck L, Rosenwaks Z. Follicular fluid estradiol and progesterone are markers of preovulatory oocyte quality. *Fertil Steril* 1987; 48: 991-4.
65. Subramanian MG, Sacco AG, Moghissi KS, et al. Human follicular fluid: prolactin is biologically active and ovum fertilization correlates with estradiol concentration. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1988; 5: 129-33.
66. Basuray R, Rawlins RG, Radwanska E, et al. High progesterone/estradiol ratio in follicular fluid at oocyte aspiration for *in vitro* fertilization as a predictor of possible pregnancy. *Fertil Steril* 1988; 49: 1007-11.
67. Kobayashi T, Oda T, Yoshimura Y, Takehara Y, Natori M, Nozawa S. Androstenedione and progesterone concentrations in preovulatory follicular fluid correlate with successful fertilization and cleavage of human oocytes *in vitro*. *Fertil Steril* 1991; 56: 301-5.
68. Vanluchene E, Hinting A, Dhont M, De Sutter P, Van Maele G, Vandekerckhove D. Follicular fluid steroid levels in relation to oocyte maturity and *in vitro* fertilization. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991; 38: 83-7.
69. Enien WM, el Sahwy S, Harris CP, Seif MW, Elstein M. Human chorionic gonadotrophin and steroid concentrations in follicular fluid: the relationship to oocyte maturity and fertilization rates in stimulated and natural *in vitro* fertilization. *Hum Reprod* 1995; 10: 2840-4.
70. Teissier MP, Chable H, Paulhac S, Aubard Y. Comparison of follicle steroidogenesis from normal and polycystic ovaries in women undergoing IVF: relationship between steroid concentrations, follicle size, oocyte quality and fecundability. *Hum Reprod* 2000; 15: 2471-7.
71. Messinis IE, Templeton AA. Relationship between intrafollicular levels of prolactin and sex steroids and *in vitro* fertilization of human oocytes. *Hum Reprod* 1987; 2: 607-9.
72. Berger MA, Laufer N, Lewin A, et al. Cholesterol and steroid levels in human follicular fluids of human menopausal gonadotropin-induced cycles for *in vitro* fertilization. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1987; 4: 30-3.
73. Rosenbusch B, Djalali M, Sterzik K. Is there any correlation between follicular fluid hormone concentrations, fertilizability, and cytogenetic analysis of human oocytes recovered for *in vitro* fertilization? *Fertil Steril* 1992; 57: 1358-60.
74. Costa LO, Mendes MC, Ferriani RA, Moura MD, Reis RM, Silva de Sá MF. Estradiol and testosterone concentrations in follicular fluid as criteria to discriminate between mature and immature oocytes. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37: 1747-55.
75. Vitale AM, Calvert ME, Mallavarapu M, et al. Proteomic profiling of murine oocyte maturation. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 608-16.

- 76.** Alfieri JA, Martin AD, Takeda J, Kondoh G, Myles DG, Primakoff P. Infertility in female mice with an oocyte-specific knockout of GPI-anchored proteins. *J Cell Sci* 2003; 116: 2149-55.
- 77.** Calvert ME, Digilio LC, Herr JC, Coonrod SA. Oolemmal proteomics: identification of highly abundant heat shock proteins and molecular chaperones in the mature mouse egg and their localization on the plasma membrane. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 27.
- 78.** Rubinstein E, Ziyat A, Wolf JP, Le Naour F, Boucheix C. The molecular players of sperm-egg fusion in mammals. *Semin Cell Dev Biol* 2006; 17: 254-63.
- 79.** Boissonnas CC, Montjean D, Lesaffre C, et al. Role of sperm alpha5beta3 integrin in mouse fertilization. *Dev Dyn* 2010; 239: 773-83.
- 80.** Yurttas P, Morency E, Coonrod SA. Use of proteomics to identify highly abundant maternal factors that drive the egg-to-embryo transition. *Reproduction* 2010; 139: 809-23.
- 81.** Tong ZB, Gold L, Pfeifer KE, et al. Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nat Genet* 2000; 26: 267-8.
- 82.** Zhang P, Ni X, Guo Y, et al. Proteomic-based identification of maternal proteins in mature mouse oocytes. *BMC Genomics* 2009; 10: 348.
- 83.** Howell CY, Bestor TH, Ding F, et al. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell* 2001; 104: 829-38.
- 84.** Li L, Baibakov B, Dean J. A subcortical maternal complex essential for preimplantation mouse embryogenesis. *Dev Cell* 2008; 15: 416-25.
- 85.** Zheng P, Dean J. Role of Filia, a maternal effect gene, in maintaining euploidy during cleavage-stage mouse embryogenesis. *PNAS* 2009; 106: 7473-8.
- 86.** Amano H, Itakura K, Maruyama M, Ichisaka T, Nakagawa M, Yamanaka S. Identification and targeted disruption of the mouse gene encoding ESG1 (PH34/ECAT2/DPPA5). *BMC Dev Biol* 2006; 6: 11.
- 87.** Bajoghli B. Evolution of the Groucho/Tle gene family : gene organization and duplication events. *Dev Genes and Evol* 2007; 217: 613-8.