



L'activation ovocytaire artificielle - AOA

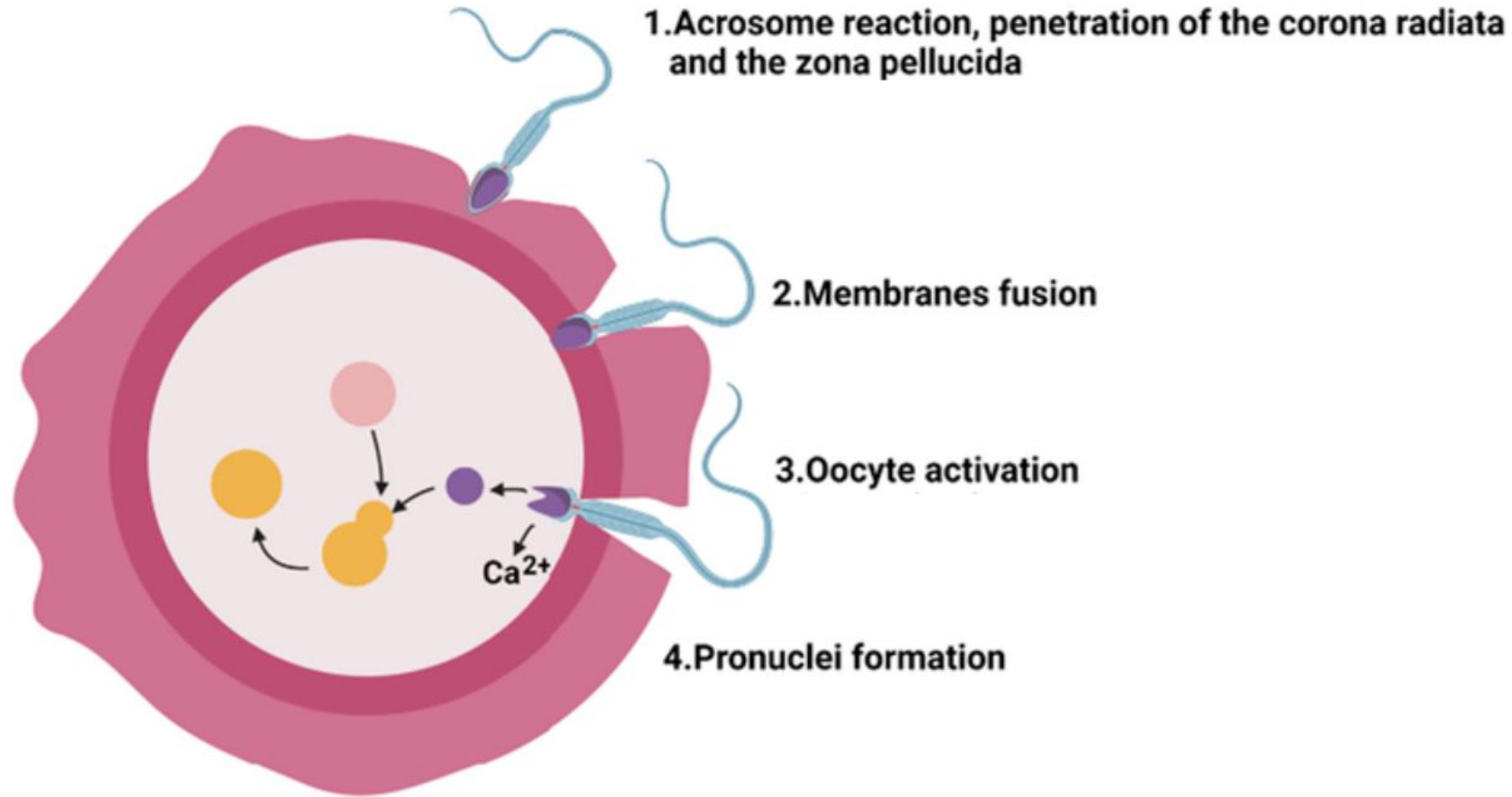
Pr Marine Poulain

marine.poulain@hopital-foch.com

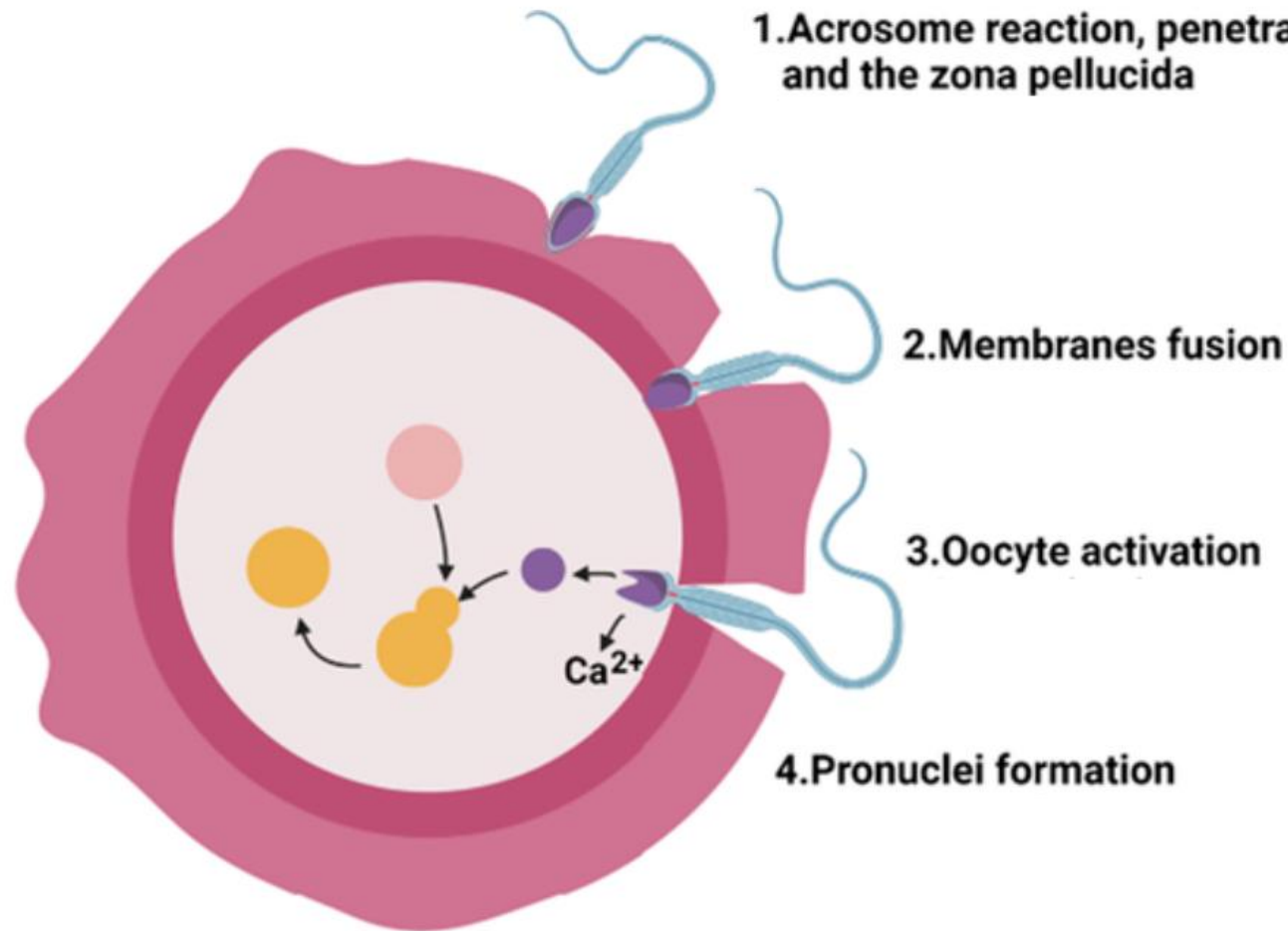
Centre AMP Foch/UVSQ

Activation ovocytaire physiologique (AO)

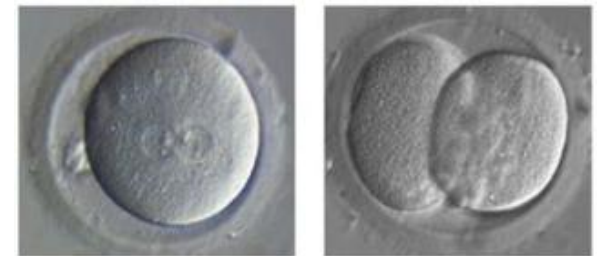
AO : transition ovocyte → embryo



AO : transition ovocyte → embryon

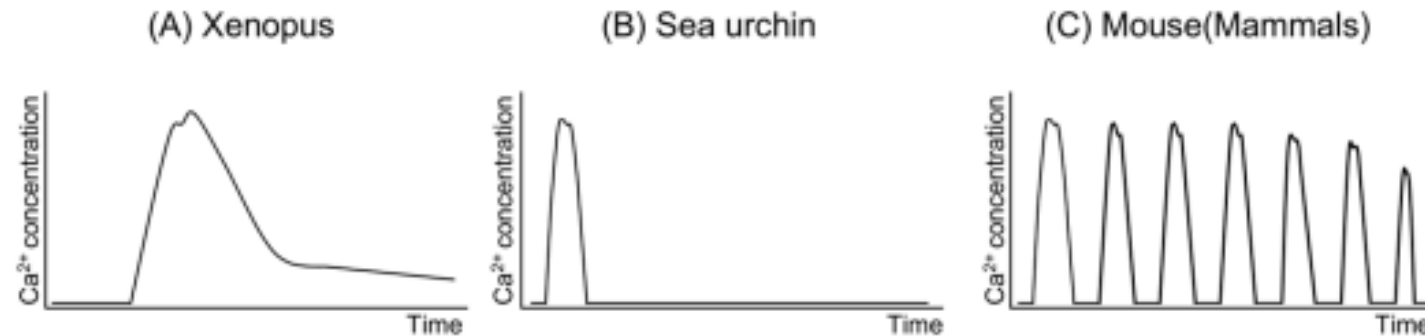


- Sortie de méiose – inactivation du MPF
- exocytose des granules corticaux – blocage de la polyspermie
- formation des pronoyaux mâle et femelle
- recrutement des ARNm maternels



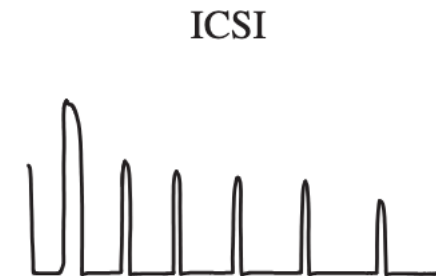
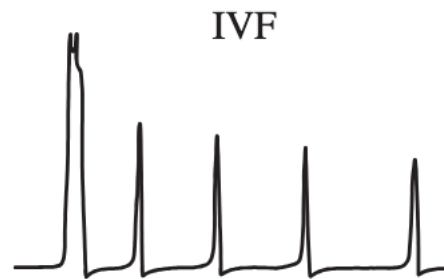
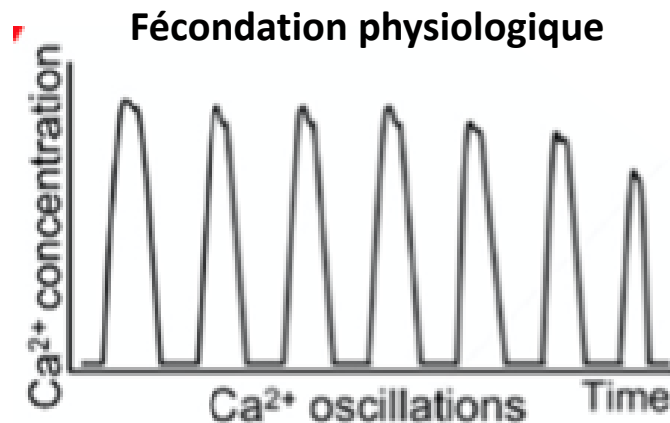
AO : signal calcique

- Mobilisation de calcium intracellulaire (Ca_i) à partir du RE
- Ca^{2+} = 2nd messenger ubiquitaire
- Signal Ca_i → cascades de signalisation intracellulaires → AO
- Signal conservé++ lors de la fécondation / variations du niveau de Ca_i sous forme d'oscillations calciques (intensité et fréquence selon les espèces)

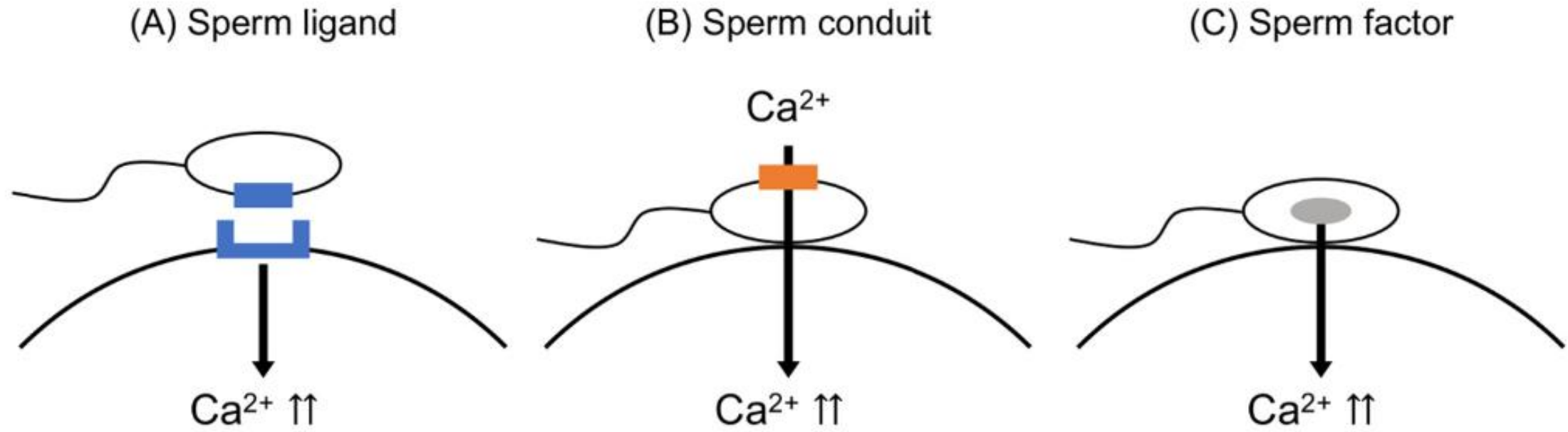


AO : signal calcique

- Mobilisation de calcium intracellulaire (Ca_i) à partir du RE
- Ca^{2+} = 2nd messenger ubiquitaire
- Signal Ca_i → cascades de signalisation intracellulaires → AO
- Signal conservé++ lors de la fécondation / variations du niveau de Ca_i sous forme d'oscillations calciques (intensité et fréquence selon les espèces)



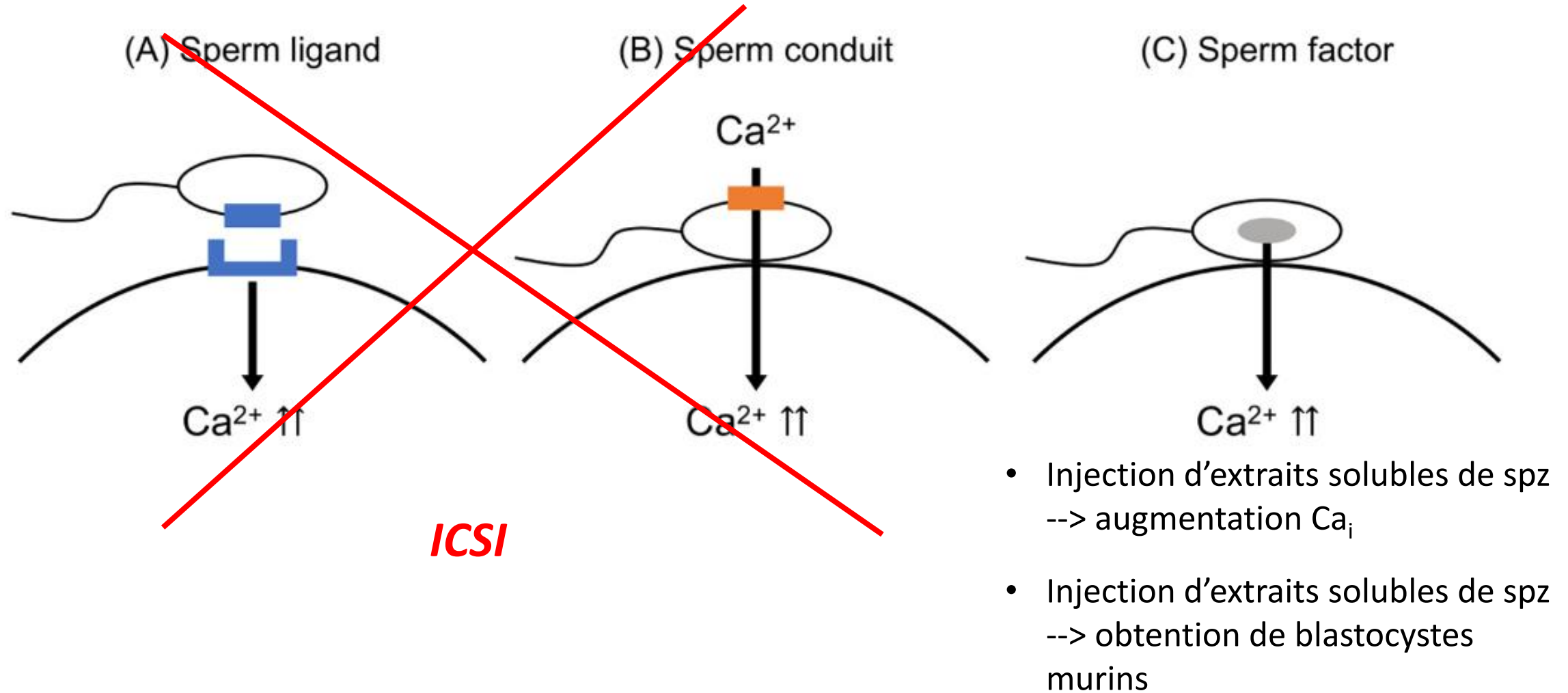
Facteur spermatique activateur du signal Ca^{2+} ?



Sperm oocyte-activating factor (SOAF)

- mécanisme ?
- quelle protéine ?

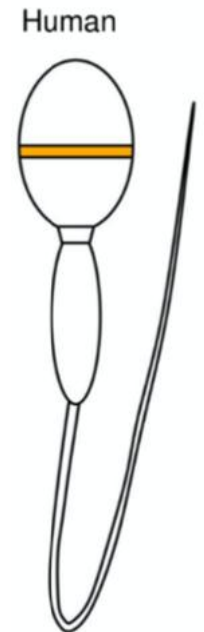
Facteur spermatique activateur du signal Ca^{2+} ?



→ facteur cyto-soluble spermatique libéré dans le cytoplasme ovocytaire au moment de la fusion gamétique

Découverte de PLCζ

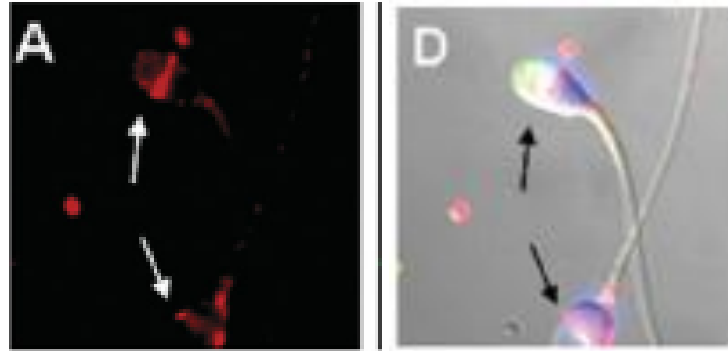
- Analyse d'extraits de sperme: conc élevée d'une phospholipase C (PLC) sperm-specific et de grande affinité pour le Ca^{2+} (*Saunders, Dev 2002*)
- Nommée Phospholipase C zeta / PLCζ (gène Plcz1)
- Détectée chez souris, rat, humain, singe, chevaux, bovins, cochon et poisson medaka.
- Hautement conservée
- Localisation: espèce-dépendante



Découverte de PLC ζ

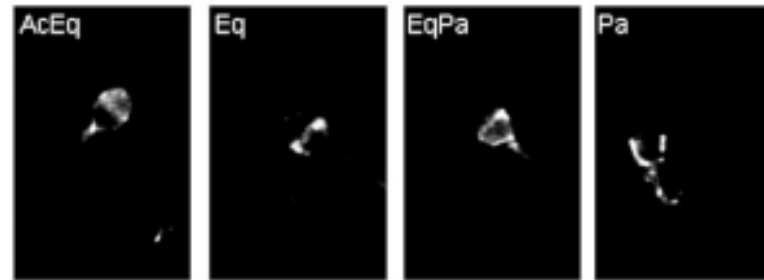
- Localisation chez l'humain

Spz hommes fertiles
capacités ou non



Région équatoriale
(localisation la + fréquente)

Différentes localisations
possibles:



Région acrosomale + équatoriale
Région équatoriale
Région équatoriale + post-
acrosomale
Région post-acrosomale

→ Profils différents

→ Impact sur le pouvoir fécondant ?

Découverte de PLC ζ

Development 129, 3533-3544 (2002)
Printed in Great Britain © The Company of Biologists Limited 2002
DEV7973

PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development

Christopher M. Saunders¹, Mark G. Larman², John Parrington³, Llewellyn J. Cox¹, Jillian Royse¹, Lynda M. Blayney¹, Karl Swann² and F. Anthony Lai^{1,*}

¹Cell Signalling Laboratory, Wales Heart Research Institute, University of Wales College of Medicine, Cardiff CF14 4XN, UK

²Department of Anatomy and Developmental Biology, University College, London WC1E 6BT, UK

³Department of Physiology, University College, London WC1E 6BT, UK

*Author for correspondence (e-mail: lait@cf.ac.uk)

Accepted 1 May 2002

- Injection Plcz1 mRNA dans des ovocytes murins:
 - oscillations calciques (identiques FIV)
 - développement embryonnaire (taux blastulation 62%)

Découverte de PLC ζ

- **Modèles animaux:** KO conditionnels murins (*Knott, 2005; Yoshida, 2007; Hachem, 2017; Nozawa, 2018*)
 - Diminution du taux de fécondation par défaut d'AO
 - Diminution du taux de blastulation par zygotes
- **Humain :** anomalies PLC ζ , variants du gène *Plcz1* (*Heytens, 2009; Escoffier, 2016; Kashir, 2011; Torra-Massana, 2019; Dai, 2020; Yuan, 2020*)
 - Infertilité
 - Défaut d'AO

Autres mécanismes d'AO ?

- **D'autres protéines que PLC ζ ?**

Protéine PAWP (*Wu et al, 2007; Aarabi et al, FS 2014*)

→ Localisation précise: thèque périnucléaire de la région post-acrosomale

→ expérimentations animales: oscillations calciques et formation des PN

PLC δ 4 (*Philipps, 2011*)

Rôle encore incertain de ces protéines dans la fécondation/développement embryonnaire
Mécanismes précis non connus

- **Autre ion divalent ?**

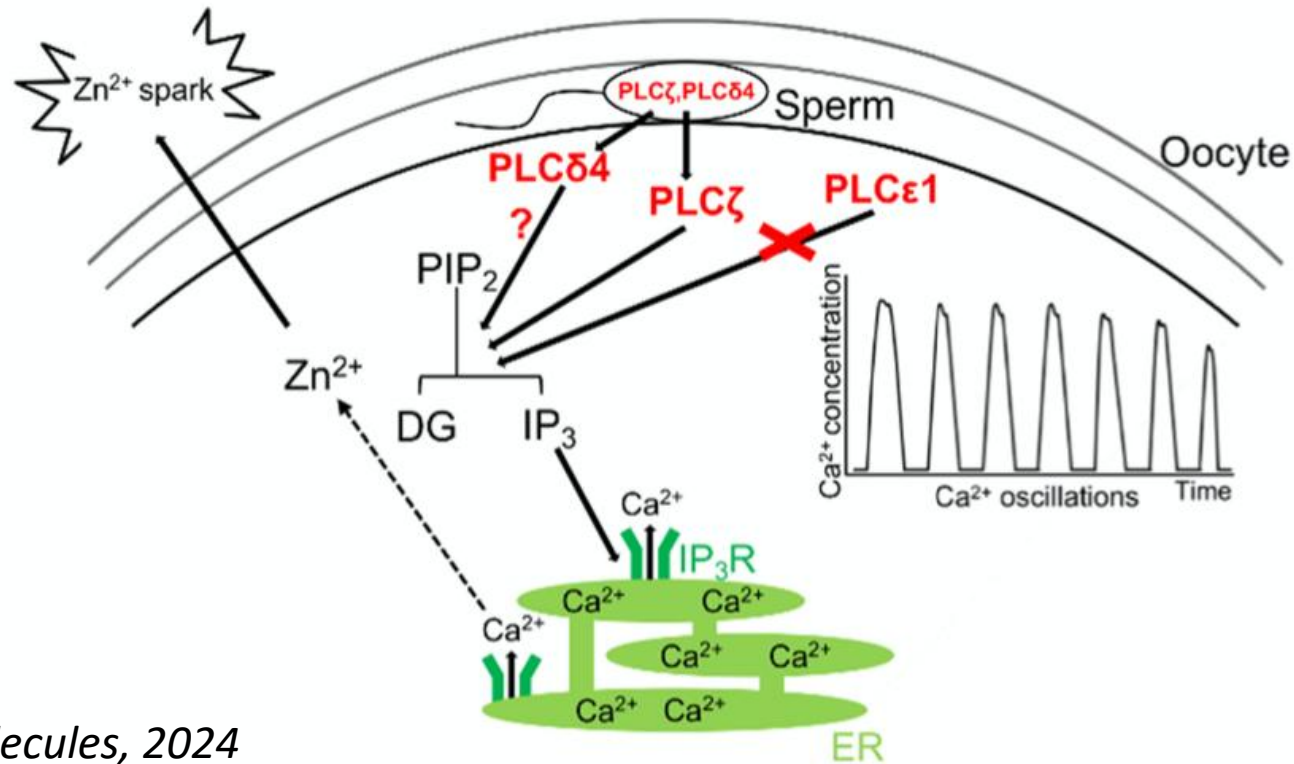
Ion zinc Zn $^{2+}$ (*Suzuki, 2010*)

→ Déclencheur initial de l'augmentation de Ca $_i$

→ rôle à confirmer

AO résumé

- Mécanisme compliqué, non élucidé complètement
- Importance ++ de l'élévation de Ca_i
- Mécanisme
 - 1: élévation de Ca_i au moment de la fusion gamétique – mécanisme inconnu
 - 2: élévation oscillatoire de Ca_i sous l'action de $\text{PLC}\zeta$



Activation ovocytaire artificielle (AOA)

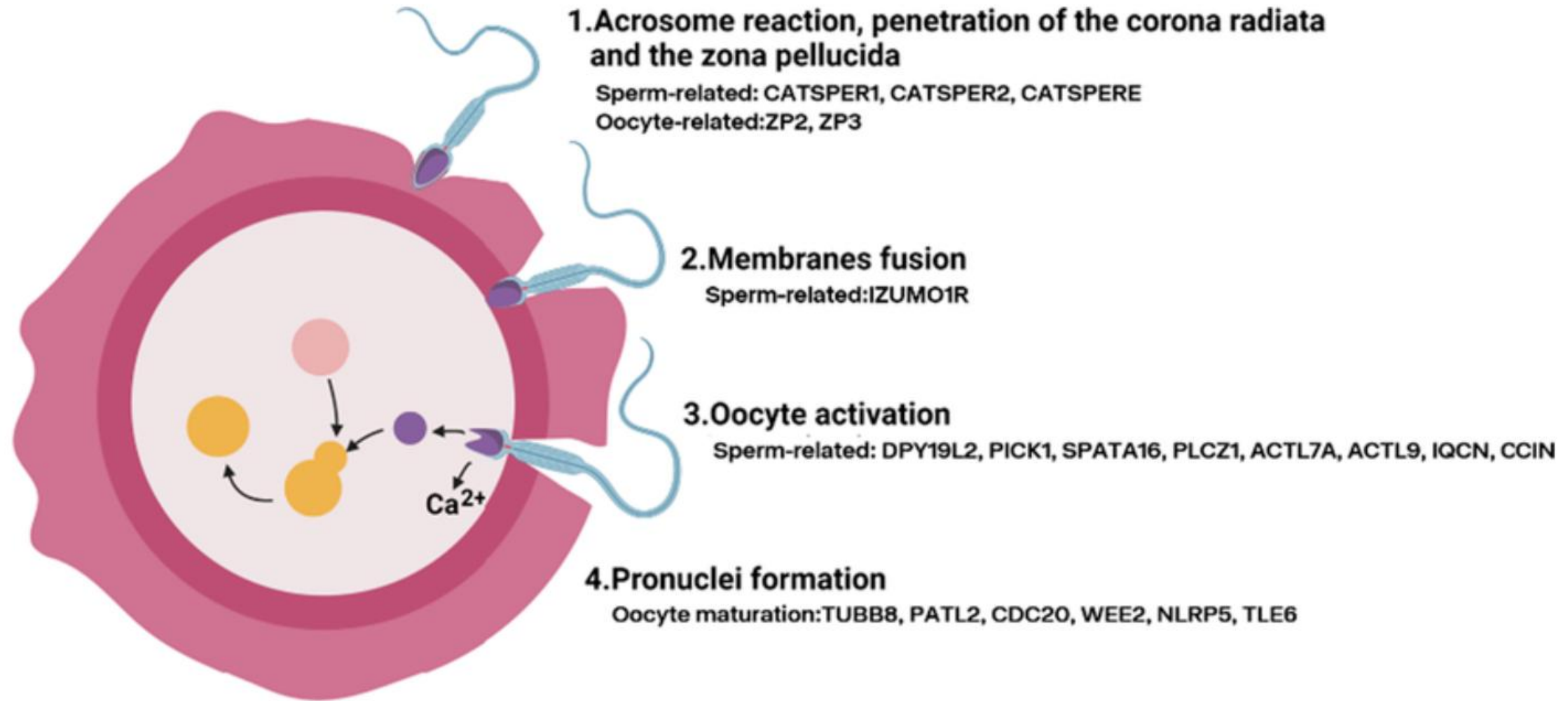
Pourquoi ?

- Taux de fécondation cible en ICSI > 65%
- Echec total de fécondation en ICSI: 1 à 5% des cycles d'ICSI
- Pauci-fécondation en ICSI (<25% 2PN/MII, def variable) : 5 à 25 % des cycles d'ICSI
- Echec récurrents de fécondation en ICSI dans une minorité de cas
(Flaherty 1998)

Pourquoi ?

- Causes de ces échecs:
 - **Défaut d'activation ovocytaire – 40 à 70% des cas** (*Rubino 2016*)
 - Anomalies ovocytaires: défaut du fuseau méiotique, blocage du cycle cellulaire
 - Anomalies spermatiques sévères: défaut compaction ADN spermatique, globozoospermie, teratospermie sévère
 - Problème technique sans anomalie gamétique (rendement ponction anormalement faible, préparation spz et ICSI)

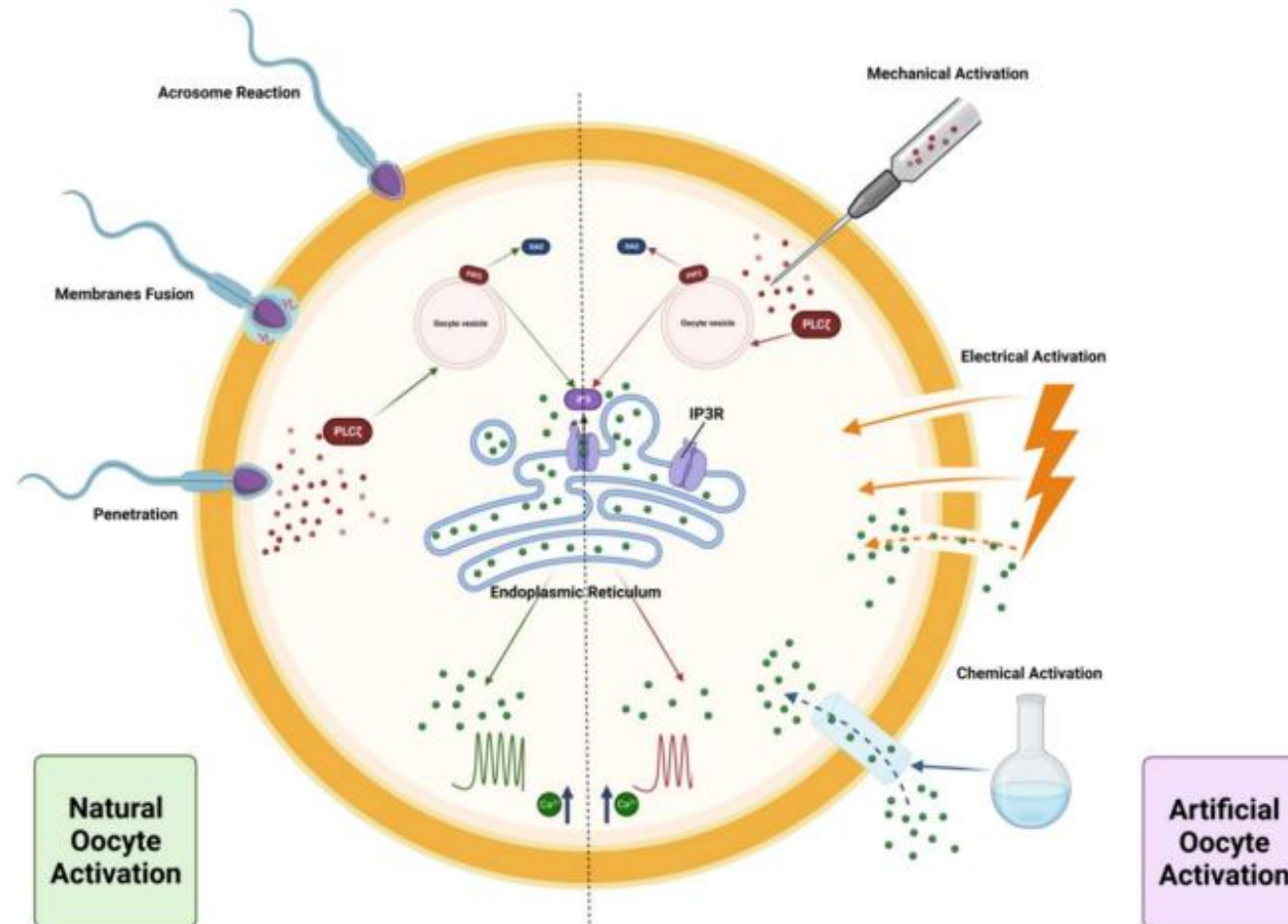
Quelques gènes responsables



Fertilization process and genetic causes of fertilization failure

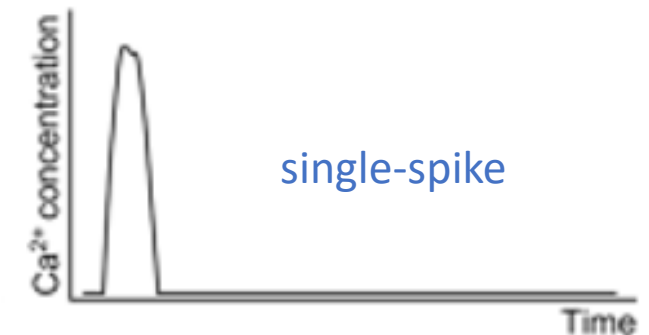
AOA - technique

- **Principe:** intervention permettant un afflux +/- oscillations de concentrations en calcium intracellulaire dans l'ovocyte



AOA - technique

- **Activation mécanique par ICSI modifiée :**
 - Aspirations vigoureuses du cytoplasme ovocytaire pendant l'ICSI
 - Spz déposé au centre de l'ovocyte (proche RE?)
 - 1^{ère} naissance en 2002 (*Tesarik et al, FS 2002*)
 - Peu de publications

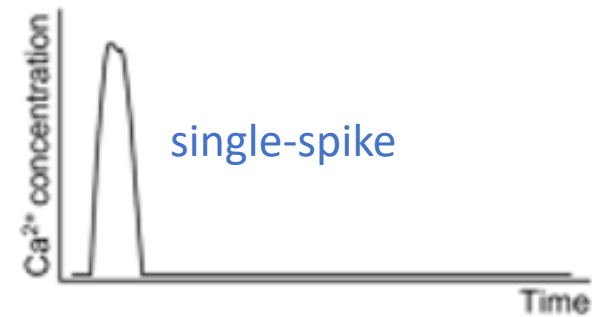


(Tesarik 2002, Ebner 2004)

AOA - technique

- **Electro-activation :**

- Courant électrique appliqué dans le milieu de culture contenant les ovocytes
- Formation de pores dans la membrane plasmique ovocytaire: entrée de calcium extérieur (milieu de culture)
- 1^{ère} naissance en 2009 (*Mansour et al., 2009*)
- Autre utilisation: impulsion piézo-électrique sur le spz → amélioration du relargage des facteurs activateurs
- Peu de publications



AOA - technique

- **AOA chimique :**

- Courte incubation des ovocytes (10- 20min) après ICSI dans un milieu enrichi en activateurs → $\uparrow \text{Ca}_i$

Rinçage puis culture embryonnaire habituelle

- Utilisation de ionophores synthétiques de calcium: $\uparrow$ perméabilité plasmique à l'entrée de calcium ext + libération de Ca^{2+} par le RE (*Rybouchkin et al. FS 1997*)

- Utilisation du chlorure de strontium: Libération de Ca^{2+} par le RE, mécanisme mal connu (*Yanagida et al. RBMO 2006; Anifandis, 2019*)

- Utilisation de hPLC ζ recombinante / hPLC ζ mRNA

En développement (modèles animaux)

(*Kashir, 2011; Nomikos, 2013; Sanusi et al, Mol Hum Reprod 2015; Saleh, Biomedecines 2024*)

AOA - technique

- **AOA chimique :**

Ionophores calciques

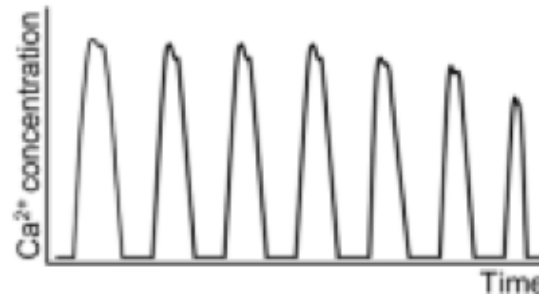
- Calcimycine (A23187)
- Ionomycine (19657)
 - Puromycine

GM508 Cult-Active / A23187



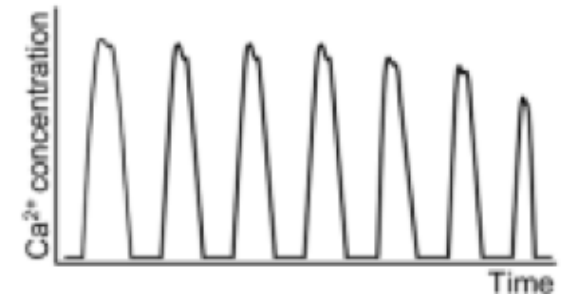
Chlorure de strontium

- SrCl_2
- très peu d'études
 - efficacité controversée



PLCz

- hPLCz recombinante / utilisation de modèles cellulaires ou bactériens, protéines de fusion
- hPLCz mRNA / pas de contrôle de la production protéique
- peu d'études sur dev embryonnaire après utilisation



Indications et résultats

Anomalies de fécondation en ICSI

- Echecs totaux de fécondation en ICSI ou faible taux de fécondation en ICSI

Ebner et al, 2004; Heindryckx et al. HR 2005; Moaz et al. RBM 2006; Heindryckx et al. RBM 2008; Montag et al. RBM 2012; Vanden Meerschaut et al. HR 2012; Yoon et al. JARG 2013; Ebner et al. RBM 2015, Darwish et al, HR 2016; Hebisha et al, FS 2016; Fawzy et al, 2018; Karabulut et al, 2018; Li et al, 2019; Nazarian et al, 2019; Cheung et al, 2020; Cheung et al, 2021

- N = 3 à 101
- facteur spz (globozoospermie) recherché ou non précisé
- taux seuil de faible de fécondation souvent non précisé
- Globalement amélioration positive des issues des cycles (taux de fec/LBR) avec AOA comparé au cycle précédent sans AOA

- AOA sur ICSI-rescue

Peu d'études

Intérêt discuté de l'ICSI-rescue

Zhang et al. FS 1999; Manipalviratn et al. J Reprod Med 2006; Esbert et al, FS 2021;

Anomalies de fécondation en ICSI

The benefit of artificial oocyte activation is dependent on the fertilization rate in a previous treatment cycle

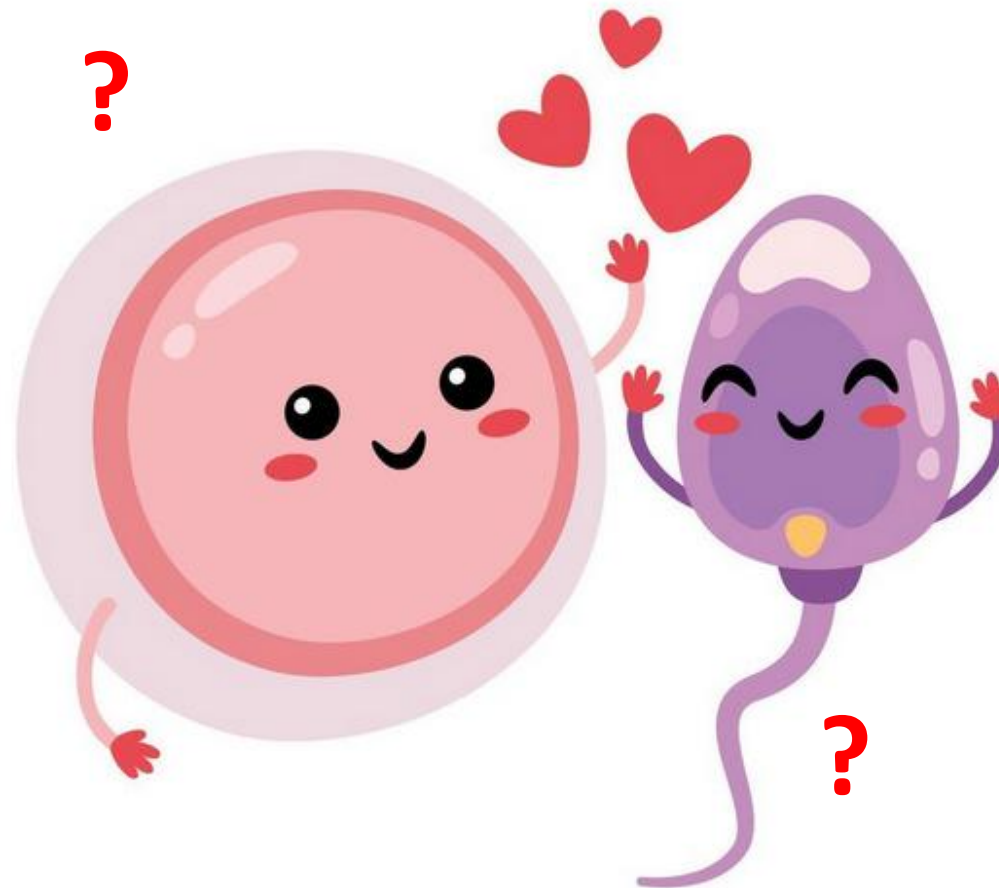
Markus Montag ^{a,b,*}, Maria Köster ^b, Katrin van der Ven ^b, Ulrike Bohlen ^b,
Hans van der Ven ^b

Reproductive BioMedicine Online (2012) 24, 521–526

	Couples n (sous-groupes)	Cycles		Fécondation 2 Pronucléi (%)		% grossesse clinique (%)		Naissances vivantes (%)		Enfants nés
		Contrôle	Test	Contrôle	Test	Contrôle	Test	Contrôle	Test	
Montag et al. 2012 (64)	27 (Echec de fécondation)	31	39	0%	41,6%**	0%	18,8% _(c) *	0%	12,8% _(b) *	5
	38 (TF 1-29%)	47	58	19,3 %	44,4%**	12,8% _(b)	31,4% _(c) *	12,8% _(b)	24,1% _(b)	14
	24 (TF 30-50%)	25	32	36,8%	56,1%**	16,0 %	27,6% _(c)	8,0% _(b)	18,8% _(b)	6

Anomalies de fécondation en ICSI

- Echecs totaux de fécondation en ICSI ou faible taux de fécondation en ICSI



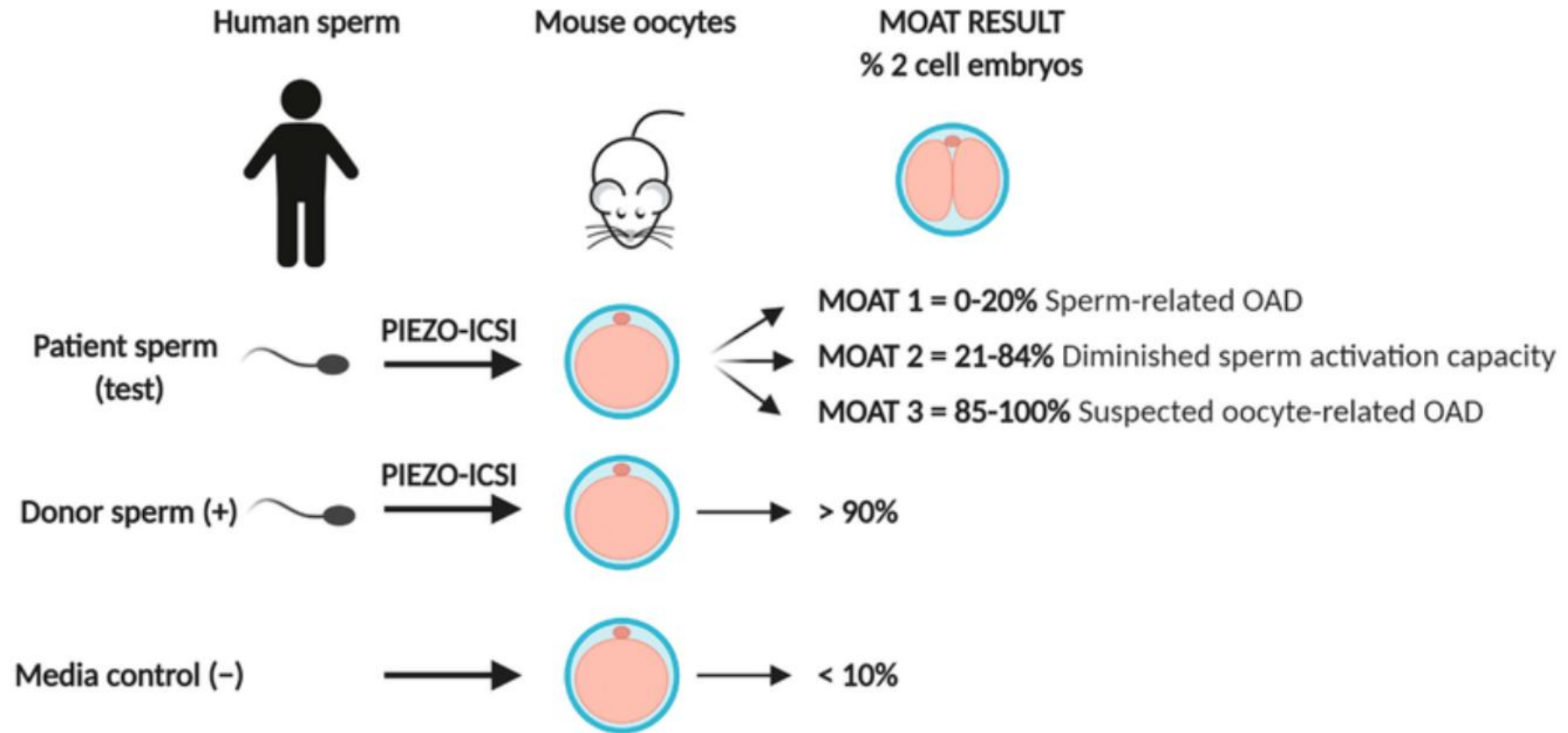
az et al. RBM 2006; Heindryckx et al.
perschaut et al. HR 2012; Yoon et al.
, HR 2016; Hebisha et al, FS 2016;
2019; Nazarian et al, 2019; Cheung et

ou non précisé
nt non précisé
sues des cycles (taux de
cédent sans AOA

Intérêt discuté de l'ICSI-rescue

Zhang et al. FS 1999; Manipalviratn et al. J Reprod Med 2006; Esbert et al, FS 2021;

MOAT – mouse oocyte activation test

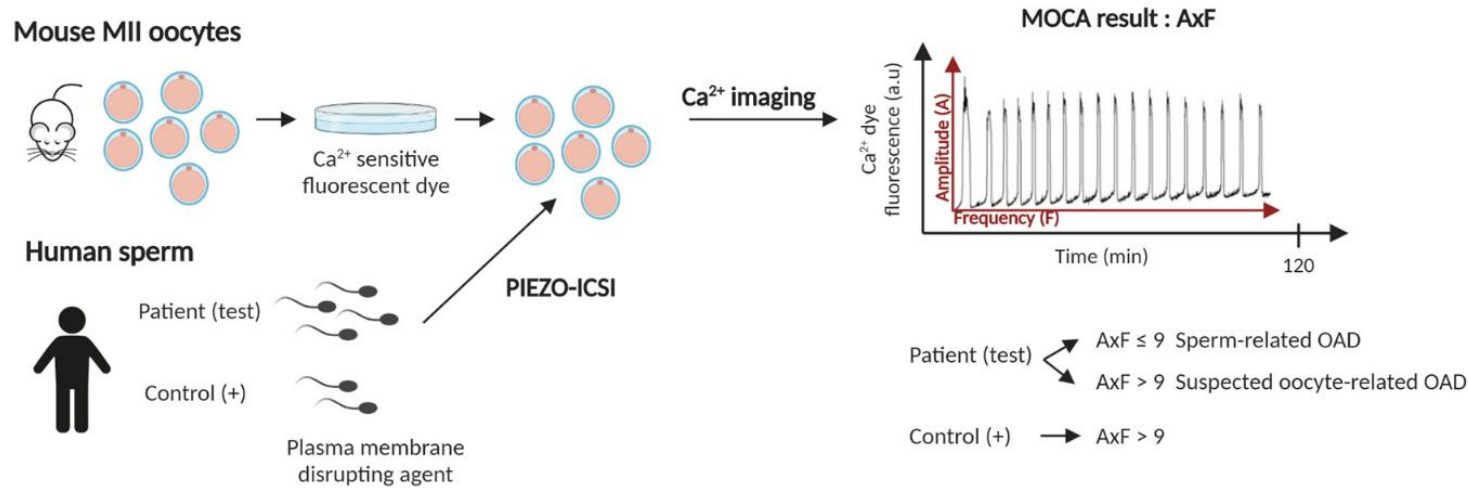


→ Evaluation du taux de fécondation d'ovocytes de souris avec sperme patient et sperme contrôle

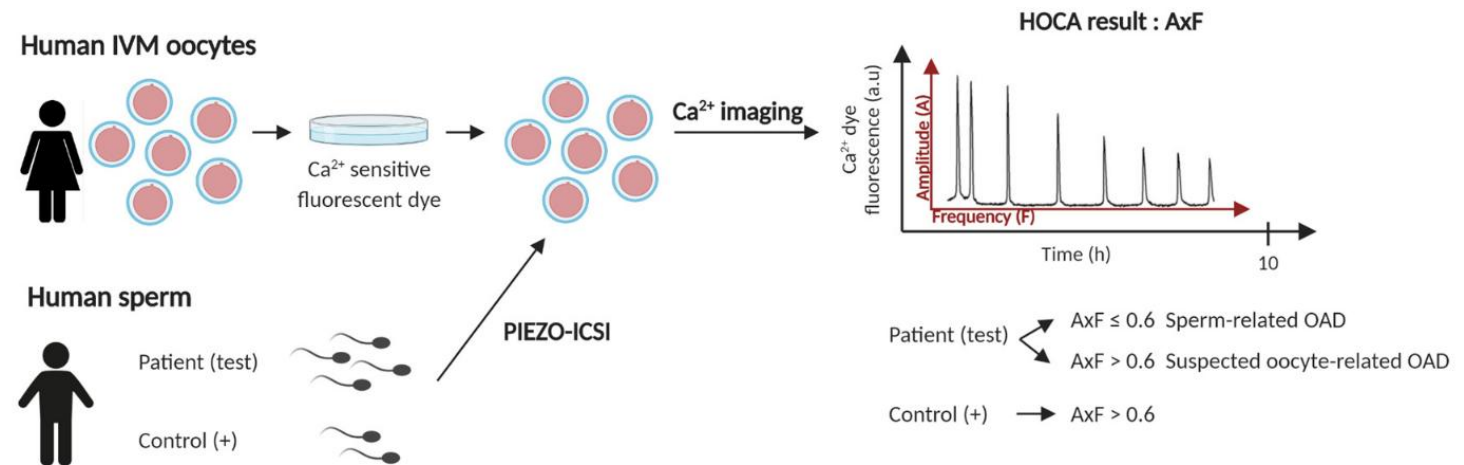
→ Vérifier une origine plutôt masculine ou féminine

OCA – oocyte calcium analysis (mouse or human)

(A) MOCA



(B) HOCA



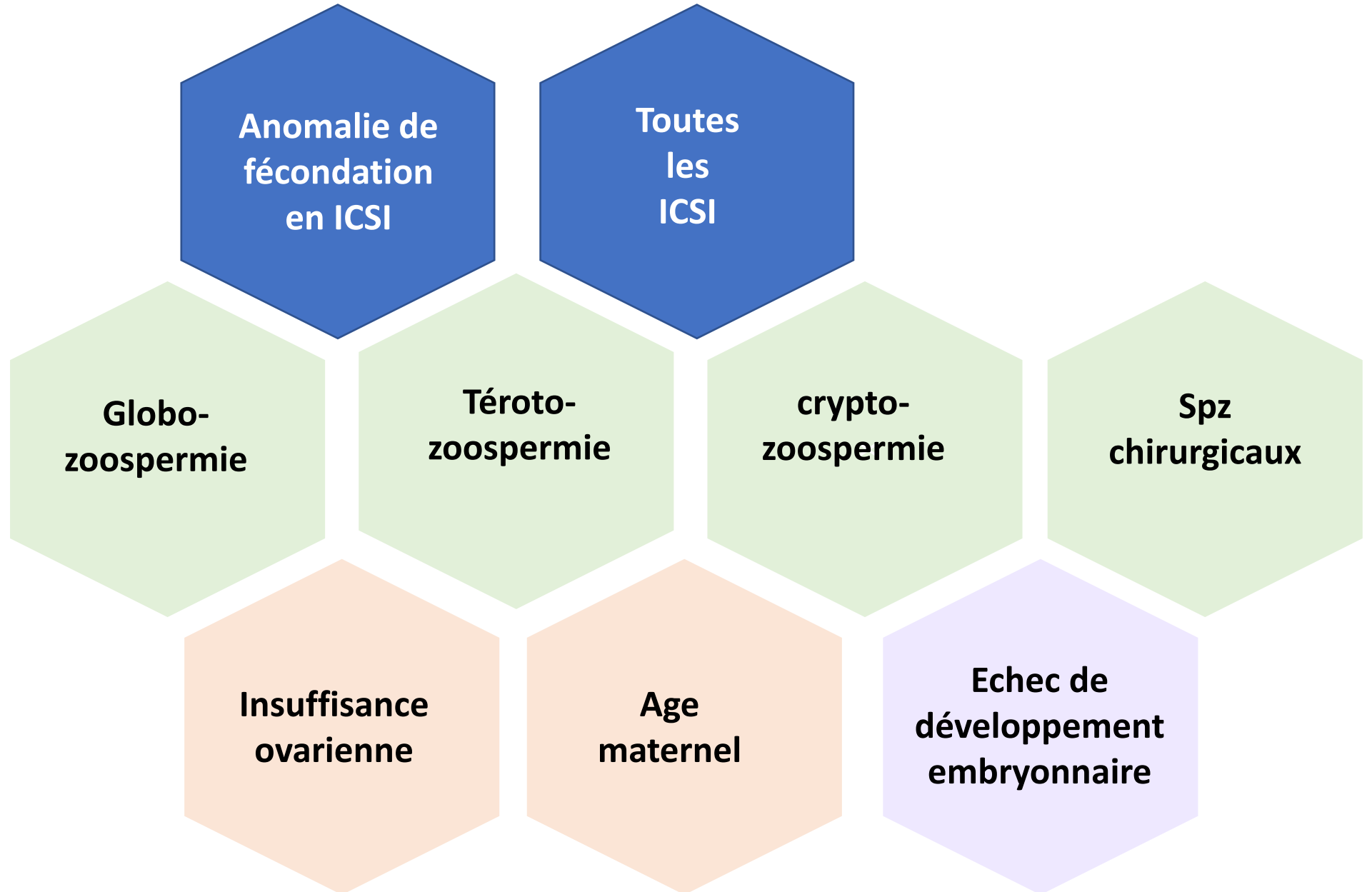
→ Analyser le signal calcique après fécondation

→ Pb éthique pour le test HOCA

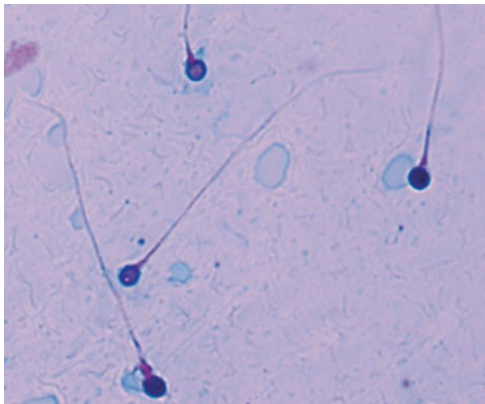
Test PLCζ

- Exploration de l'expression de la PLCz
- western-blot, IF ou RT-PCR
- permet de quantifier l'expression protéique de PLCz +/- apprécier la localisation de la protéine
- Permet de préciser le diagnostic

Indications publiées



Globozoospermie



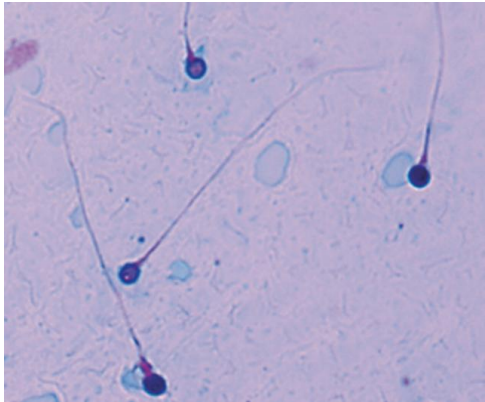
- Anomalie morphologique de la tête du spz: hypotrophie ou absence d'acrosome

Globozoospermie de type I, complète: 100% des spz

Globozoospermie de type II, partielle: >20% des spz

- Altération du pouvoir fécondant (déficit partiel ou complet de PLC ζ)
- Défaut de compaction de la chromatine
- Altération du cytosquelette
- Echec de fécondation total ou taux de fécondation très altérés en ICSI classique
- Mutation génique décrites: DPY19L2, PICK I et SPATA16

Globo- zoospermie



- *Heindryckx et al. 2005, Kuentz et al. 2013, Tavalae et al. 2016, Li et al. 2019, Cheung et al, 2021*
- Taux de fécondation largement amélioré par l'AOA
- Issues cliniques pas toujours rapportées
< 100 patients rapportés
< 50 enfants nés rapportés
- impact du type de mutation (défaut de compaction de la chromatine --> défaut de développement embryonnaire++)

- indications validées
- résultats très variables

Anomalie de
fécondation
en ICSI

Toutes
les
ICSI

- indications difficilement recevables
- ↑ taux de fécondation éventuel
- pas d'amélioration des issues cliniques

Globo-
zoospermie

Téroto-
zoospermie

crypto-
zoospermie

Spz
chirurgicaux

Insuffisance
ovarienne

Age
maternel

Echec de
développement
embryonnaire

Littérature scientifique

- Peu d'études avec faible risque de biais
- Très peu de RCT (uniquement méthode chimique)
- Grande hétérogénéité (méthode d'AOA, protocole, cycles inclus, cause potentielle...)
- Très peu d'études comparant différentes techniques d'AOA
- Comparaison: groupe AOA vs groupe ctr
randomized sibling oocytes ICSI-AOA versus ICSI
cycle 2 avec AOA versus cycle 1 sans AOA

- Inclusion de 20 études pour l'analyse qualitative et 13 pour l'analyse quantitative
 - Critère de jugement principal = LBR
 - Critères secondaires: taux de FCS, taux de fécondation
 - Comparaison AOA versus contrôle
- Tous patients
par sous-groupes

- Inclusion de 20 études pour l'analyse qualitative et 13 pour l'analyse quantitative
 - Critère de jugement principal = LBR
 - Critères secondaires: taux de FCS, taux d'échec de fécondation, développement embryonnaire
 - Comparaison AOA versus contrôle
- Tous patients
par sous-groupes

- Diminution significative du risque d'échec de fécondation

RR= 0,05 pour les RCT 

RR = 0,89 pour l'ensemble des études 

RR = 0,09 pour ATCD d'échec ou paucifecondation 

- Diminution du taux de FCS

RR= 0,99 pour les RCT 

RR = 1,05 pour l'ensemble des études 

RR = 0,78 pour ATCD d'échec ou paucifecondation 

- Augmentation du LBR

RR= 1,97 pour les RCT 

RR =1,93 pour l'ensemble des études 

RR = 2,13 pour ATCD d'échec ou paucifecondation 

- **Conclusion :**

- Nombreux biais

- Interpréter les résultats avec précaution

- Pas de preuve du bénéfice de l'AOA pour les femmes en protocole d'ICSI

- potentiel intérêt de l'AOA dans le sous-groupe avec antécédent d'échec de fécondation ou pauci-fécondation en terme de LBR

Meta-analyse JARG 2025 (Zhang et al)

- Inclusion de 12 études pour l'analyse quantitative
 - Critère de jugement principal = LBR
 - Critères secondaires: taux de FCS, taux d'échec de fécondation, développement embryonnaire
 - Comparaison AOA versus contrôle
- Tous patients
par sous-groupes: avec ou sans facteur de « fertilisation »

Meta-analyse JARG 2025 (Zhang et al)

- **Conclusion :**

- LBR augmenté particulièrement dans le groupe avec ATCD d'échecs de fécondation (OR 11,15 dans le groupe « avec facteurs de fertilisation »)
- Pas de bénéfice de l'AOA en termes de FCS, développement embryonnaire (taux de clivage, blastulation et grade)
- Peu de recul sur la santé des enfants, technique à restreindre à certaines indications

Sécurité de la technique

Risques liés à la technique

- Augmentations des niveaux de Ca^{2+}
 Ca^{2+} 2nd messenger ubiquitaire --> activation d'autres voies de signalisation ?
- Oscillations calciques non physiologiques
- Modulation du signal calcique:
 - risque d'anomalies du cycle cellulaire ?
 - effets sur l'expression génique ?
 - effets épigénétique ?
- Nombre de naissance rapportées encore faible et souvent restreint aux données péri-natales

Santé des enfants

- Environ 300-400 naissances rapportées
- **Données globalement rassurantes**
- Santé des enfants :
11 malformations rapportées (3 majeures)

1 mort néonatale

Pas de trouble du neurodéveloppement ni de l'apprentissage chez 41 enfants suivis



Ebner et al. 2012; Mateizel et al. 2018

Mateizel et al. 2018

D'haeseleer et al. 2014

Vanden Meerschaut et al. 2014

Recommendations

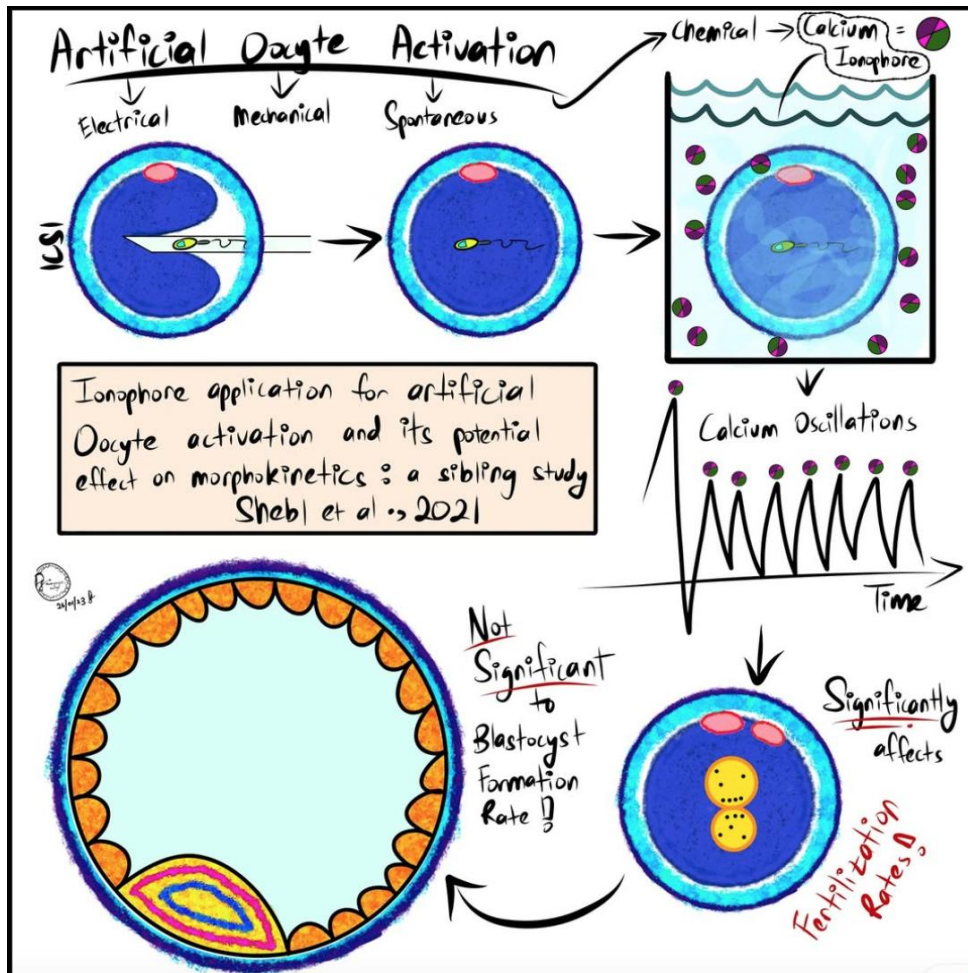
- **France:**

Technique non inscrite sur la liste des procédés biologiques utilisés en AMP et des techniques visant à améliorer les procédés biologiques autorisés
= AOA n'est pas autorisé

- **UK:**

« AOA is regarded by the HFEA as a treatment 'add on'. This means that there is a conflicting body of evidence and further research is required to prove its benefit. »

Conclusion



- AOA par méthode chimique la plus répandue
- manque de standardisation de la méthode
- Résultats encourageants pour les échecs de fécondation en ICSI avec anomalie de fécondance du spz
- Autres indications discutables
- Santé des enfants rassurante
- données restent insuffisantes
- Absence de recommandations pour l'AOA voire d'autorisation en France
- Résultats de la PLC ζ tardent à être publiés



Merci !



Service AMP Foch
BLEFCO

Sérine Hamdane et l'équipe d'Antoine Béclère
Nathalie Sermondade, Tenon

