UFR de Pharmacie
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES Grenoble Alpes
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
Grenoble INP

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 n’a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

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 au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.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/juridique/droit-auteur
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2015 N°

PROKINETICINE 1 : NOUVEAU BIOMARQUEUR DE L'IMPLANTATION EMBRYONNAIRE EN FECONDATION *IN VITRO.*

THÈSE
PRESENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

DIPLÔME D'ÉTAT

Sophie BROUILLET

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le : 13/10/2015

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury : Mme le Dr. Delphine ALDEBERT

Directrice de thèse : Mme le Pr. Sylviane HENNEBICQ

Tuteur universitaire : Mr. le Dr. Jean BRETON

Membres :

Mme le Dr. Nathalie BARDIN

Mr le Pr. Paul BARRIERE

Mme le Dr. Marie BIDART

Mr le Dr. Jean-Jacques FEIGE

La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

UFR de Pharmacie de Grenoble

Université Joseph Fourier GRENOBLE PHARMACIE

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70
Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Christophe RIBUOT**

Vice-doyen et Directrice des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2014-2015

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

STATUT	NOM	PRENOM	DEPARTEMENT**	LABORATOIRE
MCU	ALDEBERT	Delphine	D4	LAPM_UMR SNRS 5163
PU-PH	ALLENET	Benoit	D5	ThEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
PU	BAKRI	Aziz	D5	TIMC-IMAG
MCU	BATANDIER	Cécile	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU-PH	BEDOUCH	Pierrick	D5	ThEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
MCU	BELAIDI-CORSAT	Elise	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	BELLET	Béatrice	D5	-
PU	BOUMENDJEL	Ahcène	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	BOURGOIN	Sandrine	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
MCU	BRETON	Jean	D1	L.C.I.B. - UMR E3 CEA/UJF
MCU	BRIANCON-MARJOLLET	Anne	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	BUDAYOVA SPANO	Monika	D4	IBS
PU	BURMEISTER	Wim	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU-PH	BUSSER	Benoit	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
Professeur Emérite	CALOP	Jean	D5	-
MCU	CAVAILLES	Pierre	D1	LAPM
MCU	CHOISNARD	Luc	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU-PH	CORNET	Murielle	D4	THEREX, TIMC-IMAG
PU-PH	DANEL	Vincent	D5	SMUR SAMU
PU	DECOUT	Jean-Luc	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	DELETRAZ-DELPORTE	Martine	D5	Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128) UCB

Mise à jour le 17 novembre 2014 par Lantou FAURE NEUHAUSER

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70
Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr

MCU	**DEMEILLIERS**	**Christine**	D1	LBFA, Inserm U1055
PU	**DROUET**	**Christian**	D4	AGIM - CNRS 3405
PU	**DROUET**	**Emmanuel**	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	**DURMORT-MEUNIER**	**Claire**	D1	I.B.S
PU-PH	**FAURE**	**Patrice**	D1	HP2-Inserm U1042
PRCE	**FITE**	**Andrée**	D6	-
PRAG	**GAUCHARD**	**Pierre-Alexis**	D3	-
MCU-PH	**GERMI**	**Raphaëlle**	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	**GEZE**	**Annabelle**	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	**GILLY**	**Catherine**	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	**GODIN-RIBUOT**	**Diane**	D5	HP2-Inserm U1042
PRCE	**GOUBIER MATHYS**	**Laurence**	D6	-
Professeure Emérite	**GRILLOT**	**Renée**	D4	-
MCU	**GROSSET**	**Catherine**	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	**GUIEU**	**Valérie**	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	**HININGER-FAVIER**	**Isabelle**	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU	**JOYEUX-FAURE**	**Marie**	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	**KHALEF**	**Nawel**	D5	TIMC-IMAG
MCU	**KRIVOBOK**	**Serge**	D3	IRTSV
PU	**LENORMAND**	**Jean Luc**	D1	THEREX, TIMC-IMAG
PU	**MARTIN**	**Donald**	D1	TIMC-IMAG, UMR 5525 UJF-CNRS
MCU	**MELO DE LIMA**	**Christelle**	D4	L.E.C.A
PU-PH	**MOSSUZ**	**Pascal**	D4	THEREX, TIMC-IMAG
MCU	**MOUHAMADOU**	**Bello**	D3	L.E.C.A
MCU	**NICOLLE**	**Edwige**	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	**OUKACINE**	**Farid**	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	**PERES**	**Basile**	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	**PEUCHMAUR**	**Marine**	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	**PEYRIN**	**Éric**	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	**RACHIDI**	**Walid**	D1	L.C.I.B - UMR E3 CEA/UJF

Mise à jour le 17 novembre 2014 par Lantou FAURE NEUHAUSER

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70
Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr

MCU	**RAVELET**	**Corinne**	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	**RIBUOT**	**Christophe**	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	**RIEU**	**Isabelle**	D5	-
Professeure Emérite	**ROUSSEL**	**Anne -Marie**	D1	-
PU-PH	**SEVE**	**Michel**	D1	CR INSERM / UJF U823 Institut Albert Bonniot
MCU	**SOUARD**	**Florence**	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	**TARBOURIECH**	**Nicolas**	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
PAST	**TROUILLER**	**Patrice**	D5	-
MCU	**VANHAVERBEKE**	**Cécile**	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	**WOUESSIDJEWE**	**Denis**	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063

** **D1 : Département « Mécanismes Biologiques des Maladies et des Traitements (DMBMT)»**

D2 : Département «Bases Physicochimiques du Médicament »

D3 : Département «Origine, Obtention et Optimisation des Principes Actifs des Médicaments » (O3-PAM)

D4 : Département « Bases immunologiques, Hématologiques et Infectieuses des Maladies et Médicaments associés »

D5 : Département « Médicaments et Produits de Santé »

D6 : Département « Anglais »

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
CRI : Centre de Recherche Institut
CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
DCE : Doctorants Contractuels
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire et de Cognition et Ontogenèse »
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse
IPB :
IBS : Institut de Biologie Structurale
JR : Jean Roget
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
MCU : Maitres de Conférences des Universités
MCU-PH : Maîtres de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
PU : Professeurs des Universités
PU-PH : Professeurs des Universités et Praticiens Hospitaliers
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
UMR: Unité Mixte de Recherche
UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

Mise à jour le 17 novembre 2014 par Lantou FAURE NEUHAUSER

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS **1**

INTRODUCTION **2**

RAPPEL HISTORIQUE ET BIBLIOGRAPHIQUE **4**

1. LA FERTILITE 4
2. L'INFERTILITE 4
3. L'ASSISTANCE MEDICALE A LA PROCREATION 6

3.1. Les étapes communes aux trois techniques d'AMP *6*

3.1.1. La capacitation des spermatozoïdes 6
3.1.2. La stimulation ovarienne 6

3.2. Les trois techniques d'AMP *8*

3.2.1. L'insémination intra utérine 8
3.2.2. La fécondation *in vitro* 10

- LA PONCTION OVARIENNE 10
- LA RECHERCHE OVOCYTAIRE 12
- LA MISE EN FECONDATION 12
  - LA FIV CONVENTIONNELLE 12
  - LA FIV ASSISTEE PAR MICROINJECTION 12
- LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE 14
- LE TRANSFERT EMBRYONNAIRE 14
- LA CONGELATION EMBRYONNAIRE 16

4. AMELIORER LES RESULTATS EN FIV, MYTHE OU REALITE ? 16

4.1. Pourquoi augmenter les résultats en FIV *16*

4.1.1. Augmentation du recours aux techniques de FIV 16
4.1.2. Les résultats limités de la FIV 16
4.1.3. Les risques du transfert d'embryons multiples en FIV 18
4.1.4. Charge financière et psychologique de la FIV 18

4.2. Comment améliorer les résultats en FIV *20*

4.2.1. Evaluation de la compétence ovocytaire et spermatique 20
4.2.2. Evaluation de la compétence implantatoire des embryons 22
4.2.3. Evaluation de la réceptivité endométriale 24

5. LES PROKINETICINES 24

5.1. Expression des prokinéticines et de leurs récepteurs *24*

5.2. Rôle de PROK1 dans la fonction reproductive chez la femme *26*

5.2.1. Rôle de PROK1 dans la fonction ovarienne 26
5.2.2. Rôle de PROK1 dans l'endomètre 27
5.2.3. Rôle de PROK1 dans l'implantation embryonnaire 27
5.2.4. PROK1, biomarqueur de l'implantation embryonnaire en FIV? 27

OBJECTIF **29**

RESULTATS **31**

1. AXE 1 : CARACTERISER LE NIVEAU D'EXPRESSION DE PROK1 ET DE SES RECEPTEURS DANS LE MICROENVIRONNEMENT FOLLICULAIRE HUMAIN 31

1.1. CONTEXTE 31
1.2. APPROCHES EXPERIMENTALES 31
1.2.1. ECHANTILLONS BIOLOGIQUES ET PATIENTS 31

1.2.2. PROK1/PROKR DANS LE MICROENVIRONNEMENT FOLLICULAIRE 31
- LOCALISATION DE PROK1 ET DE SES RECEPTEURS DANS LE TISSU OVARIEN HUMAIN 31
- EXPRESSION DE PROK1 ET DE SES RECEPTEURS DANS LES CELLULES FOLLICULAIRES 32
- SECRETION DE PROK1 PAR LES CELLULES FOLLICULAIRES EN CULTURE PRIMAIRE 32

2. AXE 2 : PROK1, BIOMARQUEUR PRONOSTIQUE DE L'IMPLANTATION EMBRYONNAIRE EN FIVC ? 33
2.1. CONTEXTE 33
2.2. APPROCHES EXPERIMENTALES 33
3. PUBLICATION N°1 35
4. PUBLICATION N°2 44
5. RESULTATS PRINCIPAUX 65
- EXPRESSION DE PROK1 ET DE SES RECEPTEURS DANS L'OVAIRE HUMAIN 65
- EXPRESSION DE PROK1 ET DE SES RECEPTEURS DANS LES CELLULES FOLLICULAIRES ISSUES DE FIV 65
- SECRETION DE PROK1 PAR LES CELLULES FOLLICULAIRES ISSUES DE FIV EN CULTURE PRIMAIRE..... 65
- QUANTIFICATION DE PROK1 DANS LE LF ISSU DE FIV..... 66
- QUANTIFICATION DE PROK1 DANS LES PLOTS DE FECONDATION 66
- PROK1, BIOMARQUEUR DE L'ISSUE DE TENTATIVE DE FIV ? 67

DISCUSSION 68

PERSPECTIVES 73
1. PROK1, BIOMARQUEUR DU POTENTIEL IMPLANTATOIRE EMBRYONNAIRE EN FIVC ? 73
2. COMPREHENSION DES MECANISMES DE REGULATIONS DE L'EXPRESSION DE PROK1 DANS LE FOLLICULE OVARIEN HUMAIN..... 74

CONCLUSION 75

REFERENCES 76

ANNEXE 1 82

ANNEXE 2 83

ANNEXE 3 84

ANNEXE 4 85

Table des illustrations

FIGURE 1 : Axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (femme et homme) 3

FIGURE 2 : Influence de l'âge de la femme sur la fécondabilité et le risque de fausses-couches 3

FIGURE 3 : Les différentes origines de l'infertilité d'un couple 5

FIGURE 4 : La capacitation *in vitro* du sperme 5

FIGURE 5 : Schémas simplifiés d'un protocole long lutéal et d'un protocole court antagoniste 7

FIGURE 6 : Naissance du premier nouveau-né issu de la FIV 9

FIGURE 7 : Les étapes de la FIV 9

FIGURE 8 : Chronologie de la FIV 11

FIGURE 9 : Ponction ovarienne des follicules matures et recherche des CCO 11

FIGURE 10 : La FIVc et la FIV-ICSI 13

FIGURE 11 : Développement embryonnaire précoce 13

FIGURE 12 : Embryons à J2 15

FIGURE 13 : Evolution de l'activité globale d'AMP entre 2009 et 2012 15

FIGURE 14 : Part des naissances issues de l'AMP chaque année en France 17

FIGURE 15 : Nombre et part des tentatives et des naissances issues de l'AMP selon la technique en France en 2011 17

FIGURE 16 : Transferts embryonnaires et accouchements multiples de 2009 à 2012 en France 19

FIGURE 17 : Coût brut réel des techniques d'AMP 19

FIGURE 18 : Cycle menstruel et implantation embryonnaire 21

FIGURE 19 : Les trois étapes de l'implantation embryonnaire 21

FIGURE 20 : Endomètre pluristratifié ou en grain de café 23

FIGURE 21 : Structure des gènes *PROK1* et *PROK2* 23

FIGURE 22 : Localisation de PROK1 dans l'ovaire 25

FIGURE 23 : Expression de PROK1 dans l'endomètre au cours du cycle ovarien 25

FIGURE 24 : Follicule ovarien avant l'ovulation 30

FIGURE 25 : Méthodologie de l'étude prospective de cohorte en cours au laboratoire 72

Liste des abréviations

°C : degré celsius
ABM : Agence de la Biomédecine
ADN : Acide Désoxyribo Nucléique
ADNc : ADN complémentaire
AMP : Assistance Médicale à la Procréation
ARN : Acide Ribo Nucléique
ARNm : ARN messager
CC : Cellules du Cumulus
CCO : complexe cumulo-ovocytaire
CEA : Commissariat à l'Énergie Atomique et aux énergies alternatives
CECOS : Centre d'étude et de conservation des œufs et du sperme humains
CG : Cellules de la Granulosa
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CRB : Centre de Ressources Biologiques
E2 : 17 béta estradiol
EG-VEGF : Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor
ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FIV : Fécondation In Vitro
FIVc : FIV conventionnelle
FIV-ICSI : FIV - Intra Cytoplasmic Sperm Injection
FSH : Follicle Stimulating Hormone
GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone
GPM : Groupe Pasteur Mutualité
hCG : human Chorionic Gonadotrophin
ICSI : IntraCytoplasmic Sperm Injection
IIU : Insémination Intra Utérine
INSEE : Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques
kDa : kilo Dalton
LEC : cellules endothéliales lutéales
LF : liquide folliculaire
LH : Luteinizing Hormone
ml : millilitre
mm : millimètre
ng : nanogramme
pg : picogramme
PROK : Prokinéticine
PROKR : Récepteur des prokinéticines
qPCR : quantitative Polymérase Chain Reaction
RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G
U.I. : Unité Internationale

Introduction

L'infertilité touche environ 15% des couples en âge de procréer, soit plus de 80 millions de couples dans le monde (1). Depuis plus de 35 ans, la fécondation *in vitro* (FIV) a révolutionné la médecine reproductive en contribuant à la naissance de 5 millions d'enfants à l'échelle mondiale, depuis celle de Louise Brown en 1978 (2). Malgré de nombreux progrès, un défi reste aujourd'hui à relever : augmenter les taux de grossesse qui plafonnent aux alentours de 25% par transfert pour une moyenne de 2 embryons replacés, tout en diminuant l'incidence des grossesses multiples qui sont responsables d'une morbidité et mortalité fœto-maternelles élevées (3-5). Pour y parvenir, le transfert dans la cavité utérine d'un seul embryon à fort potentiel implantatoire représente un enjeu majeur en FIV en vue d'améliorer la qualité de la prise en charge de l'infertilité (6, 7). Actuellement, le choix des embryons à transférer repose sur l'établissement de scores morphocinétiques (8-12), mais l'utilisation exclusive de ces critères montre ses limites puisque 3 cycles de FIV sur 4 sont soldés par un échec avec plus de 80% des embryons transférés qui ne s'implantent pas (6, 13-15). La validation de nouveaux critères pronostiques fiables du potentiel implantatoire de chaque embryon représente un enjeu actuel majeur du biologiste de la reproduction. Depuis plusieurs années, de nombreux biomarqueurs de la compétence ovocytaire et/ou embryonnaire ont été proposés mais leur validation en routine hospitalière reste encore à déterminer (16-18). Parmi ceux-ci, la prokinéticine 1 (PROK1) a été récemment présentée comme un candidat prometteur pour ses caractéristiques biologiques en lien direct avec la grossesse, en particulier pour son rôle dans le développement placentaire et la réceptivité endométriale (19-21). De plus, des travaux récents suggèrent l'utilité de son dosage dans les échantillons biologiques issus des tentatives de FIV comme critère supplémentaire pour améliorer la stratégie de transfert embryonnaire, et ainsi augmenter les taux de grossesse en Assistance Médicale à la Procréation (AMP) (22). Ces données récentes soulignent l'intérêt de caractériser l'expression et les rôles de PROK1 dans le follicule ovarien humain, et de tester son potentiel pronostique en tant que nouveau biomarqueur non-invasif de l'implantation embryonnaire en FIV.

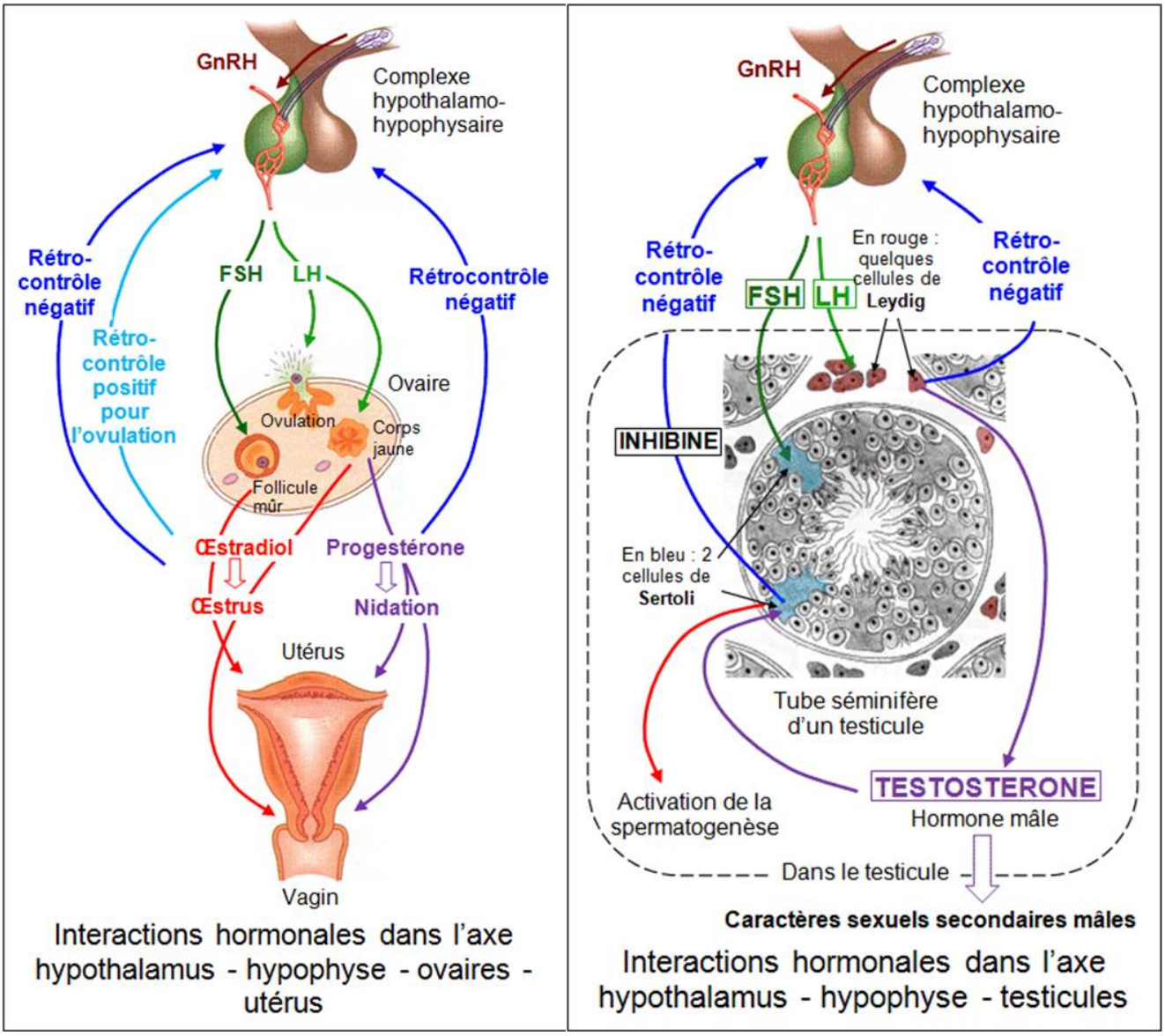


Figure 1 : Axe hypothalamo-hypophyso–gonadique de la femme (à gauche) et de l'homme (à droite).
GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormone, FSH : Follicle-Stimulating Hormone, LH : Luteinizing Hormone.
http://www.bio-top.net/Schemas/retrocontrole_ovaires.gif et http://www.bio-top.net/Schemas/retrocontrole_testicules.gif

Âge (en années)	Fécondabilité	Risque de fausses-couches
25	25%	12%
35	12%	20%
40	6%	30%

Figure 2 : Influence de l'âge de la femme sur la fécondabilité et le risque de fausses-couches.
La fécondabilité se définit comme la probabilité de concevoir par cycle (23).

Rappel historique et bibliographique

1. La fertilité

La fertilité désigne l'aptitude pour un individu à se reproduire. Elle implique la présence d'organes sexuels fonctionnels et d'un système endocrinien efficient (figure 1). La fertilité d'un couple est influencée par plusieurs facteurs individuels tels que l'âge, la prise de toxiques, l'alimentation, la qualité de vie, et/ou l'état psychologique (23). L'âge de la femme est considéré comme un facteur majeur à prendre en compte dans la fertilité du couple, puisqu'il est associé à une baisse de la fécondabilité[1] et à un risque augmenté de fausses-couches (24) (figure 2). Contrairement aux idées reçues, la fertilité masculine diminue également au cours de l'existence (25, 26). Avec l'âge, on observe une baisse linéaire du volume de sperme, de la numération, de la mobilité et de la proportion de formes typiques de spermatozoïdes (25). Ces modifications quantitatives et qualitatives, bien que modestes, ont un impact significatif sur la fertilité du couple, puisque le délai de conception est augmenté d'un facteur cinq pour un âge paternel supérieur à 45 ans (26). Avec l'effet cumulatif des cycles, 18% à 24% des couples en âge de procréer restent sans enfant après un an de tentatives sans contraception (27). Après deux ans, les couples toujours en attente d'une grossesse représentent encore 8 % à 11 % (27).

2. L'infertilité

D'après la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), on parle d'infertilité lorsqu'un couple désireux d'avoir un enfant ne parvient pas à obtenir une grossesse après un an de rapports sexuels réguliers non protégés (28, 29). L'infertilité correspond donc à une aptitude diminuée pour un couple à concevoir spontanément, et se distingue ainsi de la stérilité qui représente une incapacité définitive à procréer (29-31). En France, environ 15 % des couples consultent pour infertilité, ce qui représente environ 500 000 consultations chaque année (23). Les causes d'infertilité peuvent être d'origine féminine, masculine, mixte ou inexpliquée (figure 3) (29-31). Les patients confrontés à l'infertilité et désireux d'avoir un enfant peuvent recourir à plusieurs solutions, dont l'assistance médicale à la procréation (AMP).

[1] Probabilité de concevoir par cycle.

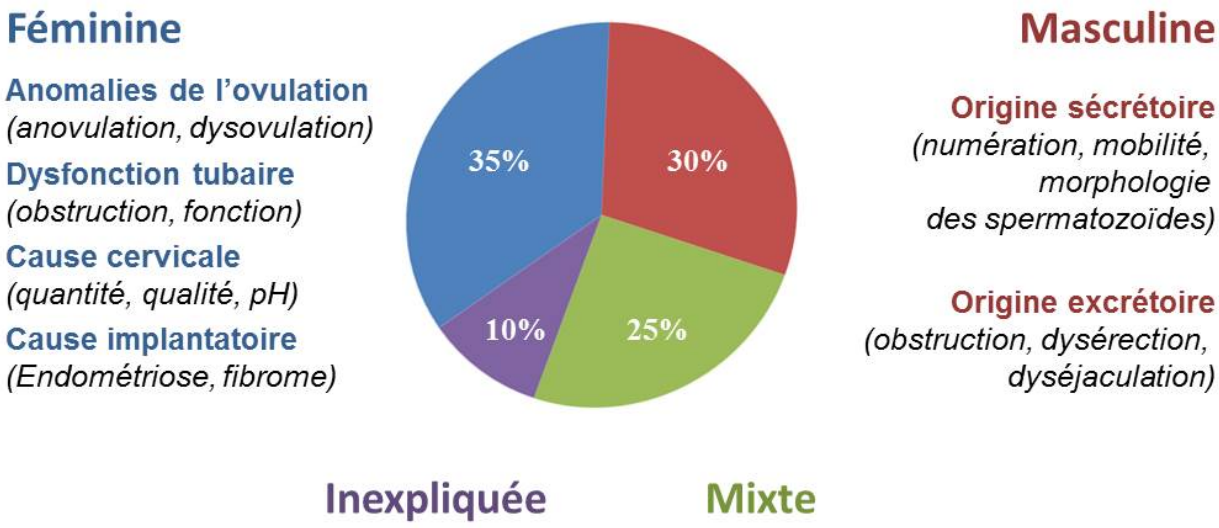


Figure 3 : Les différentes origines de l'infertilité d'un couple.
Schéma adapté de (28-30).

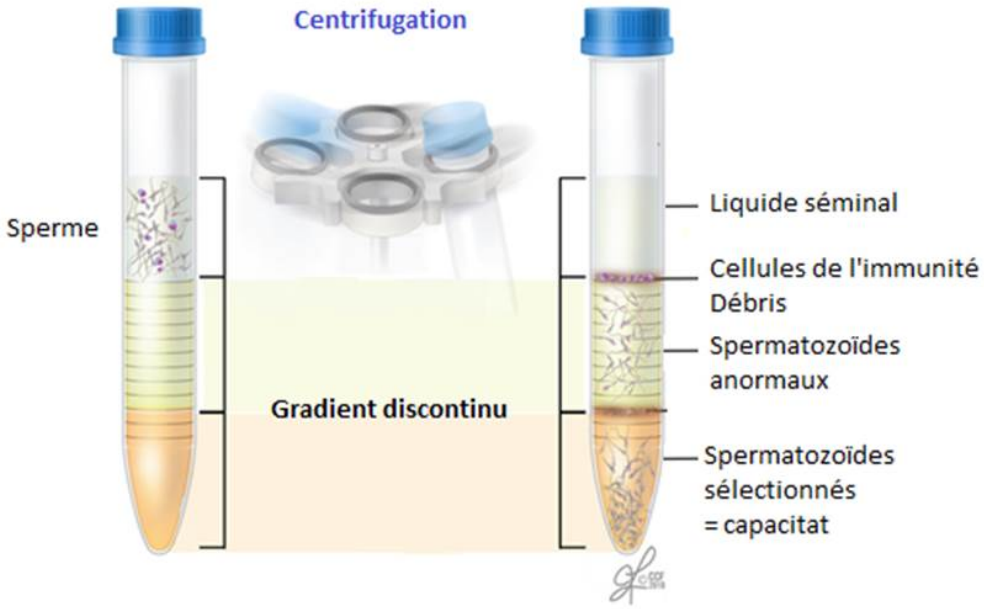


Figure 4 : La capacitation *in vitro* du sperme.
Schéma adapté de (32).

3. L'assistance médicale à la procréation

En France, les trois principales techniques d'AMP sont l'insémination intra-utérine (IIU), la fécondation *in vitro* conventionnelle (FIVc), et la FIV assistée par micro-injection de spermatozoïde (FIV-ICSI, pour *intra cytoplasmic sperm injection*). Ces techniques peuvent être réalisées en intraconjugal[2] ou dans le cadre d'un don de gamètes (ovocytes ou spermatozoïdes).

3.1. Les étapes communes aux trois techniques d'AMP

3.1.1. La capacitation des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes sont généralement issus d'un recueil de sperme obtenu par masturbation[3] après un délai d'abstinence sexuelle de 2 à 3 jours (32). Le sperme est composé d'une phase liquide et cellulaire. La phase liquide, appelée liquide séminal, est secrétée en majorité par les vésicules séminales (environ ¾ du volume), et par la prostate (32). La phase cellulaire est représentée en grande majorité par les spermatozoïdes, et en minorité par des cellules du tractus uro-génital, des cellules de l'immunité, ainsi que quelques cellules germinales indifférenciées (32). Pour être fécondant, les spermatozoïdes doivent être séparés du liquide séminal, et subir leur capacitation (32, 33). La capacitation est un processus physiologique de maturation fonctionnelle de la membrane des spermatozoïdes, et une condition préalable à la réaction acrosomique, qui permettra au spermatozoïde de pénétrer l'ovocyte (32, 33). Cette étape est assurée physiologiquement par le passage des spermatozoïdes au travers de la glaire cervicale, et par leur remontée dans le tractus féminin. Dans le cadre des techniques d'AMP, cette étape est réalisée *in vitro* par centrifugation du sperme sur un gradient de densité et reprise du culot dans un volume adapté de milieu de survie : c'est le capacitat (figure 4) (33). Il contiendra les spermatozoïdes les plus denses, et donc les plus aptes à la fécondation (33). C'est le capacitat, et non le sperme, qui sera utilisé pour l'étape de mise en fécondation des gamètes en IIU, FIVc et FIV-ICSI (33).

3.1.2. La stimulation ovarienne

La stimulation ovarienne a pour but d'augmenter les chances de grossesses, en restaurant l'ovulation (qui peut être absente ou déficiente), ou en augmentant le nombre d'ovocytes potentiellement fécondables (34). Selon la technique d'AMP envisagée, l'objectif pourra être d'obtenir 1 à 3 follicules dans le cadre d'une stimulation dite « mono-folliculaire » ou

[2] Avec les gamètes du couple.
[3] En cas d'absence de spermatozoïde dans l'éjaculat (azoospermie), une biopsie testiculaire peut être indiquée en vue d'une extraction directe de spermatozoïdes immatures des tubes séminifères.

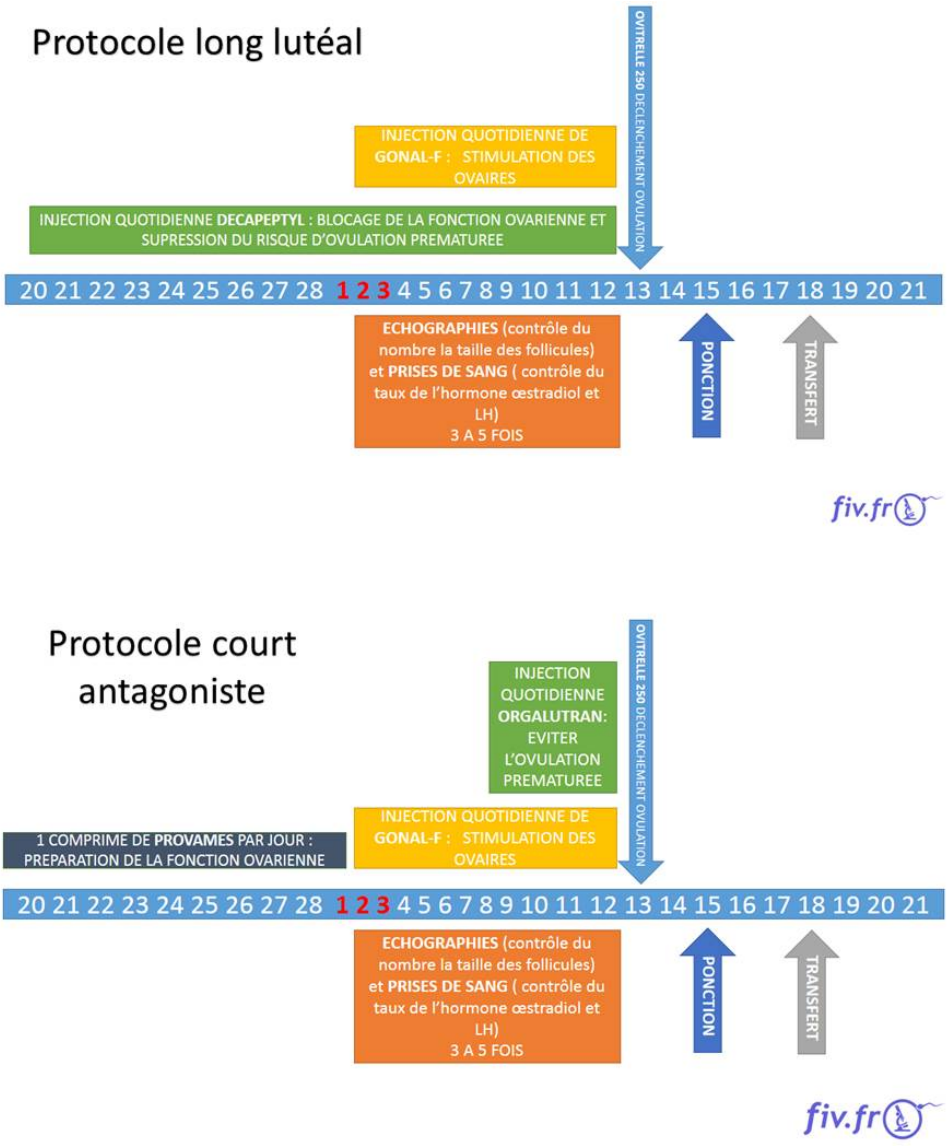


Figure 5 : Schémas simplifiés d'un « protocole long lutéal » et d'un « protocole court antagoniste».
Dans un souci de clarté, les médicaments indiqués sur les schémas représentent leur « famille » respective et les échelles de temps ne sont pas à prendre au jour près,
le protocole étant allongé ou raccourci à chaque étape en fonction de la réponse de chaque patiente.
http://www.fiv.fr/media/Protocole-long.png et *http://www.fiv.fr/media/Protocole-court.png.*

« pauci-folliculaire » en vue d'une IIU (ou plus rarement dans certains cas de FIV), ou de stimuler la croissance simultanée d'une dizaine de follicules par une stimulation « pluri-folliculaire » en vue d'une FIV (34). La stimulation de la croissance mono ou pauci-folliculaire peut être assurée par la prise de comprimés de Citrate de Clomiphène (Clomid® ou Pergotime®), ou par des injections sous cutanées contenant la gonadotrophine FSH (Fostimon®, Gonal-F®, Puregon®, ou en association FSH-LH pour Menopur®) (34). En revanche, la stimulation pluri-folliculaire est assurée exclusivement par des injections contenant de la FSH (figure 5) (34).

L'objectif de la stimulation ovarienne réalisée dans le cadre d'une FIV est de favoriser le développement simultané de plusieurs follicules tout en évitant une ovulation spontanée. Pour y parvenir, plusieurs protocoles de stimulation sont disponibles (protocole long, protocole court, protocole sur cycle naturel, etc.) permettant d'apporter un traitement « sur mesure », adapté à la situation de chaque couple (34). Chaque protocole est composé de 3 phases : une phase de blocage de l'ovulation, une phase de stimulation et une phase de déclenchement de l'ovulation (34).

► Le blocage de l'ovulation est assuré par l'administration répétée d'agoniste ou d'antagoniste de la GnRH, permettant la mise au repos de l'hypophyse et des ovaires en vue d'inhiber l'ovulation spontanée.

► La stimulation de la croissance simultanée de plusieurs follicules est assurée par des injections contenant de la FSH. Lors de la stimulation ovarienne, le développement des follicules est suivi par échographie endovaginale (compte du nombre et mesure du diamètre des follicules), et par dosages hormonaux des estradiols (E2) et de LH tous les 2-3 jours, afin de mesurer la réponse des ovaires au traitement.

►Lorsque les follicules sont matures, les étapes finales de maturation ovocytaire et l'ovulation sont déclenchées par une injection d'hCG (Ovitrelle®) ou d'agoniste de la GnRH (Décapeptyl®).

3.2. Les trois techniques d'AMP

3.2.1. L'insémination intra utérine

Cette technique consiste à déposer les spermatozoïdes dans l'utérus à l'aide d'un fin cathéter au travers du col utérin (31). Les spermatozoïdes mobiles remontent alors « naturellement » vers les trompes à la rencontre de l'ovocyte. La fécondation se fait *in vivo,* dans le tiers externe de la trompe. Il est donc nécessaire qu'au moins une des deux trompes soit perméable

Figure 6 : Naissance du premier nouveau-né issu de la FIV, Louise Brown, le 25 juillet 1978.
On observe sur la photographie à gauche le Physiologiste Dr. Robert Edwards, tenant dans ses bras Louise Brown ; une sage-femme au centre ; et le Gynécologue Dr. Patrick Steptoe à droite. Le Dr. Edwards a été lauréat du prix Nobel de physiologie ou médecine en 2010 pour le développement de la FIV.
http://ichef-1.bbci.co.uk/news/624/media/images/66934000/jpg/_66934765_hi017705007.jpg

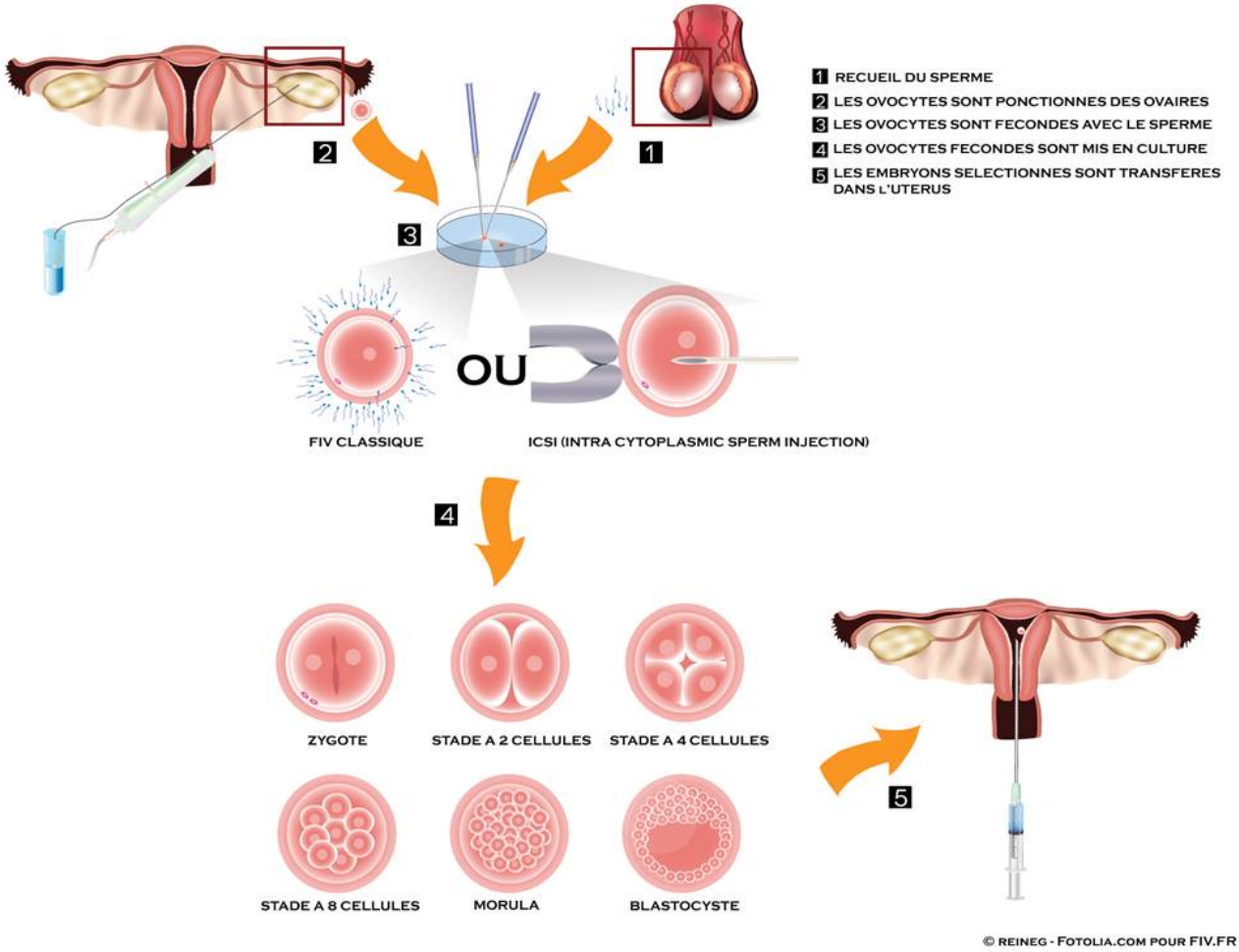


Figure 7 : Les étapes de la FIV.
http://www.fiv.fr/media/schema-fecondation-in-vitro2.png.

(31). L'IIU est généralement proposée en cas d'anomalie du col de l'utérus ou de la glaire cervicale, en cas d'infertilité masculine (problème d'éjaculation ou altération peu sévère du sperme), et d'infertilité inexpliquée (31). Le plus souvent, un traitement de stimulation de l'ovulation est prescrit à la femme afin d'obtenir le développement d'un ou deux follicules (voir trois selon les conditions), au lieu d'un seul à chaque cycle naturel (34). L'insémination est programmée 35h après le déclenchement des étapes finales de maturation ovocytaire, ce qui correspond au jour théorique d'ovulation (34). Les chances de grossesse sont de 10 à 15 % par cycle (35). La Sécurité Sociale prend en charge 6 cycles d'IIU, avec une remise à zéro en cas de grossesse clinique (36). Néanmoins, l'absence de grossesse sur 4 cycles d'IIU consécutifs oriente souvent vers un changement de technique en FIVc ou FIV-ICSI (36).

3.2.2. La fécondation *in vitro*

Parmi les traitements proposés aux couples infertiles, la FIV est la technique d'AMP la plus utilisée (35). Depuis la naissance de Louise Brown en 1978, premier « bébé éprouvette » au monde (figure 6), plus de cinq millions d'enfants sont nés à l'échelle mondiale avec l'aide des techniques de FIV (figure 7 et 8) (35).

- **La ponction ovarienne**

En cas de réponse ovarienne satisfaisante à la stimulation[4], les follicules matures sont ponctionnés sous contrôle échographique au bloc opératoire (32). Ce geste est réalisé 35h après le déclenchement des étapes tardives de maturation ovocytaire, et donc juste avant l'ovulation[5] (32). La ponction dure environ 20-30 min, et peut être réalisée sous hypnose, anesthésie locale ou anesthésie générale courte. Le médecin visualise les follicules matures par échographie endovaginale, et aspire leur contenu à l'aide d'une aiguille adaptée sur la sonde endovaginale à travers la paroi du vagin (32). Le liquide de chaque follicule, contenant potentiellement un ou plusieurs complexes cumulo-ovocytaires (CCO)[6] (32, 37), est aspiré et collecté dans un tube contenant du milieu nutritif (figure 9). Cette collecte peut être réalisée « follicule par follicule », c'est à dire avec un changement de tube entre chaque follicule ponctionné, ou être réalisée « en globale » avec une collecte continue du liquide des différents follicules. Les tubes de collecte individuelle ou globale sont conservés dans une mallette

[4] Présence d'au moins quatre follicules de plus de 15mm de diamètre avec un taux d'E2 d'au moins 300pg/follicule.
[5] En théorie, l'ovulation survient 38h après le déclenchement des étapes de maturation ovocytaire suite à l'injection d'hCG (Ovitrelle®) ou de GnRH (Décapeptyl®).
[6] L'existence de follicules pluri-ovocytaires est démontrée dans plusieurs espèces animales, dont l'espèce humaine.

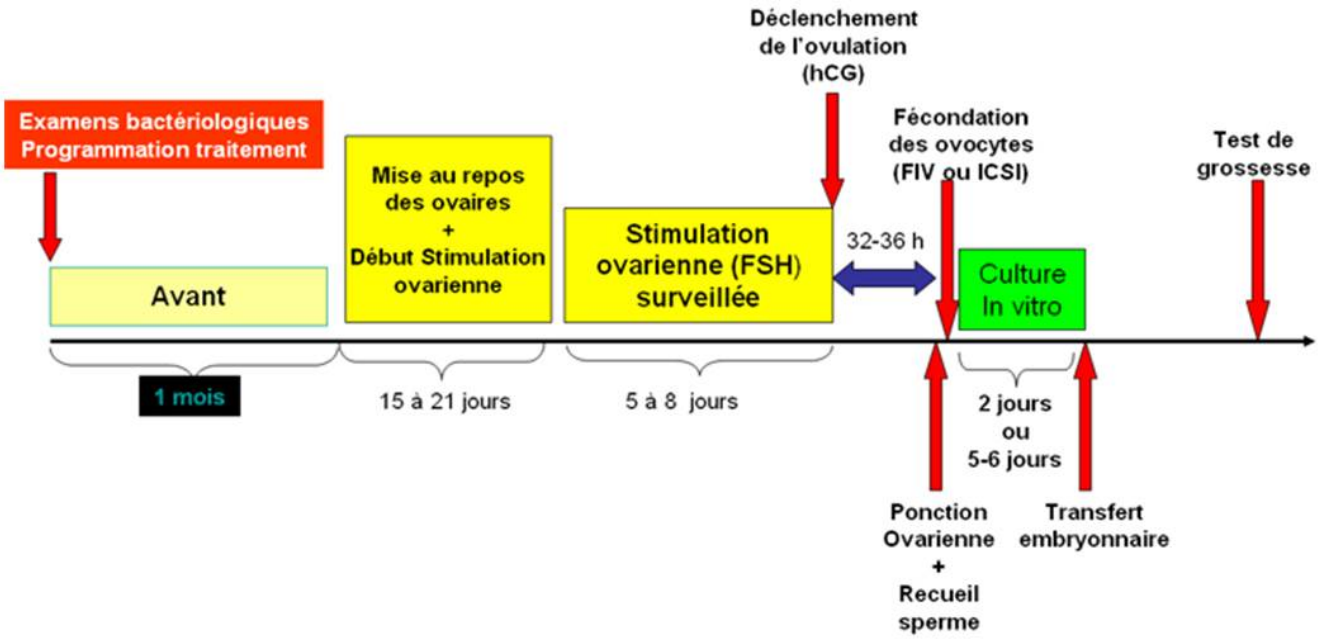


Figure 8 : Chronologie de la FIV.
http://www.chu-tours.fr/assets/images/service/med_bio_repro/deroulement_tentative_fiv.gif.

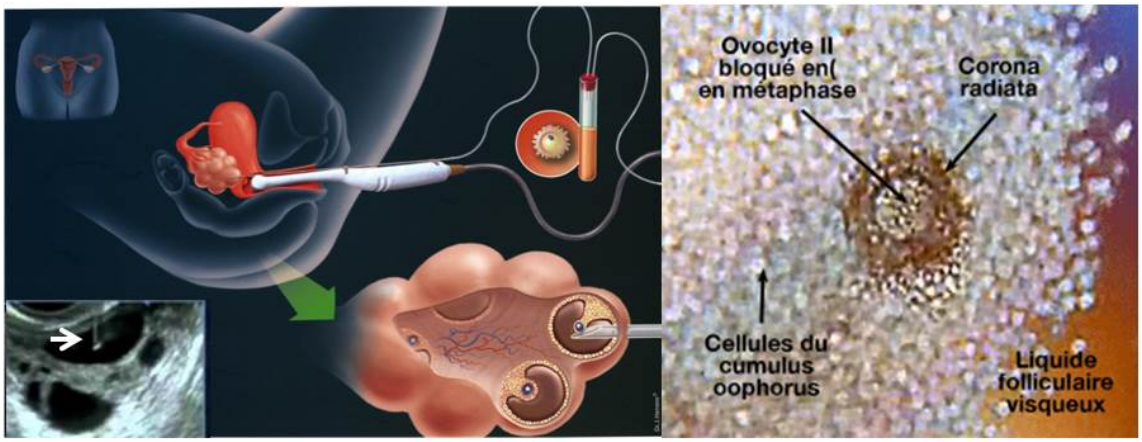


Figure 9 : Ponction ovarienne des follicules matures (à gauche) et recherche des CCO (à droite).
A gauche, on remarque l'aiguille (indiquée par la flèche blanche) aspirant le contenu d'un follicule de 20 mm.
http://http://www.cpma.ch/system/html/3_recueil_ovocytes-cafec32f.png et
http://www.vetopsy.fr/reproduction/femelle/images/ovocyte-expulsion.gif

thermostatée à 37°C pendant toute la durée de la ponction (32). Ils seront transportés dès la fin de celle-ci au laboratoire d'AMP (32).

- **La recherche ovocytaire**

Après la ponction, le contenu des tubes est observé au microscope afin d'isoler les CCO du liquide folliculaire (figure 9) (32). Il arrive qu'aucun CCO ne soit retrouvé, c'est la « ponction blanche». Après stimulation ovarienne pluri-folliculaire, une dizaine de CCO sont retrouvés en moyenne. Dans notre centre, ils sont transférés dans une boite de culture à 4 puits remplis de milieu de culture nutritif et recouvert d'huile minérale, afin de protéger les CCO des variations de température et de pH. La boîte est alors mise en culture à 37°C dans un incubateur à 6% de CO_2 jusqu'à l'étape suivante (32).

- **La mise en fécondation**

Cette étape diffère selon la technique de FIV (figure 10) (32). Le choix entre la FIVc et la FIV-ICSI repose sur les paramètres du capacitat, l'âge de la patiente et les résultats des éventuelles tentatives de FIV antérieures (36).

  - **La FIV conventionnelle**

Les CCO isolés sont incubés directement avec les spermatozoïdes dans un puits de culture, appelé « plot de fécondation » (32). La FIVc est proposée aux couples en cas d'anomalie tubaire (obstruction ou absence de trompes), de problèmes d'ovulation, d'infertilité masculine (anomalies de numération et/ou de mobilité), ou après échec de 4 à 6 IIU (32). Dans notre centre, la mise en fécondation se fait à raison de 100 000 spermatozoïdes pour 3 CCO par puits. Le capacitat doit contenir au moins un million de spermatozoïdes mobiles progressifs, afin d'assurer la réalisation de cette technique dans des conditions optimales. L'examen de l'ovocyte en lui-même est rendu difficile à cause des cellules du cumulus qui l'entourent, c'est pourquoi certains ovocytes immatures peuvent être mis en fécondation par inadvertance. Les boîtes de culture contenant les CCO inséminés sont mises en incubateur à 37°C sous 6% de CO_2. Le lendemain matin, les ovocytes de chaque CCO mis en fécondation seront débarrassés des cellules du cumulus qui les entourent par une action mécanique avec un capillaire en verre stérile : c'est l'étape de pelage (32). Les ovocytes immatures ou anormaux sont alors identifiés et détruits.

  - **La FIV assistée par microinjection**

La FIV-ICSI consiste en l'injection d'un spermatozoïde dans le cytoplasme d'un ovocyte présentant un globule polaire (figure 10) (32). Cette technique est envisagée en première intention dans les cas de numération ou mobilité spermatiques faibles, se traduisant par un

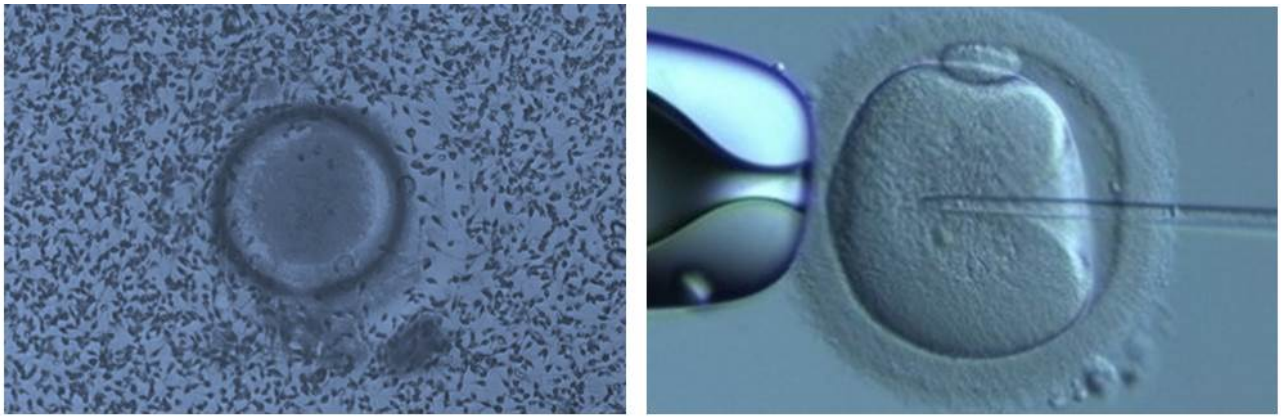


Figure 10 : La FIVc (à gauche) et la FIV-ICSI (à droite).
A gauche, on observe un CCO entouré de spermatozoïdes mobiles progressifs dans le plot de fécondation.
A droite, l'ovocyte a été décoronisé en vue de la microinjection d'un spermatozoïde au sein de son cytoplasme.
http://www.fivbordeaux.com/images/images_import/ovocytes.jpg et
http://www.invitra.fr/wp-content/uploads/2015/01/Procesus-icsi.png.

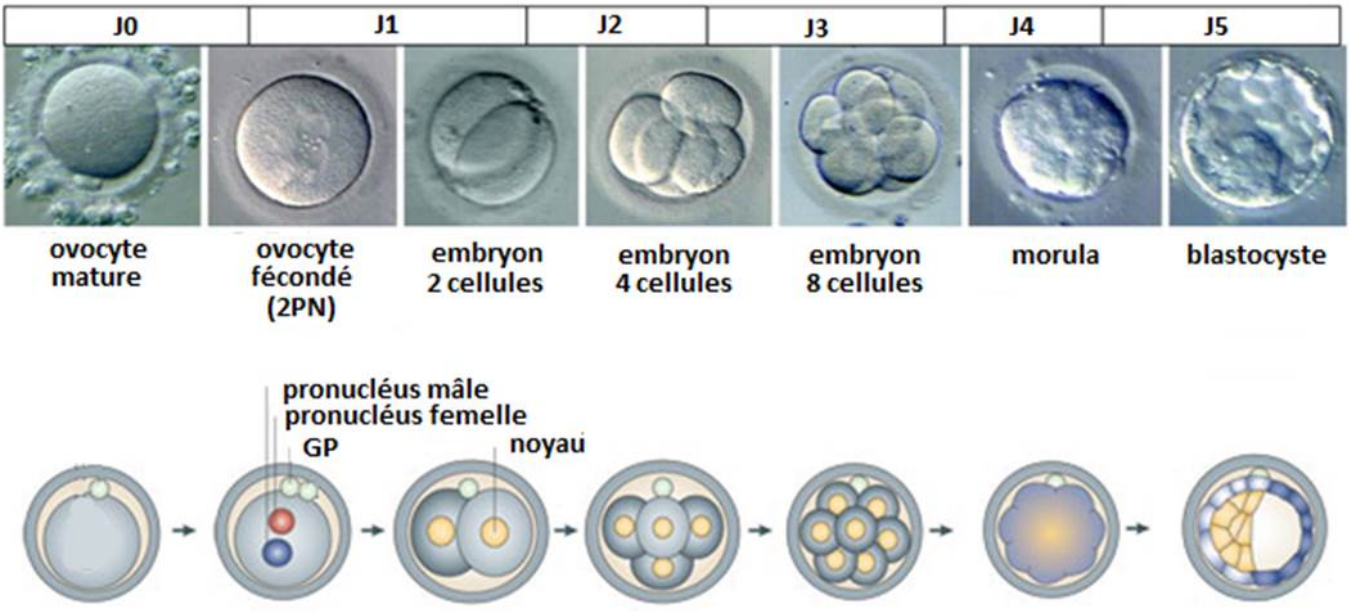


Figure 11 : Développement embryonnaire précoce.
J = Jour, PN = pronoyaux, GP = globules polaires.
Adapté de http://www.nature.com/nrm/journal/v6/n12/images/nrm1782-i1.jpg.

capacitat inférieur à un million de spermatozoïdes mobiles progressifs. Une étape de préparation des CCO est nécessaire à la mise en fécondation des ovocytes par FIV-ICSI. En effet, les cellules du cumulus vont être détachées de l'ovocyte à l'aide d'un traitement enzymatique à la hyaluronidase et d'un traitement mécanique avec un capillaire stérile (32). Cette étape de « décoronisation » permet d'observer la maturité nucléaire des ovocytes le jour même de la ponction (attestée par la présence d'un globule polaire), et d'éviter l'injection de matériel biologique somatique à l'intérieur de l'ovocyte lors de l'injection (32). Le choix des spermatozoïdes à injecter est basé sur leur hyperactivité et la typicité de leur morphologie (32). Chaque spermatozoïde est introduit dans l'ovocyte à l'aide d'une micropipette fine et biseautée, la pipette d'injection (32). Une micropipette plus large aux bords arrondis, la pipette de contention, permettra de maintenir l'ovocyte pendant toute la durée de la micromanipulation (32). Les boîtes de culture contenant les ovocytes injectés sont mises à l'incubateur à 37°C sous 6% de CO_2 jusqu'au lendemain matin.

- **Le développement embryonnaire**

Les ovocytes mis en fécondation sont observés individuellement le lendemain matin de la ponction au microscope inversé (objectif x20 et x40) afin d'évaluer la présence et le nombre de pronoyaux (PN) (figure 11) (32). La présence de deux pronoyaux (2PN) est en faveur d'une fécondation de l'ovocyte par un spermatozoïde (32). Un nombre inférieur de pronoyaux (0PN ou 1PN) suggère une absence de fécondation, qui devra être confirmée par une absence de développement embryonnaire à J2 (32). En revanche, un nombre supérieur de pronoyaux (≥3PN) suggère une aneuploïdie du conceptus, ce qui entraine sa destruction (32). Le développement des embryons est évalué quotidiennement selon des critères morphologiques et cinétiques (figure 11 et 12) (8-12). L'établissement de ces critères permet d'estimer le potentiel implantatoire de chaque embryon, et par conséquent le choix de l'embryon ou des embryons à transférer dans la cavité utérine (8-12).

- **Le transfert embryonnaire**

La stratégie de transfert embryonnaire est décisive pour favoriser la naissance d'un enfant en bonne santé à terme (36). Elle repose principalement sur trois critères : l'âge de la femme, le nombre d'embryons évolutifs jugés à haut potentiel implantatoire, et la présence de contre-indication à la grossesse multiple (36). Selon la stratégie adoptée, le clinicien déposera un ou deux (voir trois selon les conditions) embryons dans la cavité utérine à l'aide d'un cathéter fin introduit par le canal cervical jusqu'à l'utérus sous contrôle échographique (32). Cette étape est indolore et ne nécessite ni anesthésie, ni hospitalisation. Dans notre centre, les transferts

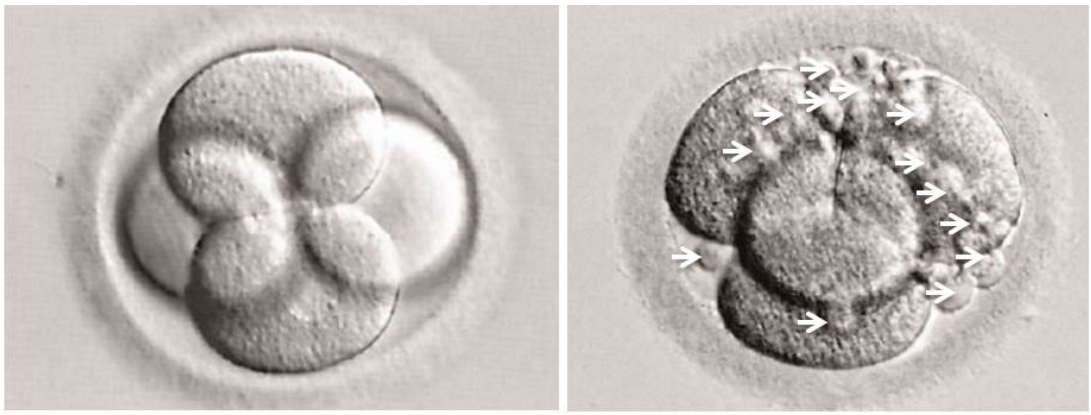


Figure 12 : Embryons à J2.
A gauche, embryon à haut potentiel implantatoire, ou « top-embryon », selon les critères morphocinétiques en vigueur dans notre centre d'AMP : présence de quatre blastomères symétriques non multinuclées avec absence de fragment.
A droite, embryon de potentiel implantatoire intermédiaire : présence de quatre blastomères symétriques non multinuclées avec présence de fragments (indiqués par les flèches blanches).

	2009	2010	2011	2012
Nombre total de tentatives	**131 736**	**139 941**	**141 297**	**142 708**
Nombre d'inséminations	57 301	60 224	59 001	58 478
Nombre de FIVc	21 320	22 171	21 929	21 481
Nombre de FIV-ICSI	35 553	37 930	39 816	40 610
Nombre de TEC	17 562	19 616	20 551	22 139

Figure 13 : Evolution de l'activité globale d'AMP entre 2009 et 2012 (34).

sont majoritairement mono-embryonnaires et réalisés à J2, soit 48h après la ponction. Il peut arriver qu'il n'y ait aucun embryon transférable, la tentative est alors qualifiée « sans transfert » (36). Elle n'est pas décomptée des quatre tentatives prises en charge pour le couple par la sécurité sociale (36).

- **La congélation embryonnaire**

Les embryons qui ne sont pas choisis initialement pour un transfert sont maintenus en culture jusqu'à J5 ou J6. Les blastocystes aux scores morphocinétiques favorables peuvent être congelés en vue d'une décongélation et d'un transfert ultérieurs (36).

4. Améliorer les résultats en FIV, mythe ou réalité ?

4.1. Pourquoi augmenter les résultats en FIV

4.1.1. Augmentation du recours aux techniques de FIV

On estime que l'AMP a participé à la naissance de plus de 200 000 enfants en France (38), et plus de cinq millions d'enfants dans le monde (1). Depuis plus de 30 ans, on observe une augmentation du nombre de tentatives d'AMP, aboutissant à la hausse de la part des naissances issues de ces techniques (figure 13 et 14) (35). En 2012, 142 708 tentatives d'AMP ont été réalisées, aboutissant à la naissance de 23 887 enfants des 819 191 naissances recensées par l'INSEE, soit 2,9% des enfants nés de la population générale cette année-là en France (figure 13 et 14) (35). Les trois-quarts de ces enfants sont issus des techniques de FIV (35). L'augmentation du recours à la FIV devrait se poursuivre, voire s'accentuer dans les années à venir, en réponse à la baisse de fertilité de la population (39, 40). Les causes les plus fréquemment évoquées sont le recul de l'âge du désir de procréation, les anomalies de poids, et l'exposition à certains toxiques comme le tabac et les perturbateurs endocriniens (31). A l'heure où la natalité et le renouvellement de la population sont des notions importantes à prendre en compte, il semble important d'améliorer la prise en charge des patients infertiles, et donc d'augmenter les résultats limités de cette technique.

4.1.2. Les résultats limités de la FIV

Le taux de succès de la FIV reste encore à ce jour limité, avec moins d'un cycle sur 4 concrétisé par une naissance (figure 15) (35). En considérant l'ensemble des traitements de FIV réalisés, seul 48% des couples auront un enfant grâce à cette technique (32% après la première ou deuxième FIV), 11% des couples auront un enfant spontanément, 11% en

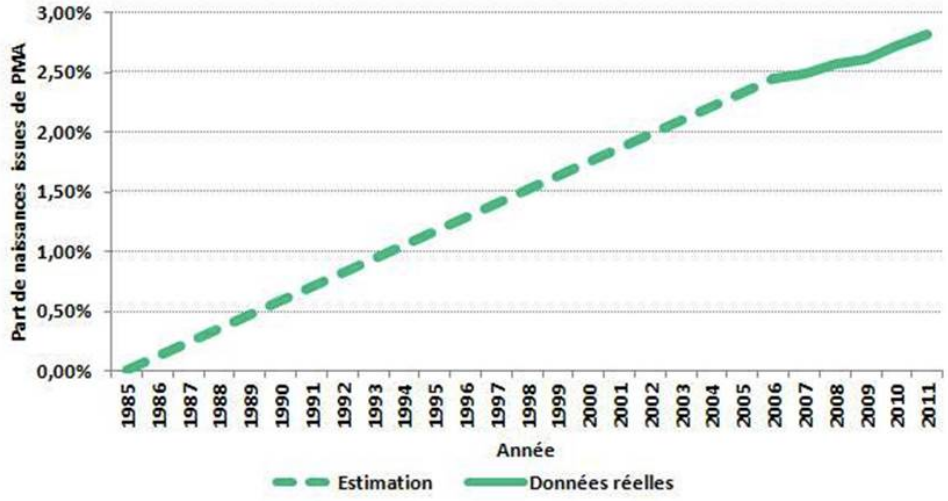


Figure 14 : Part des naissances issues de l'AMP chaque année en France.
Estimation 1985-2006 et données réelles 2006-2011.
https://etudesnaissances.files.wordpress.com/2014/07/3-des-enfants-nc3a9s-de-la-pma.jpg?w=620.

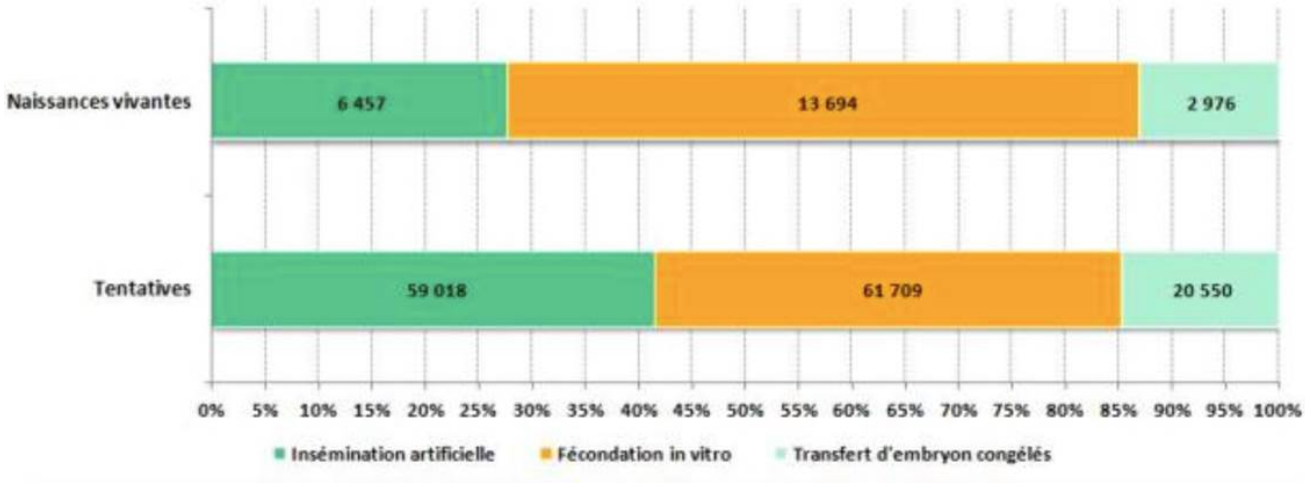


Figure 15 : Nombre et part (en %) des tentatives et des naissances issues de l'AMP selon la technique en France en 2011.
https://etudesnaissances.files.wordpress.com/2014/pma-fiv1.jpg.

adopteront un, et 30% resteront finalement sans enfant (41). Avec une moyenne de deux embryons replacés par transfert, cela signifie que plus de 80% des embryons choisis selon les critères morphocinétiques actuels et replacés dans la cavité utérine ne donnent pas lieu à une naissance (15).

4.1.3. Les risques du transfert d'embryons multiples en FIV

Paradoxalement, les techniques de FIV sont également à l'origine d'une augmentation du taux de grossesses multiples (5). Alors que leur taux avoisine 1,5% dans la population générale, celui observé en FIV atteignait encore 14,7% des accouchements en 2012 (figure 16). La cause majeure de cette augmentation reste le transfert de plusieurs embryons dans la cavité utérine, stratégie mise en place initialement pour optimiser les taux de grossesse en FIV. Or, les grossesses multiples sont associées à une hausse de la morbi-mortalité maternelle et fœtale, ainsi qu'à une augmentation du risque de complications périnatales (retard de croissance intra-utérin, hypertention artérielle gravidique, pré-éclampsie, diabète gestationnel, prématurité, hémorragie, césarienne) (42). Elles engendrent aussi des conséquences économiques lourdes pour le couple et la société, avec un coût trois fois plus important pour une grossesse gémellaire et dix fois plus élevé pour une grossesse triple (43). En conséquence, les équipes médicales ont revu leur stratégie de transfert embryonnaire ces dernières années afin de réduire l'incidence des grossesses multiples, et tentent de promouvoir le transfert d'embryon unique (44). Ainsi, le taux de grossesses multiples après transfert d'embryons a régulièrement diminué en Europe depuis l'an 2000, passant de 26,9 % à 20,2 % en 2009 (45). Néanmoins, la généralisation de la politique globale de transfert d'embryon unique reste toujours controversée en raison du risque d'échec associé au transfert d'un seul embryon sélectionné sur les caractéristiques peu prédictives du système de classification actuel.

4.1.4. Charge financière et psychologique de la FIV

En France, chaque couple infertile peut profiter après entente préalable de la prise en charge à 100% avec exonération du ticket modérateur par la Caisse d'Assurance Maladie de quatre cycles complets de FIV. Un cycle complet est alors défini comme toute ponction ovocytaire suivie d'un transfert d'embryon(s). Ainsi, le transfert d'embryon(s) congelé(s) issu(s) d'une tentative de FIV ayant déjà été concrétisée par un transfert frais n'est pas comptabilisé comme une nouvelle tentative. De même, un cycle de FIV qui est interrompu avant le transfert embryonnaire, quel que soit l'étape à laquelle le cycle est abandonné, n'est pas décompté par la Sécurité Sociale. Les compteurs sont remis à zéro à chaque accouchement. La Sécurité Sociale ne prend en charge que les patientes âgées de moins de 43 ans au jour de la ponction

	2009	2010	2011	2012
Nombre d'embryons transférés	.	.	.	.
% 1 embryon transféré	31.7%	33.4%	36.5%	39.8%
% 2 embryons transférés	59.0%	57.4%	55.9%	54.3%
% 3 embryons transférés ou plus	9.3%	8.5%	7.6%	5.9%
Accouchements multiples	.	.	.	.
% accouchements gémellaires	16.7%	16.2%	15.9%	14.5%
% accouchements triples et plus	0.3%	0.2%	0.2%	0.2%

Figure 16 : Transferts embryonnaires et accouchements multiples de 2009 à 2012 en France (35).

	IAC	FIVc	FIV-ICSI
Prix 2014 sans dépassement d'honoraires	800-1400€	3800-4200€	3900-4600€
Prix 2014 avec dépassement d'honoraires		4000-5000€	4100-5200€

Figure 17 : Coût brut réel des techniques d'AMP.
Ces coûts ne tiennent pas compte des frais engendrés par l'exploration clinico-biologique des conjoints avant de rentrer dans la procédure même d'AMP. Ces prix s'entendent hors frais de déplacement et hors arrêt de travail et sont calqués sur le tarif "sécurité Sociale" hors dépassement d'honoraires qui peuvent varier considérablement d'un praticien à l'autre dans le secteur privé (35).

folliculaire. Le coût moyen d'un cycle de FIV complet est d'environ 4100 € : 1300 € en moyenne pour le traitement de stimulation (achat des médicaments et intervention des infirmières à domicile), environ 500 € pour la surveillance hormonale et échographique, 600 € en moyenne pour la partie biologique (430 € pour la FIVc, 750 € pour l'ICSI), environ 1700 € pour la ponction ovarienne et le transfert embryonnaire (figure 17) (36). Ce coût estimé ne comprend pas les frais de déplacements du couple, les arrêts de travail (d'un minimum de trois jours), les dépassements d'honoraires, et ne tient pas compte des cycles annulés (environ 15 % des cycles de FIV) (36). En plus du coût financier vient se rajouter la charge physique et psychologique de la FIV. En effet, cette technique reste un processus douloureux physiquement et moralement pour la majorité des couples infertiles.

4.2. Comment améliorer les résultats en FIV

La naissance d'un enfant à terme en bonne santé nécessite initialement le succès d'un processus biologique complexe : l'implantation embryonnaire. Elle résulte du dialogue synchronisé entre un endomètre réceptif et un blastocyste évolutif (figure 18). Ceci implique au préalable un développement folliculaire adéquat, l'acquisition par l'ovocyte des compétences méiotique et cytoplasmique, la fécondation de cet ovocyte par un spermatozoïde mature, et un développement embryonnaire précoce approprié.

4.2.1. Evaluation de la compétence ovocytaire et spermatique

Actuellement, le choix des gamètes à mettre en fécondation repose conjointement sur l'évaluation morphologique et fonctionnelle de l'ovocyte et du spermatozoïde. Le critère principal conditionnant la mise en fécondation d'un ovocyte est la présence du premier globule polaire, signe de l'acquisition de la compétence méiotique. En revanche, aucun critère actuel ne permet encore d'attester de l'acquisition de la compétence cytoplasmique à ce jour. Ainsi, l'implantation embryonnaire est considérée comme le paramètre le plus fiable pour apprécier à postériori la compétence de l'ovocyte. D'autres critères morphologiques comme la taille ou la forme de l'ovocyte, ainsi que la présence de vacuoles intracytoplasmique peuvent également aider au choix des ovocytes à mettre en fécondation. En effet, une taille excessive (plus de 220 µm) est associée à un risque augmenté de polyploïdie, alors qu'une forme allongée pénalise les chances de compaction de l'embryon au stade morula en diminuant la surface de contact entre les blastomères (46, 47). De nombreux paramètres morphologiques ovocytaires sont actuellement sous-exploités, comme la zone pellucide (épaisseur et granularité), le cytoplasme (halo cytoplasmique, inclusions), l'espace périvitellin (épaisseur et granularité), et les globules polaires (fragmentation, taille) (46). Ces dysmorphies ovocytaires

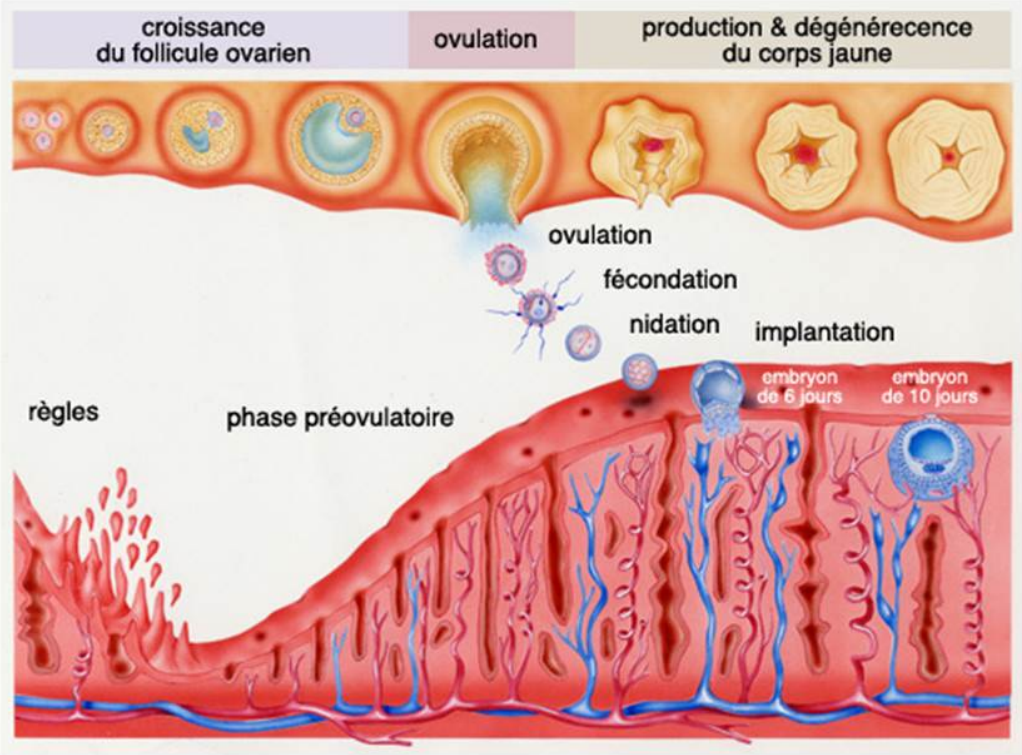


Figure 18 : Cycle menstruel et implantation embryonnaire.
http://www.arcagy.org/infocancer/img/432_popup_cycle-menstruel-fecondation-8574406.jpg.

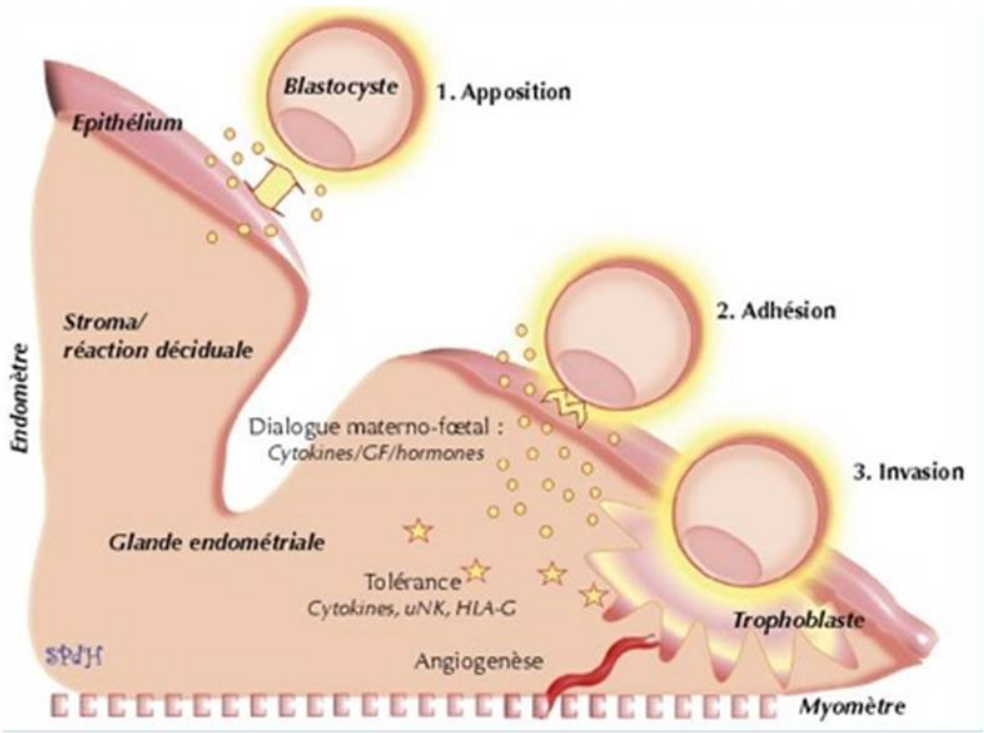


Figure 19 : Les trois étapes de l'implantation embryonnaire.
http://www.gyneobs.com/gyneobs/Implantation_files/.jpg

ne semblent pas corrélés avec le taux de fécondation en FIVc et ICSI, ou avec le développement précoce des embryons, mais semblent être associées à un taux de fausse-couche élevé (46). En ce qui concerne le choix du spermatozoïde, la migration du sperme au travers du gradient de densité permet de sélectionner les gamètes les plus denses, signe de la bonne compaction de l'ADN lors de la spermiogenèse, et les plus mobiles. Malheureusement, ces critères morphologiques restent un gage approximatif de la qualité gamétique intrinsèque.

4.2.2. Evaluation de la compétence implantatoire des embryons

Le choix des embryons à haut potentiel implantatoire est un défi majeur en AMP pour augmenter les taux de grossesse unique, mais aussi pour limiter la cryopréservation superflue des embryons associés à de faibles chances de grossesse, qui soulève des contraintes éthiques fortes. Pour pouvoir s'implanter dans l'endomètre maternel, l'embryon doit se développer jusqu'au stade blastocyste puis éclore de la zone pellucide afin de pouvoir s'apposer, adhérer puis envahir l'endomètre maternel (figure 19). Il a été montré que l'observation *in vitro* du développement précoce de l'embryon donnait des informations sur son potentiel implantatoire. A ce jour, l'établissement de critères morphocinétiques conserve une place majeure dans les centres d'AMP pour le choix des embryons à transférer (8-12). Cependant, il n'existe pas de classification standardisée des embryons entre les centres de FIV. De manière générale, les embryons à 4-5 cellules au jour 2 et à minimum 7 cellules au jour 3, qui ne présentent pas plus de 20 % de fragmentation et qui n'ont aucun blastomère multinucléé sont considérés comme étant des embryons à haut potentiel implantatoire (top quality embryo) (figure 12) (8-12). Néanmoins, l'utilisation exclusive de ces critères dans l'identification des embryons à fort potentiel implantatoire montre aujourd'hui ses limites (6, 13-15). Paradoxalement, certains embryons jugés à « faible potentiel implantatoire » évoluent pourtant vers une grossesse physiologique et une naissance à terme. La validation de nouveaux biomarqueurs du potentiel implantatoire embryonnaire est aujourd'hui nécessaire à l'augmentation significative des naissances en AMP tout en minimisant le risque de grossesses multiples, dont les conséquences médicales, psychologiques et financières sont lourdes pour le nouveau-né, sa famille ainsi que pour l'ensemble de la société (48). L'avènement de la génomique (technique invasive d'exploration du génome embryonnaire) et plus récemment de la métabolomique, de la transcriptomique et de la protéomique (techniques non invasives d'étude du sécrétome de l'ovocyte et de l'embryon) ont permis d'identifier de nouveaux candidats prédictifs de la qualité ovocytaire et embryonnaire (17, 18). Ainsi, l'étude des « signatures moléculaires » des embryons à fort potentiel implantatoire ouvre des

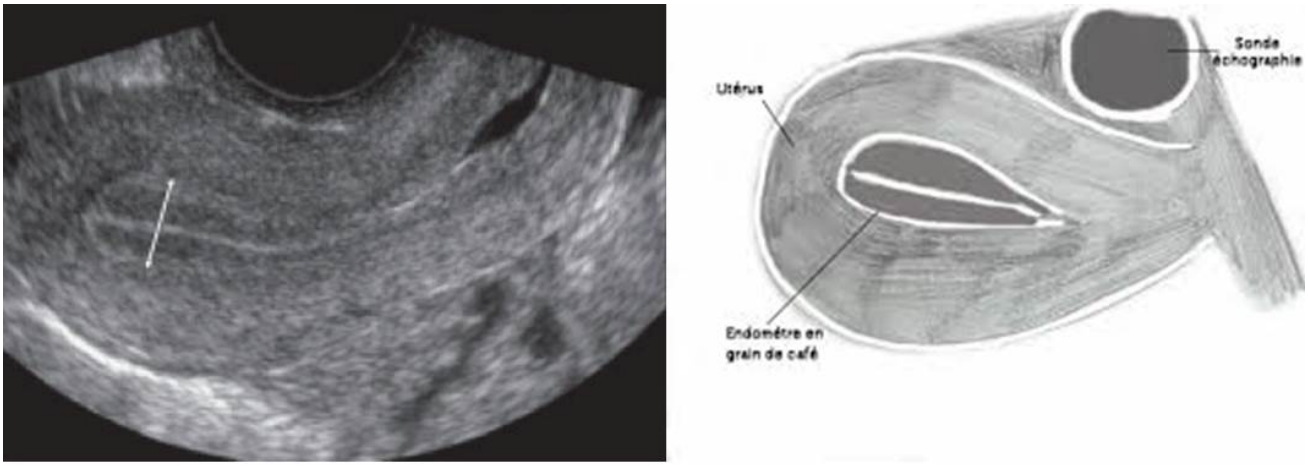


Figure 20 : Endomètre pluristratifié ou en grain de café.
On observe 3 lignes hyperechogènes (externe, moyenne et interne), délimitant deux zones hypoéchogènes. Cet aspect est également dénommé 5 bandes.
http://www.echopublisher.com/wpimages/wp5533b116.gif

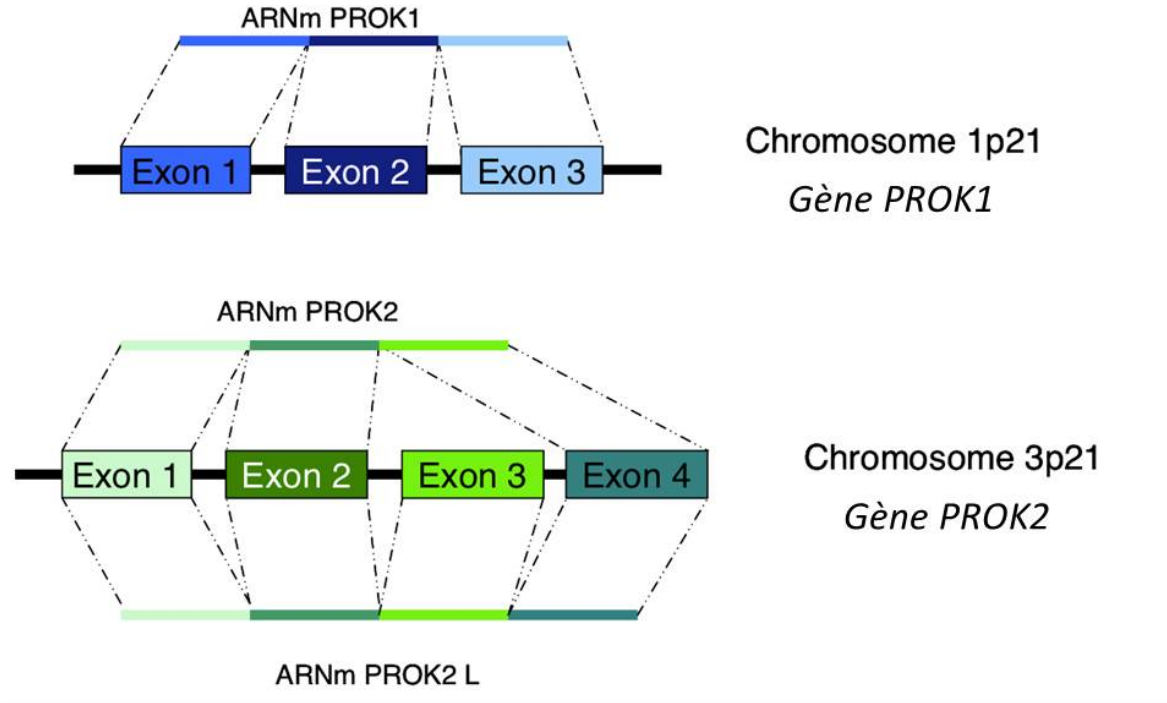


Figure 21 : Structure des gènes *PROK1* et *PROK2*.

perspectives intéressantes sur la caractérisation de nouveaux biomarqueurs de l'implantation embryonnaire. Les protéines sécrétées par l'embryon avec une action locale à l'interface materno-fœtale semblent être particulièrement prometteuses pour leur application potentielle comme biomarqueurs non-invasifs utilisables en pratique clinique (17, 18, 49-51).

4.2.3. Evaluation de la réceptivité endométriale

Alors que l'implantation peut survenir dans de nombreux tissus du corps humain, l'endomètre montre paradoxalement une réceptivité limitée dans le temps : c'est la « fenêtre implantatoire ». Cette période, qui s'étend du jour 20 au jour 24 du cycle, implique de nombreuses modifications morphologiques et biochimiques au niveau de l'épithélium utérin, nécessaires à l'interaction entre les deux pôles apicaux des cellules épithéliales trophoblastiques et endométriales, ce qui représente un véritable paradoxe biologique (52). L'aspect échographique de l'endomètre est un critère important pour maximiser les chances d'implantation embryonnaire. En effet, un endomètre pluristratifié, dit « en grain de café », avec une épaisseur entre 8 et 11 mm semble être un critère favorable, mais pas suffisant (figure 20) (53, 54). L'identification de critères fiables d'appréciation de la réceptivité de l'endomètre reste à ce jour un enjeu majeur en AMP.

5. Les Prokinéticines

Dans le domaine de la procréation, un faisceau grandissant de publications démontre le rôle des facteurs angiogènes dans le succès d'une grossesse, et leur potentiel comme biomarqueur prédictif en clinique (55-58). En 2001, une famille de protéines sécrétées et pro-angiogènes spécifiques des glandes endocrines a été décrite : les prokinéticines, PROK1 (également appelé EG-VEGF, pour Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor) et PROK2, et leurs récepteurs associés : PROKR1 et PROKR2 (59-61).

5.1. Expression des prokinéticines et de leurs récepteurs

PROK1 est localisé chez l'homme sur le chromosome 1 en 1p21. Il est composé de trois exons, sans épissage alternatif connu (figure 21) (21). *PROK2* se situe sur le chromosome 3 en 3p21.1, et est composé de quatre exons. Il donne deux protéines matures : PROK2 (exon 1, 2, et 4), et une seconde forme PROK2L (exons 1, 2, 3, et 4) (figure 21) (21). PROK1 est constituée de 86 acides aminés, dont 10 cystéines, avec une masse moléculaire relative de 8,6 kDa. Son ADNc code pour une protéine de 105 acides aminées, dont 19 correspondent au peptide signal (21). PROK2 est composée de 81 acides aminés, et la seconde forme, PROK2L, de 102 acides aminés. Les séquences protéiques de PROK1 et PROK2 présentent

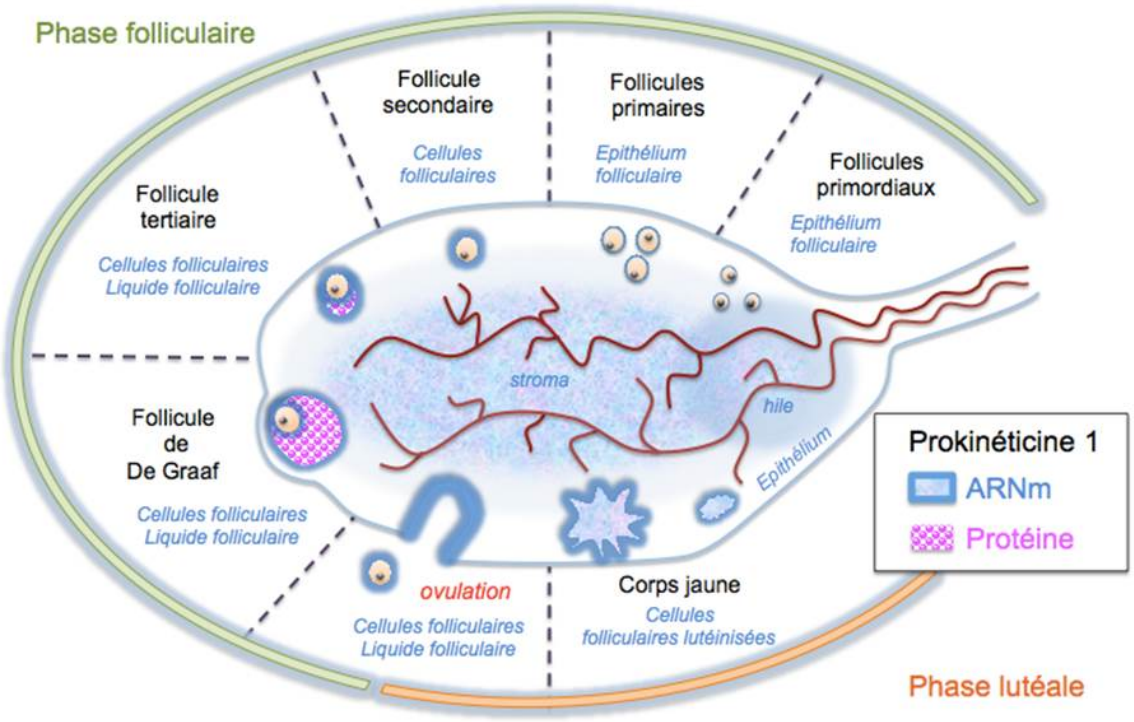


Figure 22 : Localisation de PROK1 dans l'ovaire.
La localisation des transcrits de *PROK1* est indiquée en bleu. La localisation de la protéine PROK1 est indiquée en rose.

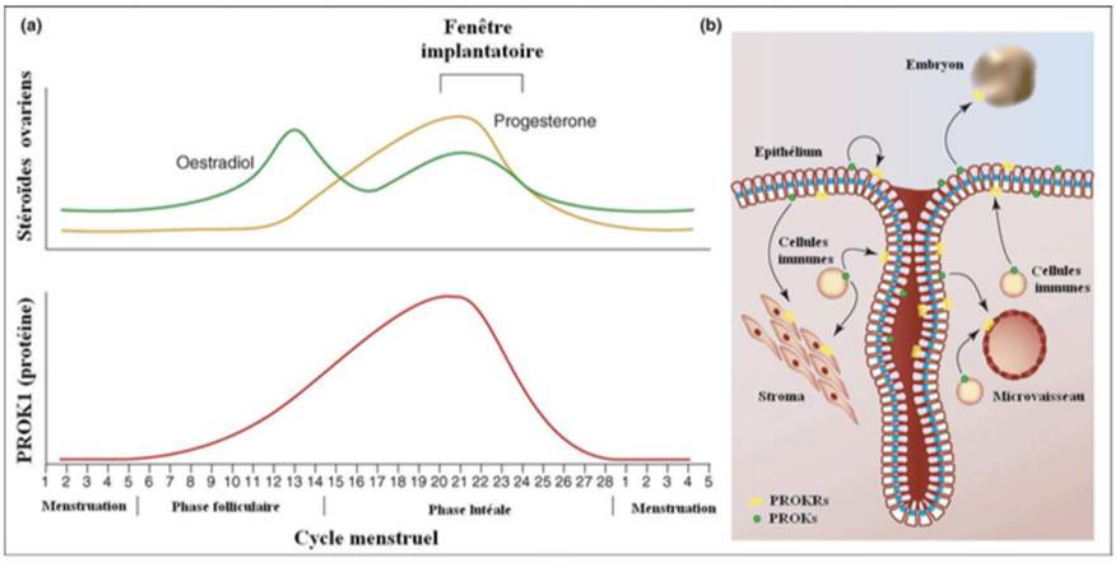


Figure 23 : Expression de PROK1 dans l'endomètre au cours du cycle ovarien.
Schéma adapté de (21).

44% d'identité (21). Les prokinéticines se lient avec la même affinité à leurs deux récepteurs PROKR1 et PROKR2 (62). Les gènes *PROKR1* et *PROKR2* sont localisés respectivement en 2q14 et 20p13 chez l'homme, indiquant que ces deux RCPG sont codés dans le génome humain par des gènes indépendants (60, 63). Ils sont composés de deux exons chacun, codant pour 393 acides aminés pour PROKR1, et pour 384 acides aminés pour PROKR2 (64). Ces récepteurs partagent environ 85% d'acides aminés identiques (60, 65). Les prokinéticines présentent une expression majoritaire dans les ovaires, le placenta, les testicules, et les glandes surrénales (21, 59). PROK1 est exprimée majoritairement dans le tractus féminin, tandis que PROK2 montre un site d'expression privilégié dans les testicules et le système nerveux central, avec une expression quasi-indétectable dans les ovaires, l'utérus et le placenta (21).

5.2. Rôle de PROK1 dans la fonction reproductive chez la femme

L'implication de PROK1 et de ses récepteurs dans l'établissement et le maintien de la grossesse est établi dans de nombreuses publications (21).

5.2.1. Rôle de PROK1 dans la fonction ovarienne

Chez l'humain, la majorité des études porte sur l'expression des ARNm de *PROK1* dans l'ovaire (figure 22). Des expériences d'hybridation *in situ* ont mis en évidence une modulation de leur expression au cours du cycle ovarien, avec une détection majeure dans les cellules folliculaires au stade primordial, primaire et secondaire, suivie d'une baisse dans le follicule tertiaire (66). Après l'ovulation, les ARNm de *PROK1* seraient de nouveau abondants au niveau du corps jaune, avec une expression intense dans les cellules lutéales de la thèque à partir de 8 jours post-ovulation, et ce jusqu'à la fin de la phase lutéale. Leur détection a également été rapportée dans les follicules atrétiques (66, 67). L'expression des transcrits de *PROK1* est augmentée *in vitro* par l'hCG mais pas par la progestérone, suggérant un rôle de la prokinéticine 1 dans les étapes finales de maturation ovocytaire, l'ovulation et/ou la formation du corps jaune (66). Le syndrome des ovaires polykystiques, caractérisé par une accumulation de follicules qui n'arrivent pas à maturité, est associé à une augmentation de l'expression des transcrits de *PROK1* dans l'ovaire (67). De plus, il a été montré que l'injection d'adénovirus codant pour les prokinéticines dans l'ovaire augmentait la formation de kystes (59). Concernant l'expression de la protéine PROK1, une sécrétion élevée a été détectée dans le liquide folliculaire en 2011, de l'ordre de 800 pg/ml (22, 68). Les concentrations sérique et folliculaire de PROK1 dans le liquide folliculaire global de FIV ont été rapportées comme significativement diminuées chez les patientes présentant un syndrome

d'hyperstimulation ovarienne (68). PROK1 a également été proposé comme marqueur du cancer ovarien (69, 70). De plus, l'injection de PROK1 dans l'ovaire a un effet angiogène intense chez le rat (59). L'ensemble de ces rôles confère à PROK1 une position importante dans la physiopathologie ovarienne (71). Les gènes *PROKR1* et *PROKR2* ont été rapportés comme fortement exprimés dans les cellules endothéliales lutéales (LEC), dont la prolifération est augmentée par PROK1 (72).

5.2.2. Rôle de PROK1 dans l'endomètre

PROK1 est décrit comme un marqueur de la réceptivité endométriale avec un pic pendant la fenêtre implantatoire (figure 23). Il induit l'angiogenèse endométriale et augmente plusieurs facteurs de croissance et gènes pro-implantatoires (73-76). Les transcrits de PROK1 ne sont plus détectables dans l'endomètre après la ménopause, ce qui est cohérent avec la régulation de l'expression de ce gène par les œstrogènes et la progestérone (21).

5.2.3. Rôle de PROK1 dans l'implantation embryonnaire

PROK1/PROKRs semblent jouer un rôle important dans l'initiation et le maintien de la grossesse (77, 78). Les taux circulants de PROK1 augmentent significativement pendant la grossesse : de 30 pg/ml environ chez la femme non enceinte, ils atteignent en moyenne 200 pg/ml au premier trimestre de la grossesse, avant de baisser à 70 pg/ml en moyenne aux deuxième et troisième trimestres (78). Plusieurs publications ont conclu à une augmentation du système PROK1/PROKR dans des pathologies de l'implantation embryonnaire et du développement placentaire : fausse-couches à répétition (79), grossesses extra-utérines (80), retard de croissance intra-utérin (81), et pré-éclampsie (78). Récemment, certaines variations de la séquence nucléotidique des gènes *PROK1, PROKR1,* et *PROKR2* ont été associées aux fausse-couches à répétitions (82) alors que d'autres variants semblent, au contraire, avoir un rôle protecteur aux stades précoces de la grossesse (83). Le système PROK1/PROKR a été décrit comme un acteur important du développement placentaire (19). Il est exprimé fortement par le trophoblaste, suggérant une sécrétion potentielle par le trophectoderme (20). Dans le placenta humain, PROK1 stimule la prolifération, la survie, et la migration des trophoblastes, participant ainsi à l'initiation puis au développement placentaire tout au long de la grossesse (19).

5.2.4. PROK1, biomarqueur de l'implantation embryonnaire en FIV?

L'implication de PROK1/PROKRs dans la physiopathologie ovarienne et implantatoire est rapportée dans de nombreuses publications, mais la faisabilité de son dosage dans les liquides

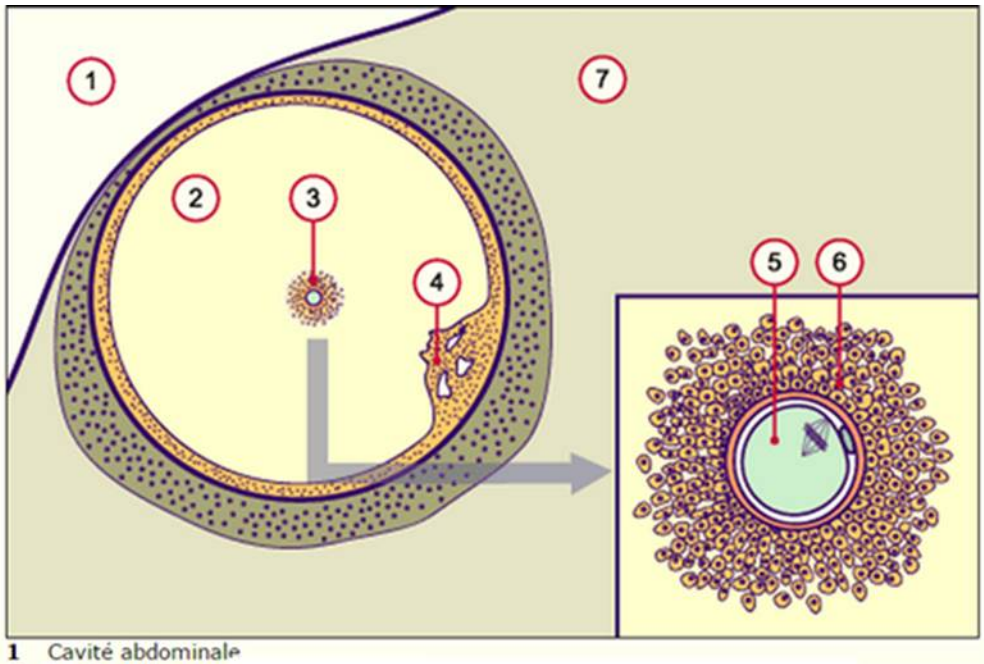
biologiques ou dans les extraits cellulaires accessibles en FIV a été très peu étudiée. En 2012, le groupe de Zhang a rapporté que la concentration sérique de PROK1 le jour du transfert embryonnaire chez des patientes prises en charge en FIV était corrélée à la qualité globale de la cohorte embryonnaire, et que cette même concentration était augmentée chez les patientes dont le transfert embryonnaire était concrétisé par une implantation (22). Bien que cette publication comporte plusieurs biais méthodologiques dans le dosage de PROK1 et l'analyse des résultats (voir la partie Discussion), ces travaux engagent à approfondir les connaissances du système PROK1/PROKRs dans la physiologie ovarienne et ouvrent des perspectives prometteuses sur le potentiel de PROK1 en tant que biomarqueur de routine en AMP (20).

Objectif

L'objectif de ma thèse a été d'approfondir les connaissances sur le système PROK1/PROKR dans la fertilité féminine par le développement de deux axes de recherches :

► Caractériser le niveau d'expression de PROK1 et de ses récepteurs dans le microenvironnement folliculaire humain.

► Déterminer le potentiel de PROK1 en tant que nouveau biomarqueur pronostique de l'implantation embryonnaire en FIVc.



1 Cavité abdominale
2 liquide folliculaire
3 Nuage de cellules du cumulus et ovule
4 Cumulus relâché
5 Ovocyte secondaire
6 cellules du cumulus
7 Tissu ovarien

Figure 24 : Follicule ovarien avant l'ovulation.
Adapté de http://www.embryology.ch/images/dimgbefrucht/01eisprung/d1i_sprungbereitfollik.gif

Résultats

1. AXE 1 : Caractériser le niveau d'expression de PROK1 et de ses récepteurs dans le microenvironnement folliculaire humain.

1.1. Contexte

A mon arrivée au Laboratoire d'Aide à la Procréation-CECOS en novembre 2011, peu de données étaient disponibles sur le système PROK1/PROKR dans la folliculogenèse humaine, en particulier sur l'expression protéique de PROK1 et de ses récepteurs dans le follicule ovarien chez la femme pubère. Devant ce constat, j'ai entrepris la caractérisation de ses niveaux d'expression dans le tissu ovarien humain, ainsi que dans les échantillons biologiques issus des ponctions de FIV, à savoir les cellules du cumulus (CCs), les cellules de la granulosa (mGCs) et le liquide folliculaire (voir figure 24).

1.2. Approches expérimentales

1.2.1. Echantillons biologiques et Patients

L'ensemble des échantillons biologiques analysés dans le cadre de ma Thèse d'exercice a été collecté au Laboratoire d'Aide à la Procréation-CECOS du CHU de Grenoble entre janvier 2013 et juillet 2015. Lors de leur prise en charge, les patients sont informés de la mission de recherche existant dans le CHU. Conformément à l'article L1211-2 du code de la santé publique, les patients ont la possibilité de consentir par écrit à la conservation des échantillons réalisés dans le cadre du soin dont ils n'ont pas ou plus l'utilité (voir ANNEXE 1). Le CRB GERMETHEQUE dispose des autorisations de collection et cession (autorisation n°AC-2009-886).

1.2.2. PROK1/PROKR dans le microenvironnement folliculaire

- **Localisation de PROK1 et de ses récepteurs dans le tissu ovarien humain**

L'accès à du tissu ovarien « sain » étant extrêmement difficile, nous avons utilisé du tissu ovarien provenant de patientes atteintes de lésions néoplasiques (cancer du sein et lymphome de Hodgkin exclusivement) pour lesquelles une préservation de fertilité par technique de cryopréservation ovarienne avait été réalisée au sein du CECOS du CHU de Grenoble. Toutes les patientes avaient consenti par écrit à la cession de leurs échantillons au CRB GERMETHEQUE dans le cas d'un abandon du projet parental. La cryopréservation

ovarienne est une technique proposée aux patientes prépubères et pubères qui présentent un risque d'insuffisance ovarienne prématurée. A ce jour, l'indication principale concerne les patientes dont le traitement médical présente une gonadotoxicité estimée modérée ou forte (ex : chimiothérapie). Les patientes incluses dans notre étude ont été sélectionnées pour leur risque faible de dysfonction ovarienne sur les critères suivants[7] : 1) âge inférieur à 35 ans, 2) présence des deux ovaires sans anomalie macroscopique ou antécédent chirurgical, 3) absence de pathologie ovarienne actuelle ou passée, 4) absence de contraception ou de stimulation hormonale, 5) absence de signes biologiques ou cliniques d'insuffisance ovarienne prématurée, 6) absence d'antécédent de chimiothérapie ou de radiothérapie, 7) absence de métastase connue, 8) risque théorique faible de présence de cellules cancéreuses dans le tissu ovarien (84), et 9) compte-rendu anatomopathologique normal. La localisation du système PROK1/PROKR a été caractérisée par Immunohistochimie sur coupes de tissu ovarien inclus « frais » en paraffine.

- **Expression de PROK1 et de ses récepteurs dans les cellules folliculaires**

J'ai étudié l'expression du système PROK1/PROKR dans les cellules folliculaires issues de FIV-ICSI, seule technique d'AMP permettant de collecter les CCs et les mGCs dans l'heure suivant la ponction ovarienne. L'analyse des transcrits a été réalisée par la technique de RT-qPCR selon des conditions mises au point dans le cadre de ma thèse de Sciences. L'expression en protéines de PROK1 et de ses récepteurs a été évaluée par Test ELISA[8] et Western-Blot, respectivement.

- **Sécrétion de PROK1 par les cellules folliculaires en culture primaire**

En 2011 et 2012, deux publications du même groupe rapportaient une concentration élevée de PROK1 dans le liquide folliculaire (aux alentours de 800 pg/ml (22, 68)), mais la source de sécrétion restait encore inconnue. J'ai mis en place un modèle de cultures primaires de cellules folliculaires au sein du laboratoire, dans le but de détecter une éventuelle sécrétion par les cellules du cumulus et/ou les cellules de la granulosa. Les surnageants des cultures cellulaires issus de FIV-ICSI ont été récupérés après 24H, 48H, et 5 jours de culture. La protéine PROK1 a été dosée par test ELISA.

[7] A la date de la cryoconservation ovarienne.
[8] L'identification des conditions nécessaires à la mise au point d'un Western-Blot pour PROK1 est actuellement en cours au Laboratoire. A ce jour, aucune publication présentant l'expression de PROK1 par Western Blot n'a été rapportée dans la littérature internationale.

2. AXE 2 : PROK1, biomarqueur pronostique de l'implantation embryonnaire en FIVc ?

2.1. Contexte

L'expression importante de PROK1 dans le liquide et les cellules folliculaires suggèrerait un rôle de ce facteur dans la maturation du follicule ovarien, et donc dans l'acquisition par l'ovocyte de la compétence à donner un embryon apte à s'implanter. Une étude prospective de cohorte de Janvier 2013 à Juin 2015 a été réalisée afin d'évaluer le potentiel de PROK1 en tant que nouveau biomarqueur pronostique de l'implantation embryonnaire en FIV.

2.2. Approches expérimentales

Pour cette première étude, nous avons inclus des tentatives de FIVc de rang 1[9], afin de minimiser le risque d'une composante endométriale et d'une composante masculine dans l'infertilité du couple. Une concertation entre les titulaires du centre d'AMP a conduit à la décision de ne pas modifier les techniques de ponction ovarienne et de mise en fécondation des gamètes pour cette première étude. Chaque tentative de FIVc a donc été réalisée selon les techniques de routine en vigueur dans notre centre, à savoir une collecte et une mise en fécondation « globales » des liquides folliculaires et des CCO. Une telle méthodologie permet d'évaluer le potentiel du dosage de PROK1 comme critère prédictif de l'issue de la tentative de FIV, mais ne permettra pas d'améliorer l'identification des embryons à haut potentiel implantatoire parmi la cohorte embryonnaire (*étude prospective de cohorte en cours, voir Partie Perspectives*). L'étude de faisabilité du dosage de PROK1 par Test ELISA dans les échantillons issus de ces tentatives de FIV a révélé une détection de 100% dans le liquide folliculaire et les plots de fécondation, avec des concentrations variant de 93,3 pg/ml à 3,4 ng/ml pour le liquide folliculaire, et de 3,3 à 372,8 pg/ml pour les plots de fécondation.

Ces travaux ont été valorisés par 3 communications affichées, 5 communications orales et 2 publications dans des journaux à comité de lecture :

► *Deux communications affichées en Français lors de la Journée de la Recherche Médicale (JRM) de l'Université Joseph Fourier en juin 2013 et 2014 (voir annexe 2 et 3).*

► *Une invitation pour une communication orale en Français dans la session « Graine de Chercheurs » lors des 18ème journées nationales de la Fédération Française d'Etude de la Reproduction (FFER) en septembre 2013. Cette invitation a été associée à une première*

[9] Première tentative de FIVc pour la patiente.

publication dans la revue Gynécologie, Obstétrique et Fertilité (GOF) en premier auteur en septembre 2013 (voir publication n°1).

► *Une communication orale en Français lors de l'assemblée générale du Collège Hospitalo-Universitaire de Biologie et Médecine du Développement et de la Reproduction (BMDR) en décembre 2013.*

► *Une communication orale en Anglais lors du 30th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), en juin 2014.*

► *Une communication orale en Anglais lors du 22th Annual Scientific Day of the G2L2 Association, en juin 2014.*

► *Une communication orale en Français lors de la 3ème journée du Groupe de la Francophonie Placentaire (GFP), en septembre 2014.*

► *Une communication affichée en Français lors des 19ème journées nationales de la Fédération Française d'Etude de la Reproduction (FFER), en septembre 2014 (voir annexe 4).*

► *Une publication en Anglais dans le Journal of Clinical Endocrinolgy and Metabolism (JCEM) en tant que dernier auteur (IF : 6,4, SIGAPS A, sous presse) (voir publication n°2).*

3. PUBLICATION N°1

PROK1, bio-marqueur de l'implantation embryonnaire ?

PROK1, prognostic marker of embryo implantation?

S. Brouillet[1, 2, 3, 4], P. Hoffmann[1, 2, 3, 4], C. Thomas-Cadi[1], U. Bergues[1], J-J. Feige[2, 3, 4], N. Alfaidy[2, 3, 4] et S. Hennebicq[1, 4, 5].

[1] Centre d'Aide Médicale à la Procréation, Hôpital Couple-Enfant, CHU Grenoble, CS 10217, 38043 GRENOBLE cedex 9.

[2] Laboratoire BCI -iRTSV, INSERM U1036, Biologie du Cancer et de l'Infection, CEA Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054, Grenoble Cedex 9, France.

[3] Commissariat à l'Energie Atomique, Institut de Recherche en Technologie et Sciences pour le Vivant, Grenoble, France.

[4] Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

[5] Equipe "Génétique, Infertilité et Thérapeutiques," Laboratoire AGIM, CNRS FRE3405, Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

Sylviane Hennebicq et Nadia Alfaidy participent équitablement à l'élaboration de ce travail.

Auteur correspondant : Sophie Brouillet, sbrouillet@chu-grenoble.fr, téléphone : 04 76 76 73 00, fax : 04 76 76 89 50

Résumé

Malgré l'amélioration des techniques d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) depuis 30 ans, le taux de grossesse reste toujours limité, avec environ 25% de grossesses par transfert pour une moyenne de 2 embryons transférés. Actuellement, la sélection de ces embryons repose sur l'établissement de scores morpho-cinétiques, dont l'utilisation exclusive montre ses limites. L'amélioration des taux de grossesse en AMP dépend aujourd'hui de l'identification de biomarqueurs utilisables en routine hospitalière et étroitement corrélés au potentiel implantatoire des embryons. Parmi ces facteurs, la prokinéticine 1 (PROK1) et ses récepteurs (les PROKRs) constituent de nouvelles cibles qui ont réuni au fil des dix dernières années des caractéristiques biologiques en rapport direct avec le succès de la grossesse : de la physiologie ovarienne au développement placentaire en passant par la réceptivité endométriale et l'implantation embryonnaire. En AMP, les taux sériques de PROK1 ont été décrits en 2012 comme significativement associés à la qualité globale de la cohorte embryonnaire, ainsi qu'aux taux de grossesse. Ces données récentes attestent du potentiel pronostique de cette cytokine dans le succès de l'implantation et l'évolutivité de la grossesse, et soulève le caractère urgent de l'évaluation de son dosage dans les milieux biologiques associés à chaque ovocyte/embryon afin d'établir sa corrélation avec la survenue d'une grossesse en AMP.

Mots clés : prokinéticines, EG-VEGF, biomarqueur, implantation, assistance médicale à la procréation.

Abstract

In spite of improvements in Assisted Reproductive Technology (ART) during the last 30 years, the rate of pregnancy remains constrained, as only about 25 % of embryo transfer leads to successful pregnancies, even with an average of 2 embryos replaced. Embryo selection is currently based on the establishment of morphokinetic scores, a method that obviously exhibits limitations. Therefore, the assessment of embryo development potency by criteria of higher predictive value is mandatory in order to increase the rates of pregnancy. Nowadays, there is increasing evidence that angiogenic factors might contribute to the success of the implantation and to the pregnancy outcome. Among these factors, prokineticin 1 (PROK1) and its receptors (PROKRs) constitute new targets that showed over the last ten years strong biological features directly linked to ovarian physiology, endometrial receptivity, embryo implantation and thus successful pregnancies. In ART, the rates of circulating PROK1 were reported in 2012 as significantly linked to the quality of embryonic cohort, as well as to the rates of pregnancy. Our preliminary data suggest a high potential of this cytokine in the success of implantation and pregnancy, and strongly overtones the emergency to investigate the value of its measurement in conditioned media of oocytes and embryo cultures in ART.

Keywords: prokineticin, EG-VEGF, biomarker, Assisted Reproductive Technology, implantation

Introduction

L'infertilité concerne au minimum 70 millions de couples dans le monde. Malgré l'amélioration des techniques d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP), deux problèmes majeurs subsistent : un taux de succès toujours limité avec environ 25% de grossesses par transfert pour une moyenne de 2 embryons replacés, ainsi que l'augmentation significative des grossesses multiples due au transfert de plusieurs embryons dans la cavité utérine. Actuellement, l'établissement de scores morphocinétiques sert de référence, mais cette pratique se révèle peu prédictive avec plus de 80% des embryons transférés qui ne s'implantent pas. Paradoxalement, certains embryons au score défavorable évoluent pourtant vers une grossesse physiologique et une naissance à terme. L'enjeu actuel de l'AMP est d'établir de nouveaux critères de sélection embryonnaire permettant ainsi la mise en place globale de la politique de transfert embryonnaire unique, seul rempart contre la morbidité associée aux grossesses multiples multizygotiques. Depuis plusieurs années, de nouvelles approches dites « omics » se développent - transcriptomique, protéomique et métabolomique – et ont permis d'identifier plusieurs centaines de gènes et/ou protéines impliquées dans les « signatures moléculaires » des embryons à fort potentiel implantatoire. Face à un tel déferlement de données, l'urgence est de mettre à l'épreuve ces marqueurs en testant la faisabilité de leur dosage en routine clinique et d'évaluer leur pertinence en tant que marqueur pronostique. Les cytokines solubles impliquées dans la compétence ovocytaire, le développement embryonnaire et/ou la réceptivité endométriale présentent un intérêt évident pour leur application potentielle comme biomarqueurs non-invasifs dans la pratique clinique.

1. Les prokinéticines : une nouvelle famille de protéines secrétées spécifiques des tissus endocrines

Les prokinéticines se composent de PROK1 (ou EG-VEGF pour Endocrine gland–derived vascular endothelial growth factor) et de PROK2, qui activent avec la même affinité deux récepteurs couplés aux protéines G, PROKR1 et PROKR2. Elles présentent une expression majoritaire dans les ovaires, le placenta, les testicules et les surrénales, ce qui est à l'origine de leur caractérisation initiale comme facteurs spécifiques des glandes endocrines [1]. PROK1 est exprimée majoritairement dans le tractus féminin, tandis que PROK2 se localise préférentiellement dans les testicules et le système nerveux central, avec une expression quasi indétectable dans l'ovaire et le placenta [2].

2. Rôle des prokinéticines dans la fonction reproductive chez la femme

Des données grandissantes de la littérature placent le système PROK1/PROKRs au centre de la fonction reproductive chez la femme, et plus particulièrement au cœur des régulations entre l'embryon et l'endomètre (voir Fig.1). En 2012, il a été rapporté chez les patientes prises en charge en FIV que le taux sérique de PROK1 deux jours après la ponction ovarienne était positivement corrélé avec la qualité globale de la cohorte embryonnaire et avec les taux de grossesse [3]. Ces données récentes associées aux rôles de PROK1 dans la prolifération et l'invasion trophoblastique, la réceptivité endométriale et la physiopathologie ovarienne suggèrent son potentiel comme bio-marqueur de l'implantation embryonnaire.

3. Comment PROK1 serait associée avec l'implantation embryonnaire ?

De nombreuses publications de notre équipe et d'autres groupes de recherche rapportent l'implication du système PROK1/PROKRs dans la grossesse (voir Fig. 1).

a. Rôle de PROK1 dans la compétence ovocytaire

PROK1 est impliquée dans la physiopathologie ovarienne probablement via PROKR2 dont l'invalidation chez la souris entraine une absence de développement des follicules ovariens et du corps jaune [4]. Son expression est modulée dans l'ovaire au cours du cycle menstruel. Elle est

également dérégulée dans des pathologies ovariennes où elle est significativement associée au syndrome des ovaires polykystiques, et décrite comme marqueur du syndrome d'hyperstimulation ovarienne.

b. PROK1 est un facteur angiogène

L'angiogenèse est une composante majeure de la qualité ovocytaire et embryonnaire, et semble jouer un rôle crucial dans toutes les étapes de la grossesse. PROK1 est décrite comme un facteur angiogène dans de nombreux tissus. Notre équipe a décrit en 2010 le rôle angiogène de PROK1 sur les cellules endothéliales microvasculaires placentaires et sa participation dans le développement physiologique placentaire [5-6].

c. Rôle de PROK1 dans la réceptivité endométriale

L'obtention d'une grossesse dépend non seulement du potentiel implantatoire de l'embryon mais également de la réceptivité de l'endomètre. PROK1 est décrite comme un marqueur de la réceptivité endométriale avec un pic au moment de la fenêtre implantatoire, où elle joue un rôle dans l'induction de l'angiogenèse et dans l'augmentation de facteurs de croissance et de gènes pro-implantatoires [7].

d. PROK1 induit la prolifération et la survie des trophoblastes

Nos travaux ont également montré une induction de la prolifération et de la survie des trophoblastes villeux par PROK1 via le récepteur PROKR1 [6, 8-9]. Cette étape d'expansion trophoblastique étant nécessaire à toute implantation embryonnaire, le système PROK1/PROKRs pourrait donc intervenir précocement dans l'établissement de la grossesse.

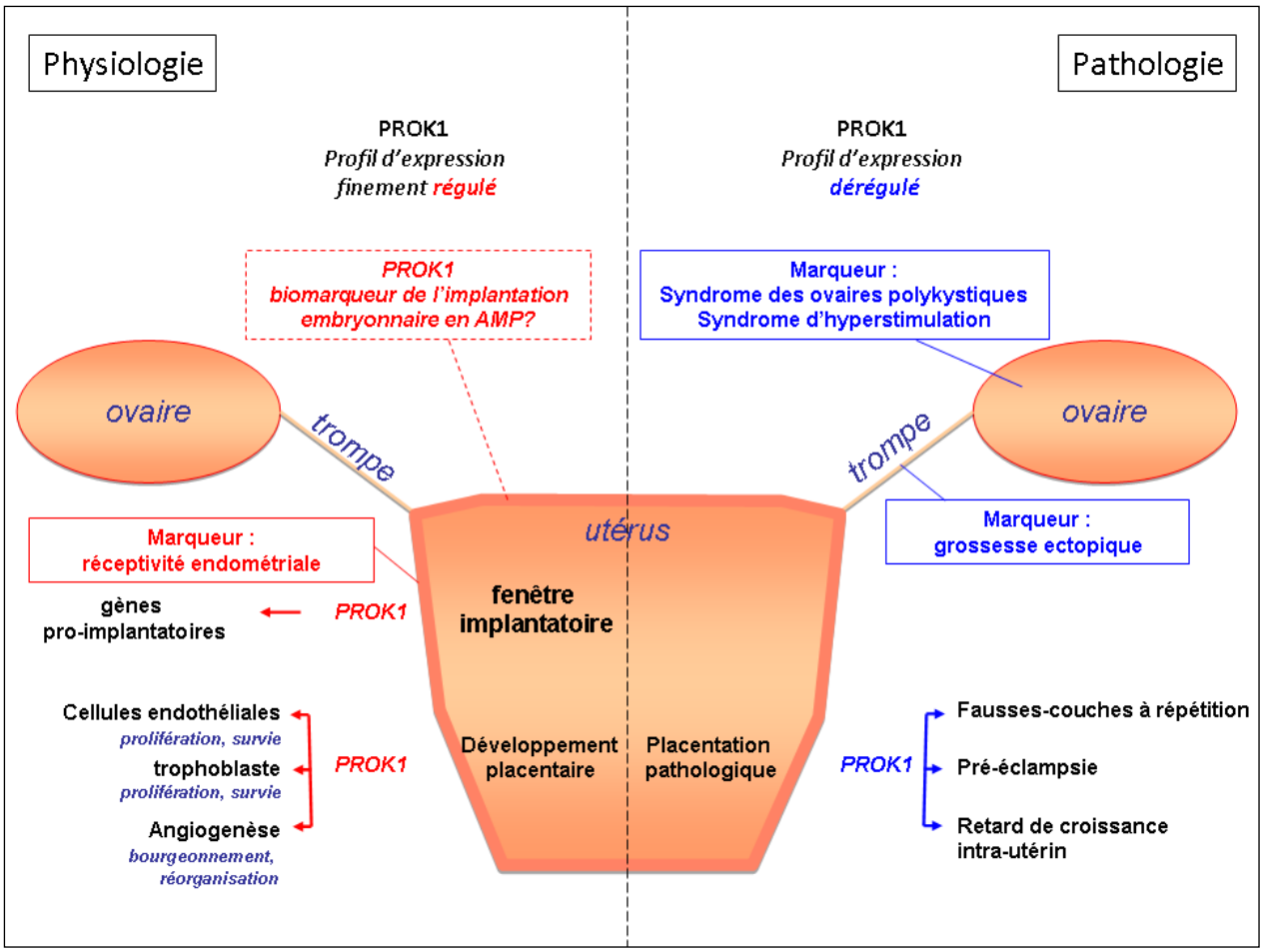
e. PROK1 est augmentée pendant la grossesse

En 2009, notre équipe a établi l'augmentation sérique de PROK1 chez la femme enceinte avec un profil dynamique pendant la grossesse avec 200 pg/ml environ au premier trimestre de grossesse, suivie d'une chute rapide au 2ème et 3ème trimestre avec 70 pg/ml environ [9]. L'expression de PROK1 chez la femme non enceinte est d'environ 30 pg/ml.

f. PROK1 est associée aux fausses-couches récurrentes

PROK1 est significativement dérégulée dans de nombreuses pathologies de la grossesse. Récemment, des polymorphismes et haplotypes de PROKR1 et PROKR2 ont été décrits comme associés aux fausses couches récurrentes, concluant ainsi que PROK1 et ses récepteurs étaient impliqués conjointement dans cette pathologie [10].

Figure 1 : Schéma récapitulatif des rôles de PROK1 dans la fonction reproductive chez la femme



g. PROK1, bio-marqueur de l'implantation embryonnaire ?

L'ensemble de ces données a conduit notre équipe à tester l'utilisation de PROK1 comme bio-marqueur pronostique de l'implantation en routine en AMP. Afin de vérifier cette hypothèse, nous menons actuellement une étude de cohorte longitudinale prospective dans une population

de 200 couples pris en charge dans le centre d'AMP du CHU de Grenoble dans le cadre d'une FIV avec transfert d'embryon unique.

i. Faisabilité du dosage de PROK1 en routine hospitalière en AMP

Nous avons mesuré l'expression de PROK1 et de ses deux récepteurs PROKR1 et PROKR2 dans les différents échantillons biologiques issus d'une FIV ainsi que dans le tissu ovarien, en collaboration avec le CRB (centre de ressources biologiques) GERMETHEQUE de Grenoble. Le taux de PROK1 a été dosé dans les liquides folliculaires, les cellules du cumulus, les plots de fécondation et les milieux de culture embryonnaire par méthode immuno-enzymatique ELISA, technique rapide et peu onéreuse. Nos premiers résultats montrent une expression forte de PROK1 dans la majorité des liquides biologiques testés avec une grande variation interindividuelle. La détection de PROK1 dans les milieux de culture embryonnaire, à raison de 600 µl de milieu de culture par embryon, est indétectable directement. Des techniques de concentration sont actuellement en cours d'évaluation pour déterminer l'existence d'une potentielle sécrétion de PROK1 par les embryons.

ii. Association de PROK1 avec la survenue d'une grossesse en AMP

L'analyse des premiers échantillons révèle que le taux de PROK1 est significativement augmenté dans le liquide folliculaire lorsque celui-ci provient d'une ponction ayant abouti à une grossesse. Concernant les expressions des PROK1/PROKRs dans les cellules du cumulus, elles semblent augmenter avec le stade de maturité ovocytaire associé. Ce résultat est en adéquation avec l'augmentation de PROK1 dans les plots de fécondation des ovocytes associés à une grossesse évolutive. Ces premiers résultats attestent du potentiel de PROK1 comme biomarqueur de l'implantation utilisable en routine hospitalière. L'augmentation prochaine du nombre d'échantillons analysés ainsi que la mise au point du dosage de PROK1 dans les milieux des cultures embryonnaires permettra très prochainement de valider ou d'infirmer cette hypothèse.

Conclusion : Les rôles majeurs des prokinéticines dans la réceptivité endométriale, l'invasion et le développement placentaire place le système PROK1/PROKRs au carrefour des interactions fœto-maternelles. L'ensemble de ces données associées aux premiers résultats de notre étude atteste du potentiel de PROK1 comme biomarqueur de l'implantation utilisable en routine hospitalière. L'augmentation prochaine du nombre d'échantillons analysés ainsi que le dosage de PROK1 dans les milieux des cultures embryonnaires, dont la mise au point est actuellement en cours, permettra très prochainement de valider ou d'infirmer cette hypothèse.

References:

[1] LeCouter, J., et al., Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. Nature, 2001. 412(6850): p. 877-84.

[2] Maldonado-Perez, D., et al., Potential roles of the prokineticins in reproduction. Trends Endocrinol Metab, 2007. 18(2): p. 66-72.

[3] Gao, M.Z., et al., Effects of EG-VEGF, VEGF and TGF-beta1 on pregnancy outcome in patients undergoing IVF-ET treatment. J Assist Reprod Genet, 2012. 29(10): p. 1091-6.

[4] Matsumoto, S., et al., Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(11): p. 4140-5.

[5] Brouillet, S., et al., Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells. Mol Biol Cell, 2010. 21(16): p. 2832-43.

[6] Brouillet, S., et al., Revisiting the role of hCG: new regulation of the angiogenic factor EG-VEGF and its receptors. Cell Mol Life Sci, 2012. 69(9): p. 1537-50.

[7] Haouzi, D., et al., Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. Hum Reprod, 2009. 24(1): p. 198-205.

[8] Brouillet, S., et al., EG-VEGF controls placental growth and survival in normal and pathological pregnancies: case of fetal growth restriction (FGR). Cell Mol Life Sci, 2013. 70(3): p. 511-25.

[9] Hoffmann, P., et al., Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications. J Cell Mol Med, 2009. 13(8B): p. 2224-35.

[10] Su, M.T., et al., Polymorphisms of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor gene and its receptor genes are associated with recurrent pregnancy loss. Hum Reprod, 2010. 25(11): p. 2923-30.

4. PUBLICATION N°2

PROK1 level in the follicular microenvironment: a new non-invasive predictive biomarker of embryo implantation.

Nadia Alfaidy[1,3,4,*], Pascale Hoffmann[1,2,3,4,*], Pierre Gillois[1,6], Aurore Gueniffey[1,2], Camille Lebayle[1], Héloïse Garçin[1], Claire Thomas-Cadi[2], Julien Bessonnat[1,2,5], Charles Coutton[1,5,7], Laure Villaret[2], Nicole Quenard[2], Ulrike Bergues[2], Jean-Jacques Feige[1,3,4], Sylviane Hennebicq[1,2,5] and Sophie Brouillet[1,2,3,4].

[1] Université Grenoble-Alpes, 38000, Grenoble, France.
[2] Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, Hôpital Couple-Enfant, Centre Clinique et Biologique d'Assistance Médicale à la Procréation-CECOS, 38700, La Tronche, France.
[3] INSERM, Unité 1036, Biologie du Cancer et de l'Infection, 38000 Grenoble, France.
[4] CEA, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, Laboratoire BCI, 17, rue des Martyrs, 38000 Grenoble, France.
[5] Equipe "Génétique, Epigénétique et thérapies de l'Infertilité" Institut Albert Bonniot, INSERM U823, Grenoble, F-38000, France.
[6] CNRS, UMR 5525, TIMC-IMAG, Themas, 38000 Grenoble, France.
[7] Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, Hôpital Couple Enfant, Département de Génétique et Procréation, Laboratoire de Génétique Chromosomique, 38700, La Tronche, France.

* Nadia Alfaidy and Pascale Hoffmann: equal contributions

Abbreviated title: PROK1 is a new biomarker of embryo implantation
Keywords: prokineticin 1, endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor, Embryo implantation, Biomarker, *In vitro* Fertilization.
Word count: 3,598 words.
Number of figures and tables: 4 figures and 2 tables (3 supplemental tables and 1 supplemental Figure).

Corresponding author and person to whom reprint requests should be addressed:
Sophie Brouillet, PhD
Department of Reproductive Medicine, University Hospital of Grenoble
Laboratoire d'Aide à la Procréation - CECOS
Hôpital Couple-Enfant - CHU Grenoble
BP 217 - 38 043 Grenoble - Cedex 09 - FRANCE.
Phone: +33476760071
Fax: +33476768950
e-mail: *[Données à caractère personnel]*

Disclosure Statement: the authors have nothing to disclose.

Acknowledgments
We acknowledge Dr. Pierre Truong, Dr. Laure Descombe and Dr. Caroline Sauvanaud of the department of Gynecology and Obstetrics at the Chambéry Hospital for their contribution. We acknowledge the following sources of funding: INSERM (Unité 1036), Université Grenoble-Alpes, Commissariat à l'Energie Atomique (DSV/iRTSV/BCI), Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble (CHUG), Agence de la Biomédecine (ABM), Groupe Pasteur Mutualité (GPM).

Abstract

Context: Prokineticin 1 (PROK1), also called EG-VEGF (Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor), is a well-established regulator of endometrial receptivity and placental development. However, its clinical usefulness as a non-invasive predictive biomarker of embryo implantation is yet to be validated.

Objective: The main objective was to determine the relationship between PROK1 levels in the follicular fluid (FF) and fertilization culture media (FCM) and the reproductive outcome in patients who received a first conventional *in vitro* fertilization-embryo transfer (cIVF-ET). The secondary objective was to characterize the expression of PROK1 and its receptors (PROKR) in the human follicular microenvironment.

Design and Setting: We conducted a prospective study between January 2013-June 2015 at the University Hospital of Grenoble.

Patients: 135 infertile IVF patients and 10 women undergoing ovarian tissue cryopreservation were included.

Interventions: PROK1 concentration was measured by ELISA in FF and FCM collected on the day of oocyte retrieval and the day of oocyte denudation step, respectively. Follicular expression of the PROK1/PROKR system was determined by immunohistochemistry, RT-qPCR, and ELISA.

Main Outcome Measure: Assessment of the clinical pregnancy rates.

Results: FF and FCM PROK1 levels were significantly higher in the embryo implantation group ($p<0.001$) and were predictive of subsequent embryo implantation (AUC_{ROC}, 0.91 [0.81-1.00] ($p=0.001$) and 0.88 [0.72-1.00] ($p=0.001$), respectively). FF and FCM PROK1 levels remain similar irrespective of embryo morphokinetic parameters ($p=0.71$ and $p=0.83$, respectively). PROK1/PROKR system is expressed during human folliculogenesis.

Conclusions: PROK1 levels in FF and FCM could constitute new predictive non-invasive markers of successful embryo implantation in cIVF-ET.

Introduction

Infertility affects 10–15% of couples worldwide (30). Despite many advances in *in vitro* fertilization (IVF) techniques, implantation failure is thought to be a major limiting step in the success of these medically assisted pregnancies (45). To date, criteria used to predict embryo implantation potential have mostly included embryo morphokinetic parameters, but their predictive value remains limited (45, 85). In the last years, analysis of oocyte-derived products, such as follicular fluid (FF) and cumulus cells (CC), has offered numerous candidates to assess oocyte competence and embryo implantation ability (86-89). However, the clinical validation of these biomarkers is mandatory to significantly improve the IVF outcome.

Prokineticin 1 (PROK1), also named Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor (EG-VEGF), is a newly identified angiogenic and proliferative factor, which is predominantly expressed in the ovary and the placenta (19, 59). Its biological activity is mediated by two G protein-coupled receptors, prokineticin receptor-1 (PROKR1) and -2 (PROKR2). PROK1 has major functions on the female reproductive tract with key roles in endometrial receptivity and placental development (19, 21, 90). In the endometrium, PROK1 protein expression peaks at the mid-luteal phase of the menstrual cycle, corresponding to the window of embryo implantation, and has been reported as a biomarker of human endometrial receptivity (91-93). Moreover, PROK1 directly enhances the expression of endometrial implantation genes and increases human trophoblast adhesion to extracellular matrix proteins (73-75, 94), suggesting a direct role of this cytokine in the cross-talk between embryo trophectoderm and endometrial cells during the implantation window. In the placenta, the PROK1/PROKR system is highly expressed and plays multiple roles in placental angiogenesis and trophoblast proliferation, survival, migration, and invasion (19, 77, 78, 95, 96). During pregnancy, PROK1 circulating levels increase from approximately 50 pg/ml in non-pregnant women to approximately 250 pg/ml during the first trimester of pregnancy, before declining during the second and the beginning of the third trimester (≈ 70 pg/ml) (78).

Recently, PROK1 circulating levels have been reported to positively correlate with embryo cohort quality and to be associated with the pregnancy outcome in women undergoing IVF treatment (22). These data suggest a direct role of PROK1 in oocyte competence acquisition and in the implantation potential of the subsequent embryo (22). However, little is known regarding the ovarian expression of the PROK1/PROKR system and its role in human folliculogenesis (66, 67, 91). Therefore, we decided to characterize the expression of the PROK1/PROKR system in the human ovary and to investigate the relationship between follicular PROK1 levels and the reproductive outcome in patients undergoing *in vitro* fertilization-embryo transfer (cIVF-ET).

Material and methods

Subjects
The study recruited 135 infertile patients between January 2013 and June 2015: 67 women, 34 IVF couples and 10 women undergoing ovarian tissue cryopreservation (Figure 1, Supplemental Table 1 and 2). All women met the following inclusion criteria: 1) both ovaries present and exempt of morphological abnormalities or surgical history; 2) basal follicle stimulating hormone (FSH) circulating level <10 IU/L on the 3rd day of the unstimulated cycles; 3) no current or past disease affecting the ovaries; 4) no current or past chemotherapy and/or radiotherapy treatment. Women suffering from ovarian hyperstimulation syndrome, tobacco use, recurrent pregnancy loss, or/and ectopic pregnancy were not enrolled, as deregulation of the PROK1/PROKR has been reported under these conditions (68, 82, 97-101). All the samples were included in the GERMETHEQUE biobank after signed informed consent of all the patients (procedure approved by the institutional ethics review board, CPP Sud-Ouest).

Tissue collection and immunohistochemistry
A series of forty experiments were carried out using fresh human ovarian tissue from 10 pubescent patients (14–30 years of age) undergoing unilateral oophorectomy for ovarian cryopreservation (Supplemental Table 1). The samples were fixed overnight at 4°C in 4 % (v/v) paraformaldehyde, embedded in paraffin and cut into 5-µm sections. Immunohistochemistry was processed as described previously (96). Briefly, sections were incubated with anti-PROK1 (rabbit polyclonal anti-human PROK1 1:50, 0.48 µg/ml, Covalab), anti-PROKR1 (rabbit polyclonal anti-human PROKR1, 1:200, 0.84µg/ml, Covalab), and anti-PROKR2 (rabbit monoclonal anti-human PROKR2 1:200, 0.84µg/ml, Covalab) antibodies. Negative controls were conducted as previously described (77).

***In vitro* Fertilization Stimulation**
The patients undergoing IVF were superovulated by treatment with FSH or human menopausal gonadotropin (hMG) following down-regulation with GnRH agonists. Monitoring of follicle development by real-time ultrasonic scans and estimation of serum estradiol (E2) levels was performed from the seventh day of stimulation to the day of ovulation induction. Once 3 follicles at least had reached a size >16mm, with an appropriate serum Peak E2 level (but <3,000 pg/ml), ovulation was triggered with 5,000 IU of human chorionic gonadotropin hormone (hCG) administered intramuscularly.

Oocyte retrieval
Oocyte retrieval (OR) was performed with Flushing Medium® with Heparin 10 UI/ml (Origio). FF was aspirated from mature-sized follicles (16–20 mm diameter) under transvaginal ultrasound guidance at the time of OR, approximately 35h after administration of hCG, and maintained at 37 °C until collection of the cumulus-oocyte complexes (COC).

Follicular cells collection and processing
Follicular cells were taken from 67 women undergoing IVF with intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for male infertility.

Mural Granulosa Cells (mGCs) collection
After COC retrieval from the fluid, mGCs were isolated from FF as previously described (102). At the end of the procedure, mGCs were washed twice in Phosphate-Buffered Saline medium (PBS, Gibco®) and centrifuged at 350*g* for 5 min at room temperature.

Cumulus cells (CCs) collection
Cumulus-oocyte complexes (COC) were pooled in Universal IVF® Medium with phenol red (Origio) and denuded of their surrounding CCs both enzymatically and mechanically using 80IU/ml of hyaluronidase (JCD) and Stripper tips (Origio). CCs were collected and centrifuged at 350*g* for 5 min at room temperature.

Processing for CCs and mGCs mRNA, protein and cell culture studies
The harvested cells were directly stored at -196°C for future mRNA isolation, or suspended in 100µl of ice-cold RIPA lysis buffer (Pierce) and stored at -20°C for future protein extraction, as previously described (96). For cell culture studies, the harvested cells were suspended in culture medium (CM: DMEM-F12 medium (Gibco) supplemented with 10 % of heat inactivated Fetal Bovine Serum (Gibco) and 1UI/mL penicillin/streptomycin (PAA)). Triplicate portions of CC and mGC suspensions (1×10^4 viable cells in CM per well) were seeded into plastic culture dishes. CC and mGCs viability was assessed by 1% (wt/vol) trypan blue dye exclusion. One day later, the cells were rinsed three times with CM to remove remaining red blood cells or leukocytes (103) and incubated in 500µl of fresh CM. This day was designated as day 0. The cells were then incubated at 37°C in a humidified tissue culture incubator gassed with 95% air and 5% CO_2. The supernatants were collected after 2, 3 and 5 days of culture.

Follicular Fluids (FF) and Fertilization Culture Media (FCM) collection
A prospective study was performed between January 2013 and January 2014 at the center for Assisted Reproductive Techniques (ART) of the University Hospital of Grenoble, France. FF and FCM were taken from 34 couples undergoing a first conventional IVF treatment in order to avoid the male factor in the etiology of the infertility. Immediately after collecting the oocytes (day 0), the FF of each woman were pooled and centrifuged at 350*g* for 10 min at room temperature to eliminate cellular elements and subsequently frozen within 30 min after collection at -80 °C for future analysis. Conventional fertilization was performed in ISM1® medium (Origio) on the day of oocyte retrieval (day 0). Three COC were inseminated with 100,000 motile spermatozoa in a total volume of 600µl of ISM1® per well (day 0). FCM of each couple were collected and pooled after the oocyte denudation step (ODS) 18 hours later (day 1).

Fertilization and cleavage assessment, embryo transfer and pregnancy assessment
After oocyte retrieval (day 0), fertilization was assessed after the ODS 18 hours later (day 1). The presence of two pronuclei signed a successful fertilization. On day 2, embryo morphokinetic parameters were evaluated prior to transfer (Supplemental Table 3). The present study only included fresh transfers of a single embryo on day 2. Thus, the morphokinetic parameters of all implanted embryos were identified. Embryo implantation success was defined by clinical pregnancy, assessed with the presence of a gestational sac with fetal heartbeat around 7 weeks of gestation.

RNA isolation, reverse transcription (RT) and quantitative-PCR (q-PCR) analysis
Total RNA was extracted from CCs and mGCs using a NucleoSpin® RNA XS kit (Macherey Nagel). RT-qPCR was performed as previously described (96). Data on mRNA expression are shown as the relative amount normalized to that of GAPDH. To assess linearity and efficiency of PCR amplification, standard curves for all transcripts were generated by using serial dilutions of cDNA. A melt curve analysis was carried out on the products of amplification reaction to ascertain the melting temperature of the product.

Western Blot
CCs and mGCs protein samples were denatured, separated and electrically transferred onto nitrocellulose membrane as previously described (96). Membranes were blotted with antibodies against PROKR1 and PROKR2, both used at a final concentration of 0.84µg/ml, as previously described (77). To standardize for sample loading, the blots were subsequently stripped using a commercially available kit following the manufacturer's instructions (Re-blot; Millipore, France) and re-probed with a β-actin antibody (Sigma-Aldrich, France) as an internal control of protein loading.

PROK1 ELISA
PROK1 protein levels were quantified as previously described (104). We used a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (PeproTech) according to the manufacturer's instructions. All samples were in the linear range of the standard curves when using a five-fold dilution of FF. Each sample was run in triplicate with <5% intra-assay and <9% inter-assay coefficient of variation.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with R 3.0 (R Core Team (2014), R Foundation for Statistical Computing, Austria. URL http://www.R-project.org/) and GraphPadPrism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

To investigate the relationship between FF and FCM PROK1 levels with the embryo implantation potential, 11 couples were required for each group to provide the target sample size with 90% as power, 5% as α level (9.451 – 6.682 and 18.5– 3.1 as means differences and sigma, respectively). The data were summarized as mean ± standard error of the mean (SEM) or Inter Quartile Range (IQR) for continue quantitative data, and number and proportion for qualitative data. Normality of data was assessed firstly by histogram in addition to the formal tests used for normality as Shapiro test. With two groups, non-parametric t-test (Mann Whitney) was used. With more than two groups, Kruskal–Wallis one-way analysis of variance by ranks as non-parametric methods was used. Receiver operating characteristic (ROC) analysis was performed on FF and FCM PROK1 levels using the clinical pregnancy outcome as the basis for truth to determine respective performances and sensibility/specificity. The area under the curve (AUC) indicates the degree of predictive ability of FF and FCM PROK1 levels, with 0.5–0.6: no discrimination; 0.6–0.7: poor discrimination; 0.7–0.8: fair discrimination; 0.8–0.9: good discrimination; and 0.9–1: excellent separation. The Overall accuracy, the Youden index and the CI95% of the AUC complete the analysis. The AUC was tested with the p=0.5 hypothesis. The exact Fisher test was used to evaluate the significance of odds ratio.

Results

Experimental Design and Patient Clinical Characteristics
The experimental design is illustrated in Fig. 1. Patient characteristics are detailed in Supplemental Table 1 and 2.

PROK1/PROKR protein localization in the human ovary
Figure 2 shows representative immunohistochemistry for PROK1/PROKR localization in ovarian tissues (a-i) from women undergoing ovarian cryopreservation (n=10) in comparison with negative controls (j-l). PROK1, PROKR1 and PROKR2 are present in primordial (a, d, and g, respectively), primary (b, e, and h, respectively), and antral follicles (c, f and i, respectively). In antral follicles, PROK1 and PROKR1 show a strong staining in the oocytes with a slight staining in granulosa and theca cells, whereas PROKR2 displays a strong expression in the oocytes and the theca cells with a slight staining in the granulosa cells.

PROK1/PROKR expression in isolated CCs and mGCs
To investigate the expression of PROK1/PROKR in follicular cells, both CCs and mGCs were isolated from women undergoing IVF-ICSI treatment. Fig. 2A shows comparisons of the expression levels of PROK1, PROKR1 and PROKR2 transcripts by RT-qPCR analysis. PROK1 and PROKR mRNAs were detected in both CCs and mGCs. The relative expression of PROK1 transcripts was significantly higher in mGCs compared to the CCs with no significant difference in PROKR1 and PROKR2 mRNA expression (Fig.3A, n=30, p=0.04, p=0.16, and p=0.61 respectively). Moreover, PROK1 protein content was significantly higher in mGCs compared to the CCs (Fig. 2B *on the left,* n=13, *** $p<0.001$). A time course secretion of PROK1 in primary CC and mGC cultures during 5 days of culture showed a significant increase in PROK1 secretion in both CC and mGC culture media over time (Fig. 2B *on the right,* n=5, * $p<0.05$). From day 2 to day 5 of culture, PROK1 levels increased 5 times in primary CC and 1.5 times in mGC culture media. Moreover, PROK1 secretion was significantly higher in primary mGC cultures as compared to CC cultures at day 2, day 3, and day 5 (* $p<0.05$, * $p<0.05$, and ** $p<0.01$ respectively). A representative Western Blot analysis showed that PROK1 receptors were detected in all follicular cell samples with a large inter-individual variability (Fig. 2C, n=11). Altogether, these data demonstrate that PROK1/PROKR system is highly expressed in human follicular cells.

FF and FCM PROK1 content in first conventional IVF and pregnancy rate
To determine the relationship between PROK1 and the embryo implantation potential, we determined the concentrations and levels of this growth factor in FF and FCM samples obtained from 34 patients receiving a first conventional IVF: no embryo implantation (group A, n=13), embryo implantation (group B, n=12), and no embryo transfer (group C, n=9). The patient characteristics are detailed in Table 1. PROK1 was detected in all FF and FCM samples. High intra and inter-individual variability were observed. The mean value of FF PROK1 concentration on the day of OR was 1.62±0.18 ng/ml, ranging from 93.3 pg/ml to 3.39 ng/ml (Supplemental Table 2). On the day of ODS, the mean PROK1 concentration in FCM was 109.85±13.18 pg/ml, ranging from 3.29 to 372.76 pg/ml (Supplemental Table 2). Overall, the fresh single-embryo transfer rate was 73.5% (25/34). Of the 25 patients with fresh transfers, 12 (48%) patients were clinically pregnant (Figure 1 and Table 1). No miscarriage or non-progressing biochemical pregnancy was observed in the present cohort. No significant difference was observed for women's age, women's BMI, duration of infertility, and serum Peak E2 between the three groups (Table 1). However, the number of collected oocytes, the number of embryos and good quality embryos ratio at day-2, as well as the distribution of the best embryo score in the cohort were significantly different in the three groups (Table 1, * $p<0.05$, *** $p<0.001$). FF and FCM PROK1 concentrations and levels were significantly different in the three groups (Table 1, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

FF and FCM PROK1 levels in relation to IVF-ET outcome
FF and FCM PROK1 levels were significantly predictive of subsequent implantation (Table 2). The

optimal threshold according to the ROC curve for FF PROK1 was 5.47 ng per follicle, with an overall accuracy of 84% (21/25), a high sensitivity for identifying successful pregnancy outcomes of 92% (11/12), a good specificity for identifying failed pregnancy outcomes of 77% (10/13), a good positive predictive value (79%, 11/14) and a high negative predictive value (91%, 10/11). In addition, the optimal threshold according to the ROC curve for FCM PROK1 was 29.05 pg per COC, with an overall accuracy of 88% (22/25), a high specificity (92%, 12/13), a good sensitivity (83%, 10/12), a high positive predictive value (91%, 10/11), and a good negative predictive value (86%, 12/14). The AUC_{ROC} curve evaluating the performance of FF and FCM PROK1 levels in predicting ongoing pregnancy reached 0.916 (0.813-1.000) and 0.878 (0.717-1.000), respectively; which is significantly greater than 0.5 (random chance prediction) ($p=7 \times 10^{-15}$ and p=0.0004, respectively) and indicates an excellent discriminatory power (Table 2 and Supplemental Figure 1). FF and FCM PROK1 levels remain similar irrespective of Day-2 embryo morphokinetic parameters (Figure 4, p= 0.71 and p=0.83, respectively).

Discussion

In the present study, we characterized the local expression of the PROK1/PROKR system in the human follicular microenvironment and investigated the potential of FF and FCM PROK1 measurement in routine IVF. Our results confirmed that FF contains high levels of PROK1 (22, 68), and demonstrated for the first time the detection and relevance of FCM PROK1 protein quantification in routine IVF. We demonstrated that PROK1 was highly expressed in human follicles, with major expression and secretion from the mGCs compared to the CCs, suggesting that FF PROK1 might mainly reflect the local secretion from mGCs, whereas CCs secretion could be the major source of FCM PROK1. The absence of PROK1 detection in sperm preparation and in denuded-oocytes culture medium is in agreement with this hypothesis (*data not shown*). The thirty-fold higher levels of PROK1 in FF (≈1.5 ng/ml) compared to those found in the serum (≈ 50 pg/ml (22, 78)) suggest that PROK1 may cross the blood-follicle barrier and therefore constitute one of the main source of circulating PROK1 in non-pregnant women. Up to now, PROK1 circulating and FF levels modulation during the human menstrual cycle are still unknown. Further studies with multiple time-points measurements are required to evaluate the relevance of circulating PROK1 quantification during IVF cycle.

To date, very limited data are available regarding PROK1/PROKR system expression during human folliculogenesis (10). In this report, we characterized the localization of PROK1/PROKR protein expression in follicles at different stages of development, and observed a dynamic profile during folliculogenesis with a strong staining in primordial/primary follicles as compared to antral follicles. These results should be interpreted with caution as all ovarian tissues were derived from cancer patients. However, our observations are in agreement with previous studies on PROK1 transcripts expression throughout folliculogenesis (95). This dynamic profile suggests differential hormonal regulation of PROK1 expression during follicle maturation. Moreover, its up-regulation by hCG in cultures of luteinized granulosa cells (95) and in the placenta (95) supports an increase of PROK1 expression and secretion in response to the physiological LH surge and to hCG injection during IVF cycles, suggesting that this factor could be a new actor in final oocyte maturation. Moreover, we observed a discrepancy of PROKR localization in antral follicles, suggesting some specificity of actions of PROK1 on CCs, mGCs, and theca cells via PROKR1 or PROKR2 through autocrine or paracrine mechanisms. Recently, a selectivity of effects was found in the heart (105) and the placenta for PROK1 receptors (95). While PROKR1 was preferentially involved in proliferation and angiogenic processes, PROKR2 was mainly implicated in cell permeability. Further studies are necessary to differentiate between the functions of both receptors in human folliculogenesis and to validate the role of PROK1 on oocyte competence acquisition and subsequent embryo implantation potential.

Non-invasive embryo quality assessment remains one of the major challenges encountered in *in vitro* fertilization. In this report, we demonstrated that FF and FCM PROK1 levels were significantly predictive of subsequent embryo implantation, supporting the hypothesis of a direct link between the ability of cumulus and granulosa cells to secrete PROK1 and the functional quality of the oocyte as reflected by its competence to become an embryo endowed with adequate implantation potential. The feasibility of the ELISA methodology to quantify FF and FCM PROK1 contents presents several advantages including time and cost saving, suggesting that PROK1 quantification could represent an additional non-invasive tool to predict IVF outcome. However, the importance of sample collection and processing in affecting the validity of the measurement of PROK1 in biological fluids is crucial. We found that dilution of samples is highly required for optimal quantification as well as sample storage, as aliquots of pooled FF must be used as inter-run calibrators. This could explain the lower FF PROK1 concentrations (≈800pg/ml (22, 68)) and the absence of association with IVF outcome (22) reported by the group of Zhang. In our study, we found similar results without any dilution of FF (722.1±306.2 pg/ml, *data not shown*). Therefore, appropriate processing of FF samples to measure PROK1 content is strongly required for clinical routine applications. Furthermore, PROK1 content assessment is easily applicable into IVF routine, as FF and FCM PROK1 quantification could be obtained within the five hours following sample collection.

More importantly, FF and FCM PROK1 levels remain similar irrespective of Day-2 embryo morphokinetic parameters. Although morphokinetic parameters of early embryo development are limited predictors of embryo quality (14), these results suggest that global FF and FCM PROK1 levels could represent additional criteria to determine the number of embryos to transfer. With the presence of top-quality embryos in the cohort, one could speculate that high FF and FCM PROK1 levels (i.e. > 5.47 ng/follicle and > 29.05 pg/COC, respectively) could comfort the single-embryo transfer strategy in order to minimize the risk of multiple pregnancies and their related morbidity and mortality. Conversely, low FF and FCM PROK1 levels may constitute additional criteria in favor of extended embryo culture and/or double-embryo transfer in order to improve IVF outcome. Furthermore, high FF and FCM PROK1 levels might encourage the transfer of embryos with intermediate morphokinetic parameters. Further studies are required to confirm the predictive value of FF and FCM PROK1 levels in embryo transfer decision.

Conclusion

Altogether, these results demonstrate that PROK1 is highly produced within the follicle with potential autocrine and/or paracrine functions within the follicular microenvironment. Furthermore, PROK1 measurement in global FF and FCM appears to be a new non-invasive biomarker of global oocyte competence and embryo implantation potential that could represent a quick routine test to predict and improve embryo transfer outcome in the future.

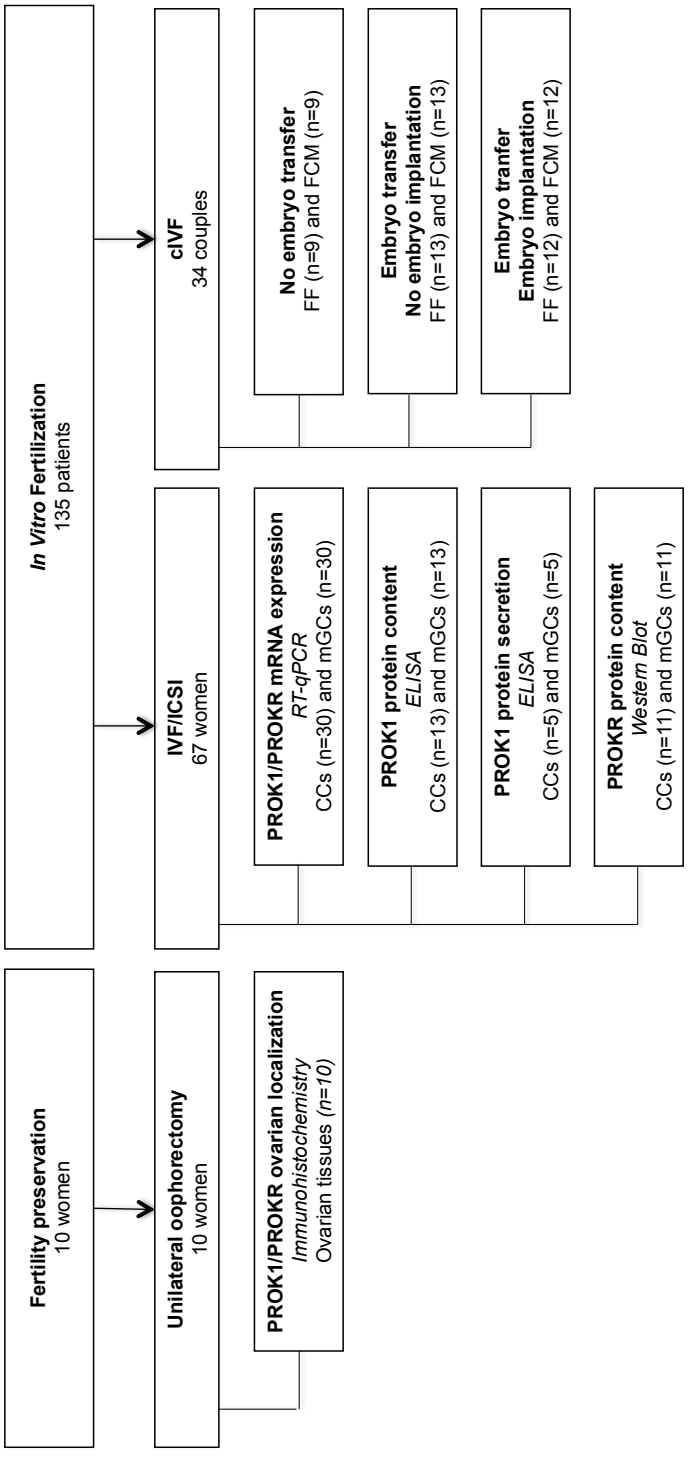


Figure 1: Flowchart of the study group and experiments. ICSI = IntraCytoplasmic Sperm Injection, cIVF = conventional *In Vitro* Fertilization, CCs = Cumulus Cells, mGCs = mural Granulosa Cells, FF = Follicular Fluid, FCM = Fertilization Culture Media.

Patient	Age (years)	Pathology	Biological or clinical signs of ovarian dysfunction	Type of unilateral oophorectomy	Number of cryopreserved fragments	Anatomical and Pathological Study of ovarian tissue
1	14	Hodgkin lymphoma	no	Total	46	normal
2	15	Hodgkin lymphoma	no	Total	46	normal
3	20	Hodgkin lymphoma	no	Total	18	normal
4	26	Breast cancer	no	Total	46	normal
5	28	Breast cancer	no	Total	46	normal
6	29	Hodgkin lymphoma	no	Partial	17	normal
7	29	Breast cancer	no	Total	46	normal
8	30	Breast cancer	no	Total	46	normal
9	30	Breast cancer	no	Partial	46	normal
10	30	Breast cancer	no	Partial	22	normal

Supplemental Table 1: Patient and ovarian cryopreservation characteristics.

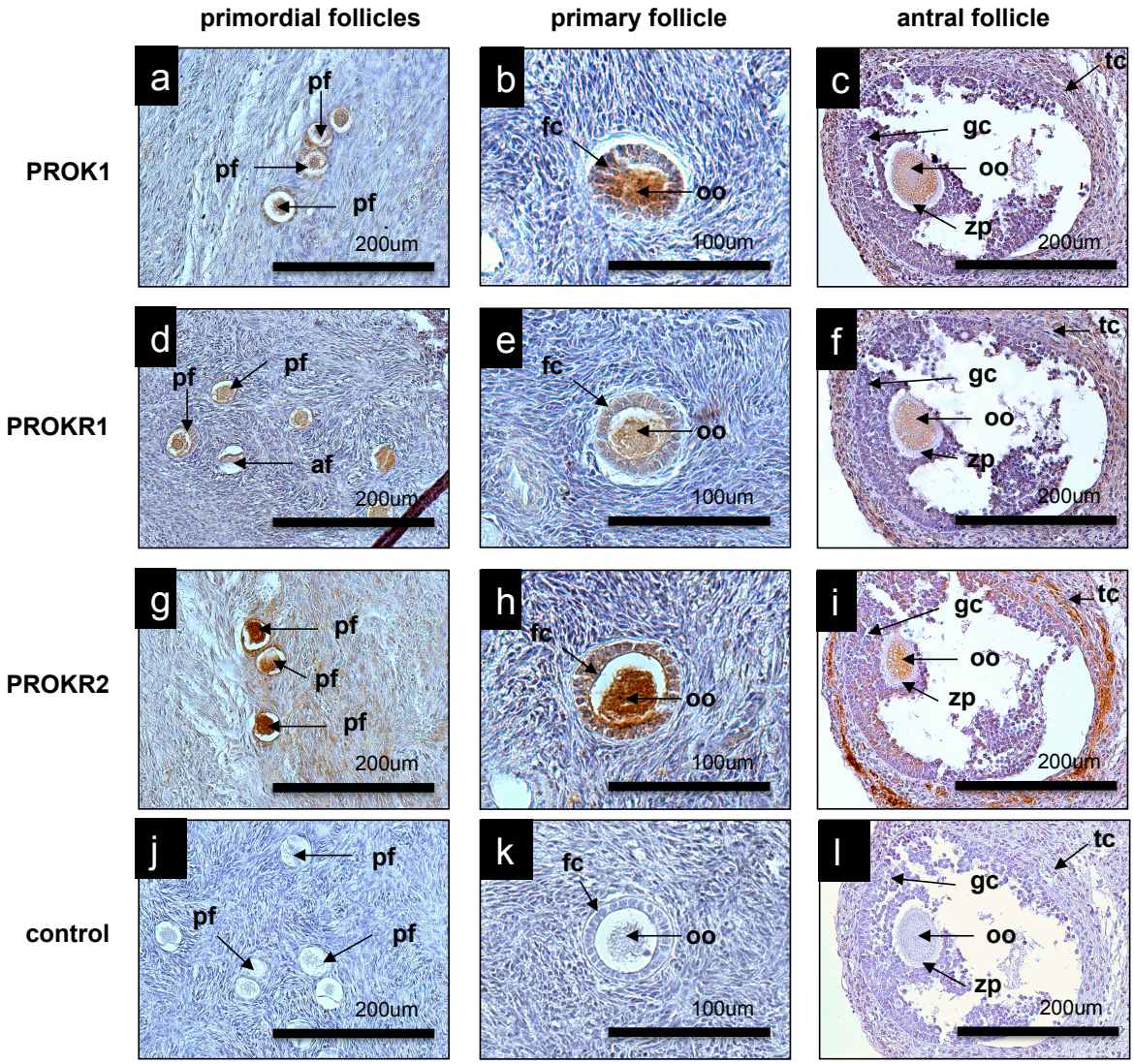


Figure 2: Localization of PROK1/PROKR in ovarian cortex (n=10). Immunohistochemical staining for PROK1 (a-c), PROKR1 (d-f) and PROKR2 (g-i) in ovarian cortex, showing expression (brown staining) of PROK1/PROKR system in primordial, primary, and antral follicles (original magnification x200, x400, and x200, respectively). All sections were counterstained with hematoxylin and eosin (H&E). Negative controls (j-l). pf = primordial follicle, af = atretic follicle, fc=follicular cells, oo = oocyte, zp = zona pellucida, gc = granulosa cells, and tc = theca cells.

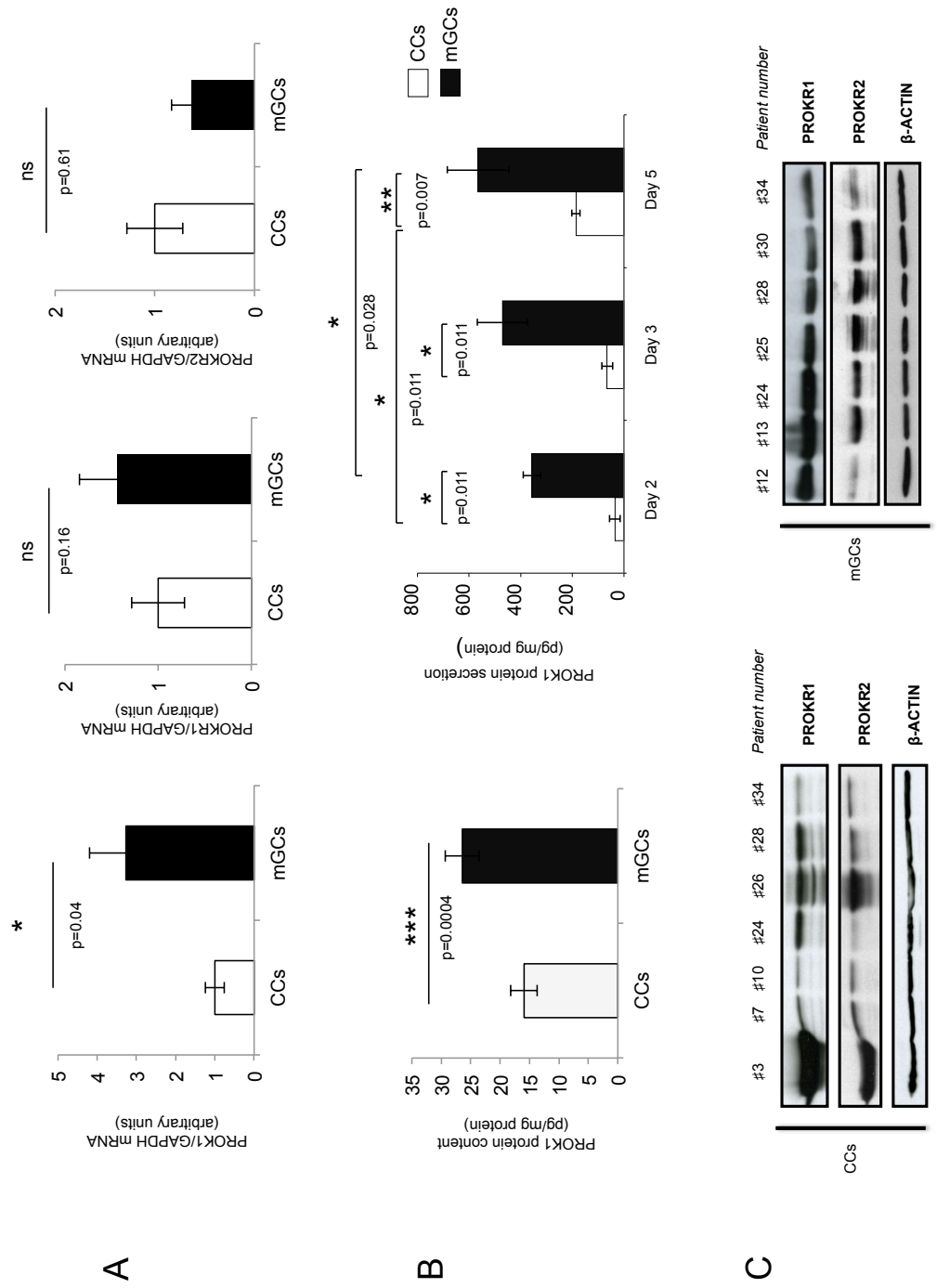


Figure 3: PROK1/PROKR system in human follicular cells. Results are reported as the mean ± standard error of the mean (SEM). Data were analysed with Mann–Whitney U-test (significant differences, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$). (A) Expression of PROK1/PROKR mRNA in isolated cumulus cells (CCs, n=30) and mural granulosa cells (mGCs, n=30). GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) was used as an internal control for mRNA loading. (B) PROK1 protein expression and secretion in human follicular cells. PROK1 protein content in isolated CCs (n=13) and mGCs (n=13) (on the left) and time course of PROK1 secretion by CCs (n=5) and mGCs (n=5) during 5 days of culture (on the right). (C) Representative Western Blot for PROKR1 and PROKR2 protein expression in homogenates of isolated CCs and mGCs (n=11). Actin (42 kDa) was used as an internal control for protein loading.

Characteristics	Group A No embryo implantation (n= 13)	Group B Embryo implantation (n=12)	Group C No embryo transfer (n=9)	Krukal-Wallis p value
Women's Age (years)	32.1 [29,35]	32.3 [31,33]	38.9 [31,40]	ns p = 0.13
Women's Body Mass Index (kg.m^{-2})	22.3 [21,27]	25.9 [22,27]	25.0 [20,26]	ns p = 0.43
Duration of infertility (years)	3.4 [3,4]	3.0 [2,5]	3.6 [3,5]	ns p = 0.73
Peak E2 (pg/ml)	1606 [788,2429]	1850 [912,3093]	1214 [955,1690]	ns p=0,47
Oocytes (number)	**8 [8,17]**	**7 [5,10]**	**4 [1,3]**	* **p = 0.014**
Day 2 embryos (number)	**5 [3,8]**	**4 [4,6]**	**2 [1,3]**	* **p = 0.021**
Day 2 embryos: oocytes ratio	0.75 [0,1]	0.66 [1,1]	0.62 [1,1]	ns p = 0.96
Day 2 good quality embryos ratio	0.54 [0,1]	0.55 [0,1]	0 [0,0]	*** p=0.0001
Best embryo score in the cohort	A: 84.6% (11/13) B: 7.7% (1/13) C: 7.7% (1/13) D: 0.0% (0/13)	A: 83.3% (10/12) B: 0.0% (0/12) C: 16.7% (2/12) D: 0.0% (0/12)	A: 0% (0/9) B: 0% (0/9) C: 55.6% (5/9) D: 44.4% (4/9)	*** p= 0.00001
FF PROK1 Concentration (ng/ml)	**0.95 [0.5,1.2]**	**2.8 [1.8,3.1]**	**1.4 [0.7,1.9]**	** **p=0.003**
FF PROK1 level (ng/follicle)	**5.6 [3.0,6.3]**	**18.8 [7.3,26.5]**	**10.9 [7.6,16.5]**	*** **p=0.0008**
FCM PROK1 Concentration (pg/ml)	**79.2 [43,982]**	**163.5 [117,189]**	**84.3 [337,131]**	* **p=0.045**
FCM PROK1 level (pg/COC)	**15.8 [12,27]**	**43.2 [31,50]**	**29.8 [15,46]**	* **p=0.014**

Table 1: Patient characteristics in the three post-defined groups of IVF outcome. Values are given as median [interquartile range]. Data were analysed with Kruskal–Wallis test (significant differences, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$). COC = Cumulus-Oocyte Complex.

FF PROK1 levels per follicle		FCM PROK1 levels per COC	
Overall accuracy	**84% (21/25)**	**Overall accuracy**	**88% (22/25)**
Sensitivity	92% (11/12)	Sensitivity	83% (10/12)
Specificity	77% (10/13)	Specificity	92% (12/13)
Positive Predictive Value	79% (11/14)	Positive Predictive Value	91% (10/11)
Negative predictive Value	91% (10/11)	Negative predictive Value	86% (12/14)
Odds ratio for successful outcome (95% CI)	36.7 (3.3-412.3)	Odds ratio for successful outcome (95% CI)	27.5 (3.2-233.5)
P value	0.001	P value	0.001
AUC ±SE	**0.916 ±0.053**	**AUC ±SE**	**0.878±0.082**
95% CI	0.813-1.000	95% CI	0.717-1.000
Prob. (AUC =0.5)	7×10^{-15}	Prob. (AUC =0,5)	0.0004
Cut-off value	> 5.47 ng	Cut-off value	> 29.05 pg

Table 2: Specific predictive accuracies and predictive power of global FF and FCM PROK1 levels. Expression of PROK1 was determined in 25 global FF and FCM samples of IVF-ET attempts. The overall accuracy was defined as true positive + true negative/total population. Sensitivity was defined as true positive/condition positive and specificity was defined as true negative/condition negative. Positive predictive value was defined as the proportion of embryo transfer predicted as successful that implanted (true positive/(true positive + false positive)), and negative predictive value was defined as the proportion of embryo transfer predicted as unsuccessful that failed to implant (true negative/(false negative + true negative)). Cut-off value was defined as the optimal threshold, which minimizes misclassification of prediction (Youdon index). AUC = area under the receiver operating characteristic curve; SE= standard error; CI = confidence interval. Prob. (AUC =0.5) = degree of predictive ability (p value) significantly greater than 0.5 (random chance prediction). COC = Cumulus-Oocyte Complex.

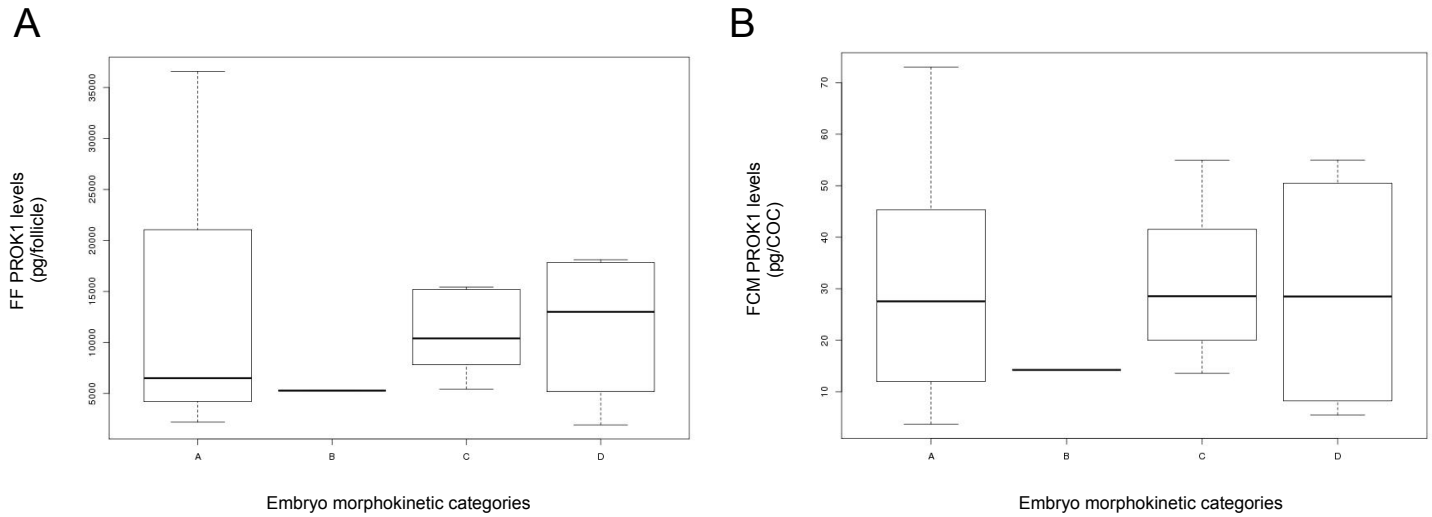


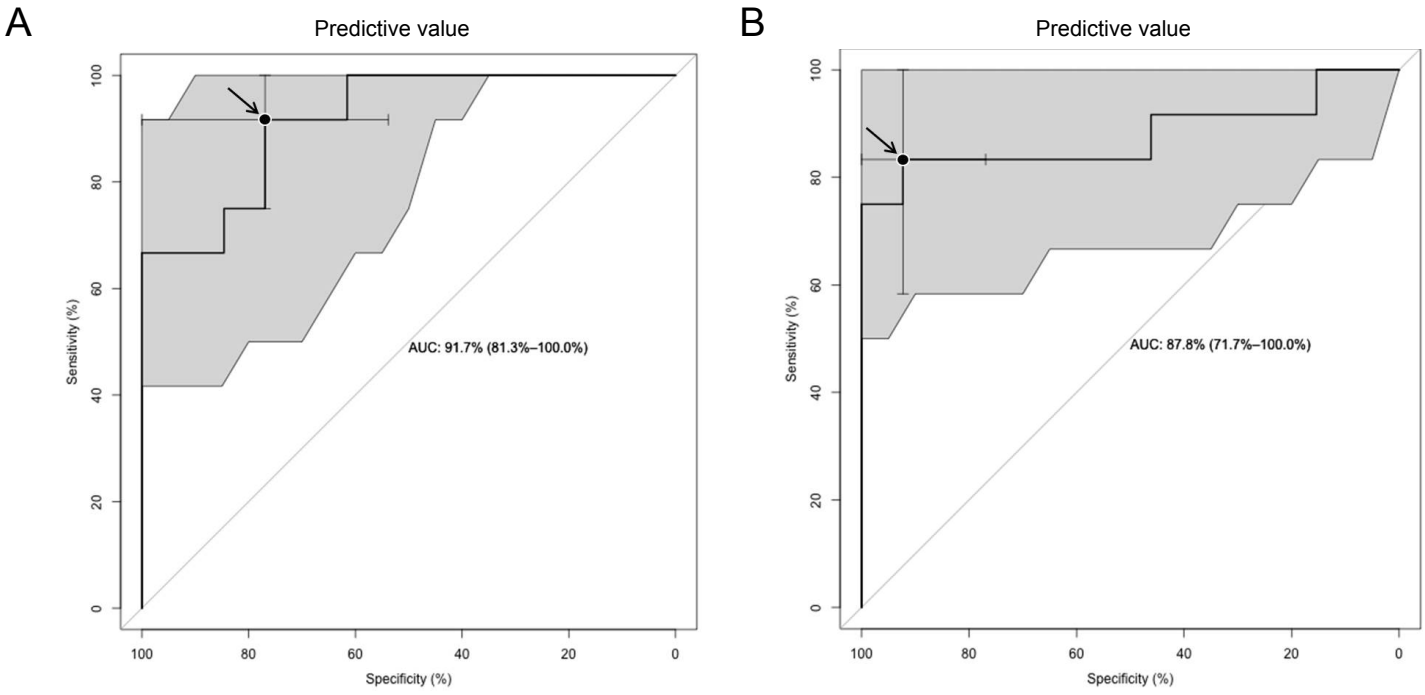
Figure 4: Boxplot of FF (A) and FCM (B) PROK1 levels distribution in accordance to the best embryo score of the cohort in the three post-defined groups of IVF outcome (n=34). Embryo morphokinetic categories: A =Excellent (n=21), B=Intermediate (n=1), C=Poor (n=8) and D=Discared (n=4). The box shows the 25th and 75th percentile of the data, the whiskers are the most extreme points not considered outliers. Data were analysed with Kruskal–Wallis test (ns, p=0.71 and p=0.83, respectively). COC = Cumulus-Oocyte Complex.

Characteristics	All IVF patients 67 women	First conventional IVF patients 34 couples
Women's Age (years)	33.80 ± 0.47	33.39 ± 0.91
Women's Body Mass Index ($kg.m^{-2}$)	24.09 ± 0.46	24.66 ± 0.92
Duration of infertility (years)	4.68 ± 0.26	4.14 ± 0.61
Peak E2 (pg/ml)	1560 ± 72.2	1618 ± 191
Oocytes (number)	9.56 ± 0.49	7.93 ± 1.12
Day 2 embryos (number)	5.34 ± 0.51	4.93 ± 0.82
Day 2 embryos: oocytes ratio	0.57 ± 0.04	0.66 ± 0.05
FF PROK1 Concentration (ng/ml)	1.52 ± 0.10	1.62 ± 0.18
FF PROK1 level (ng/follicle)	13.81 ± 1.66	11.71 ± 1.58
FCM PROK1 Concentration (pg/ml)	-	109.85 ± 13.18
FCM PROK1 level (pg/COC)	-	28.31 ± 3.20

Supplemental Table 2: *IVF* patient characteristics (mean± SEM).

	Excellent = A	Intermediate = B	Poor = C	Discarded = D
Day 2	4 cells	4-6 cells	All others not discared	< 2 cells
	Blastomeres of uniform size	Blastomeres of varying size		Absence of cleaveage within 24h
	< 20% of fragmentation	<50% of fragmentation		> 2PN or > 2 nuclei per blastomere
	No multinucleation	No multinucleation		> 50% of fragmentation

Supplemental Table 3: Definition of the embryo score used at the University Hospital of Grenoble. PN = pronuclei.



Supplemental Figure 1: Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was used to evaluate the diagnostic utility of the predictive power of identifying a successful pregnancy outcome based on FF PROK1 levels (A) and FCM PROK1 levels (B). The open circle (arrow) on the curve is the Youdon index, or optimal threshold, which minimizes misclassification of prediction.

References

1. Gnoth C, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Friol K, Tigges J, Freundl G. Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum Reprod.* 2005;20(5):1144-1147.
2. Ferraretti AP, Goossens V, Kupka M, Bhattacharya S, de Mouzon J, Castilla JA, Erb K, Korsak V, Nyboe Andersen A, European IVFMCftESoHR, Embryology. Assisted reproductive technology in Europe, 2009: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod.* 2013;28(9):2318-2331.
3. Koot YE, Macklon NS. Embryo implantation: biology, evaluation, and enhancement. *Current opinion in obstetrics & gynecology.* 2013;25(4):274-279.
4. Hammadeh ME, Ertan AK, Zeppezauer M, Baltes S, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W. Immunoglobulins and cytokines level in follicular fluid in relation to etiology of infertility and their relevance to IVF outcome. *Am J Reprod Immunol.* 2002;47(2):82-90.
5. Ledee N, Petitbarat M, Rahmati M, Dubanchet S, Chaouat G, Sandra O, Perrier-d'Hauterive S, Munaut C, Foidart JM. New pre-conception immune biomarkers for clinical practice: interleukin-18, interleukin-15 and TWEAK on the endometrial side, G-CSF on the follicular side. *J Reprod Immunol.* 2011;88(2):118-123.
6. Vercammen M, Verloes A, Haentjens P, Van de Velde H. Can soluble human leucocyte antigen-G predict successful pregnancy in assisted reproductive technology? *Current opinion in obstetrics & gynecology.* 2009;21(3):285-290.
7. Hammadeh ME, Fischer-Hammadeh C, Amer AS, Rosenbaum P, Schmidt W. Relationship between cytokine concentration in serum and preovulatory follicular fluid and in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection outcome. *Chemical immunology and allergy.* 2005;88:80-97.
8. LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, Frantz G, Rangell L, DeGuzman L, Keller GA, Peale F, Gurney A, Hillan KJ, Ferrara N. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature.* 2001;412(6850):877-884.
9. Brouillet S, Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N. EG-VEGF: a key endocrine factor in placental development. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(10):501-508.
10. Maldonado-Perez D, Evans J, Denison F, Millar RP, Jabbour HN. Potential roles of the prokineticins in reproduction. *Trends Endocrinol Metab.* 2007;18(2):66-72.
11. Brouillet S, Hoffmann P, Alfaidy N, Feige JJ. [Prokineticins: new regulatory peptides in human reproduction]. *Med Sci (Paris).* 2014;30(3):274-279.
12. Kisliouk T, Levy N, Hurwitz A, Meidan R. Presence and regulation of endocrine gland vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in ovarian cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(8):3700-3707.
13. Battersby S, Critchley HO, Morgan K, Millar RP, Jabbour HN. Expression and regulation of the prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bv8) and their receptors in the human endometrium across the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(5):2463-2469.
14. Ngan ES, Lee KY, Yeung WS, Ngan HY, Ng EH, Ho PC. Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor is expressed in human peri-implantation endometrium, but not in endometrial carcinoma. *Endocrinology.* 2006;147(1):88-95.
15. Evans J, Catalano RD, Morgan K, Critchley HO, Millar RP, Jabbour HN. Prokineticin 1 signaling and gene regulation in early human pregnancy. *Endocrinology.* 2008;149(6):2877-2887.

16. Evans J, Catalano RD, Brown P, Sherwin R, Critchley HO, Fazleabas AT, Jabbour HN. Prokineticin 1 mediates fetal-maternal dialogue regulating endometrial leukemia inhibitory factor. *FASEB J.* 2009;23(7):2165-2175.
17. Haouzi D, Mahmoud K, Fourar M, Bendhaou K, Dechaud H, De Vos J, Reme T, Dewailly D, Hamamah S. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Hum Reprod.* 2009;24(1):198-205.
18. Macdonald LJ, Sales KJ, Grant V, Brown P, Jabbour HN, Catalano RD. Prokineticin 1 induces Dickkopf 1 expression and regulates cell proliferation and decidualization in the human endometrium. *Mol Hum Reprod.* 2011;17(10):626-636.
19. Brouillet S, Hoffmann P, Benharouga M, Salomon A, Schaal JP, Feige JJ, Alfaidy N. Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Mol Biol Cell.* 2010;21(16):2832-2843.
20. Brouillet S, Murthi P, Hoffmann P, Salomon A, Sergent F, De Mazancourt P, Dakouane-Giudicelli M, Dieudonne MN, Rozenberg P, Vaiman D, Barbaux S, Benharouga M, Feige JJ, Alfaidy N. EG-VEGF controls placental growth and survival in normal and pathological pregnancies: case of fetal growth restriction (FGR). *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(3):511-525.
21. Hoffmann P, Saoudi Y, Benharouga M, Graham CH, Schaal JP, Mazouni C, Feige JJ, Alfaidy N. Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications. *J Cell Mol Med.* 2009;13(8B):2224-2235.
22. Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N. Expression and oxygen regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in human placenta during early pregnancy. *Endocrinology.* 2006;147(4):1675-1684.
23. Gao MZ, Zhao XM, Lin Y, Sun ZG, Zhang HQ. Effects of EG-VEGF, VEGF and TGF-beta1 on pregnancy outcome in patients undergoing IVF-ET treatment. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29(10):1091-1096.
24. Ferrara N, Frantz G, LeCouter J, Dillard-Telm L, Pham T, Draksharapu A, Giordano T, Peale F. Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. *Am J Pathol.* 2003;162(6):1881-1893.
25. Fraser HM, Bell J, Wilson H, Taylor PD, Morgan K, Anderson RA, Duncan WC. Localization and quantification of cyclic changes in the expression of endocrine gland vascular endothelial growth factor in the human corpus luteum. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(1):427-434.
26. Gao MZ, Zhao XM, Sun ZG, Hong Y, Zhao LW, Zhang HQ. Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor concentrations in follicular fluid and serum may predict ovarian hyperstimulation syndrome in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril.* 2011;95(2):673-678.
27. Shaw JL, Denison FC, Evans J, Durno K, Williams AR, Entrican G, Critchley HO, Jabbour HN, Horne AW. Evidence of prokineticin dysregulation in fallopian tube from women with ectopic pregnancy. *Fertil Steril.* 2010;94(5):1601-1608 e1601.
28. Shaw JL, Oliver E, Lee KF, Entrican G, Jabbour HN, Critchley HO, Horne AW. Cotinine exposure increases Fallopian tube PROKR1 expression via nicotinic AChRalpha-7: a potential mechanism explaining the link between smoking and tubal ectopic pregnancy. *Am J Pathol.* 2010;177(5):2509-2515.
29. Shaw JL, Wills GS, Lee KF, Horner PJ, McClure MO, Abrahams VM, Wheelhouse N, Jabbour HN, Critchley HO, Entrican G, Horne AW. Chlamydia trachomatis infection increases fallopian tube PROKR2 via TLR2 and NFkappaB activation resulting in a

microenvironment predisposed to ectopic pregnancy. *Am J Pathol.* 2011;178(1):253-260.

30. Holloway AC, Salomon A, Soares MJ, Garnier V, Raha S, Sergent F, Nicholson CJ, Feige JJ, Benharouga M, Alfaidy N. Characterization of the adverse effects of nicotine on placental development: In vivo and in vitro studies. *American journal of physiology.* 2013.
31. Su MT, Lin SH, Lee IW, Chen YC, Hsu CC, Pan HA, Kuo PL. Polymorphisms of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor gene and its receptor genes are associated with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod.* 2010;25(11):2923-2930.
32. Salker M, Teklenburg G, Molokhia M, Lavery S, Trew G, Aojanepong T, Mardon HJ, Lokugamage AU, Rai R, Landles C, Roelen BA, Quenby S, Kuijk EW, Kavelaars A, Heijnen CJ, Regan L, Macklon NS, Brosens JJ. Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. *PLoS One.* 2010;5(4):e10287.
33. Salmassi A, Schmutzler AG, Huang L, Hedderich J, Jonat W, Mettler L. Detection of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in human follicular luteinized granulosa cells. *Fertil Steril.* 2004;81 Suppl 1:786-791.
34. Machelon V, Nome F, Durand-Gasselin I, Emilie D. Macrophage and granulosa interleukin-1 beta mRNA in human ovulatory follicles. *Hum Reprod.* 1995;10(8):2198-2203.
35. Brouillet S, Hoffmann P, Chauvet S, Salomon A, Chamboredon S, Sergent F, Benharouga M, Feige JJ, Alfaidy N. Revisiting the role of hCG: new regulation of the angiogenic factor EG-VEGF and its receptors. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(9):1537-1550.
36. Nebigil CG. Prokineticin receptors in cardiovascular function: foe or friend? *Trends Cardiovasc Med.* 2009;19(2):55-60.
37. Guerif F, Le Gouge A, Giraudeau B, Poindron J, Bidault R, Gasnier O, Royere D. Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: a prospective study based on 4042 embryos. *Hum Reprod.* 2007;22(7):1973-1981.

5. Résultats principaux

▪ Expression de PROK1 et de ses récepteurs dans l'ovaire humain

A ce jour, peu de données sont rapportées sur l'expression du système PROK1/PROKRs dans l'ovaire humain. En 2001, l'équipe de Ferrara rapportait pour la première fois l'expression des transcrits de *PROK1* dans les glandes endocrines humaines, avec une expression majoritaire au niveau de l'ovaire (59). Cette équipe mettait également en évidence la détection des ARNm de *PROK1* au niveau des cellules folliculaires du stade primordial à antral (CC, mGC, et cellules de la thèque), ainsi qu'au niveau de cellules stromales périvasculaires (59, 67). En 2012, l'équipe de Raica rapportait la localisation ovarienne de la protéine PROK1 au niveau de l'épithélium de surface (69). Nos résultats complètent le profil d'expression du système PROK1/PROKR dans le tissu ovarien humain par la mise en évidence de son expression au sein de l'ovocyte, et confirment la localisation de ce système dans les cellules folliculaires humaines au niveau protéique.

▪ Expression de PROK1 et de ses récepteurs dans les cellules folliculaires issues de FIV

En 2005, le groupe de Duncan rapportait la détection des transcrits de *PROK1* dans les mGCs issues de tentatives de FIV, et leur augmentation au cours de la phase lutéale (66). Nos résultats complètent ces premières données de la littérature par la mise en évidence de la détection des ARNm et des protéines de PROK1, PROKR1, et PROKR2 au sein des CC et mGCs issues de FIV-ICSI. Nous avons observé une détection faible[10] des transcrits du système PROK1/PROKR dans ces deux types cellulaires. Ceci diminue la fiabilité de la quantification des transcrits en RT-qPCR, et fragilise l'intérêt d'une utilisation en routine hospitalière. En revanche, les niveaux élevés de détection des protéines PROK1, PROKR1 et PROKR2, couplés à la facilité d'exécution et le faible coût de leur méthode de détection, engagent à tester l'utilité de leur dosage en clinique.

▪ Sécrétion de PROK1 par les cellules folliculaires issues de FIV en culture primaire

La détection de PROK1 dans le liquide folliculaire (LF) suggérait une possible sécrétion par les CCs et les mGCs (22, 68). Nos résultats montrent une sécrétion importante de PROK1 par

[10] Détection d'une dizaine à quelques centaines de copies pour *PROK1, PROKR1* et *PROKR2* suite à l'extraction des ARNm de CCs et mGCs provenant d'une dizaine de follicules ovariens en moyenne *(données non montrées).*

ces deux types cellulaires, avec une sécrétion significativement plus élevée par les mGCs. La sécrétion de PROK1 par les cellules folliculaires en cultures primaires suggère leur participation en tant que nouvelle source de sécrétion de PROK1 *in vivo*.

- **Quantification de PROK1 dans le LF issu de FIV**

En 2011, le groupe de Zhang rapportait une concentration moyenne de PROK1 de 800 pg/ml dans le LF de patientes prises en charge en FIV (22). Nos données ont confirmé la forte sécrétion de PROK1 dans le LF, mais ont mis en évidence la nécessité de diluer les échantillons de LF d'un facteur 5 afin de rester dans la partie linéaire de la gamme. Sans dilution, nous trouvons une concentration folliculaire de PROK1 de 722,1 ± 306,2 pg/ml *(données non montrées)*, comparable à celle rapportée par le groupe de Zhang (22). Néanmoins, l'absorbance d'un échantillon sur trois avoisine alors le dernier point de gamme, et l'absorbance d'un échantillon sur dix se retrouve hors gamme. La dilution d'un facteur 5 des échantillons de LF permet d'obtenir l'ensemble des absorbances dans la gamme, et met en évidence une concentration moyenne nettement plus élevée avec 1,62 ± 0,18 ng/ml. La concentration de PROK1 étant basse dans le sérum (aux alentours de 50 pg/ml chez la femme en âge de procréer et non enceinte), la contamination du LF par du sang au moment de la ponction[11] doit conduire à l'exclusion du prélèvement, sous peine de voir le taux de PROK1 faussement abaissé.

- **Quantification de PROK1 dans les plots de fécondation**

Nos résultats démontrent pour la première fois la détection de PROK1 dans les plots de fécondation de FIVc à une concentration moyenne de 109,9 ± 13,2 pg/ml, ce qui soulève la question de l'origine de cette production. Des expériences préliminaires suggèrent la participation majeure des cellules du cumulus dans les taux de PROK1 détectés dans les plots de fécondation. En effet, aucune détection de PROK1 n'a pu être mise en évidence dans le milieu de culture (ISM1 culture medium, REF 10500060A, Origio), les surnageants d'ovocytes dénudés ou les extraits de capacitats spermatiques *(données non montrées),* ce qui rend leur participation peu probable.

[11] Suggérée par une couleur rouge et la présence d'un culot important d'hématies suite à la centrifugation du prélèvement.

- **PROK1, biomarqueur de l'issue de tentative de FIV ?**

A ce jour, nos résultats semblent en faveur d'un intérêt pronostique du dosage de PROK1 dans le LF global et les plots de fécondation globaux pour l'évaluation des chances de grossesse en FIV. En effet, un taux de PROK1 supérieur à 5,47 ng/follicule dans le LF global et supérieur à 29,05 pg/CCO dans les plots de fécondation globaux semblent être associés à une augmentation significative de la survenue d'une implantation embryonnaire suite au transfert d'un embryon choisi selon des critères morphocinétiques en FIVc. Ainsi, ces résultats permettent d'envisager l'utilisation potentielle du dosage de PROK1 comme argument décisionnel supplémentaire aux scores morphocinétiques en routine hospitalière, ces deux critères semblant être indépendants. Ces premiers résultats doivent être confirmés par une étude prospective multicentrique.

Discussion

Le système PROKs/PROKRs tient une place grandissante dans la fonction reproductive masculine et féminine. Peu d'équipes travaillent sur PROK1 dans la procréation, ce qui explique le peu de données rapportées à ce jour sur l'expression et les rôles de ce facteur dans la physiologie ovarienne. Dans le but d'approfondir les connaissances sur le système PROK1/PROKR dans la fertilité féminine, j'ai caractérisé le niveau d'expression de PROK1 et de ses récepteurs dans le microenvironnement folliculaire humain, et évalué le potentiel de PROK1 en tant que nouveau biomarqueur pronostique de l'implantation embryonnaire en FIVc.

Nos résultats démontrent l'expression du système PROK1/PROKR dans le follicule ovarien humain du stade primordial à antral, ainsi que sa détection dans les échantillons biologiques issus de la ponction ovarienne (LF, CCs et mGCs). La détection de PROK1 dans le LF soulève des interrogations quant à la source de production de ce facteur. Le niveau d'expression élevée de PROK1 dans les cellules folliculaires, et la forte libération de ce facteur dans le milieu des cultures primaires de CCs et mGCs, suggèrent l'implication de ces cellules comme source majeure de PROK1 dans les follicules ovariens chez la femme. De plus, le taux de sécrétion significativement plus élevé de PROK1 par les mGCs est en faveur d'une participation majeure de ces cellules dans la sécrétion folliculaire de PROK1 lors des étapes tardives de maturation folliculaire, les mGCs étant de surcroit surreprésentées dans le follicule ovarien par rapport aux cellules du cumulus.

La présence du système PROK1/PROKR dans les follicules en développement suggère son rôle dans les étapes de maturation folliculaire (initiation/recrutement, croissance basale, sélection, dominance et/ou ovulation). Si tel est le cas, les variations intra et interindividuelles mises en évidence dans l'expression de PROK1 et de ses récepteurs pourraient avoir des conséquences significatives sur l'acquisition de la compétence ovocytaire, et ainsi sur les chances de grossesse. Une littérature grandissante confère aux récepteurs de PROK1 des rôles distincts dans la physiologie cellulaire, avec des implications dans la prolifération, la migration, le bourgeonnement, et la différenciation cellulaire pour PROKR1, alors que PROKR2 serait associé à la perméabilité et à la fenestration cellulaire (106-108). Ainsi, on peut supposer que PROK1 participe conjointement avec d'autres facteurs aux mécanismes mis en jeu dans la maturation du follicule pré-ovulatoire, permettant la

rupture de la paroi du follicule et l'expulsion du complexe cumulo-ovocytaire hors de l'ovaire. Des expériences sont en cours afin d'évaluer l'impact du système PROK1/PROKRs dans le développement folliculaire, et nous permettre de mieux appréhender la complexité du dialogue follicule/ovocyte pour laquelle de nombreuses régulations encore inconnues restent à établir.

La validation de nouveaux biomarqueurs de l'implantation embryonnaire en FIV est un enjeu majeur du Biologiste de la Reproduction afin d'élaborer la meilleure stratégie de transfert embryonnaire pour chaque couple, et ainsi favoriser l'obtention d'une grossesse unique évolutive. Nos résultats ont démontré l'augmentation des taux de PROK1 dans le liquide folliculaire global et les plots de fécondations globaux des tentatives de FIVc associées à une implantation suite au transfert embryonnaire, ouvrant ainsi des perspectives sur l'utilisation de PROK1 comme biomarqueur pronostique de l'issue de la tentative en FIV. La méthodologie utilisée présente trois avantages majeurs : aucun geste supplémentaire n'est réalisé sur la patiente ou l'embryon, la technique est facile et peu onéreuse[12], et le délai de rendu de résultat[13] est compatible avec le choix d'une stratégie de transfert embryonnaire à J2. Ainsi, des taux folliculaires élevés en PROK1 pourraient être en faveur du transfert d'un seul top-embryon[14] dans la cavité utérine. En revanche, des taux folliculaires bas en PROK1 constitueraient un argument supplémentaire pour le transfert de deux top-embryons, en l'absence de contre-indication à la grossesse multiple. A ce jour, une seule publication suggère l'intérêt du dosage de PROK1 comme critère pronostique de l'issue des transferts embryonnaires en FIV (22). Dans cette publication, les auteurs rapportent l'augmentation significative de la concentration sérique de PROK1 le jour du transfert embryonnaire chez les patientes dont le transfert embryonnaire s'est concrétisé par une implantation, ainsi qu'une corrélation positive entre la concentration sérique de PROK1 le jour du transfert embryonnaire et la qualité globale[15] de la cohorte embryonnaire. En revanche, les auteurs ne trouvent aucune différence significative dans la concentration folliculaire de PROK1 le jour de la ponction en fonction de l'issue du transfert embryonnaire. Le manque de rigueur dans la méthodologie utilisée par ce groupe fragilise, à mon sens, les conclusions des auteurs. En effet, outre la problématique du

[12] Moins d'un euros par échantillon dosé en triplicat pour le consommable.
[13] Obtention du résultat en cinq heures après le dépôt de l'échantillon, ce qui correspond à un résultat à J0 pour le liquide folliculaire et J1 pour les plots de fécondation.
[14] Choisi selon les critères morphocinétiques actuels.
[15] La qualité embryonnaire était évaluée à l'aide des critères morphocinétiques.

dosage de PROK116, les critères de la population étudiée dans cette publication font craindre la présence de facteurs confondants. En effet, dans une première publication de leur groupe en 2011, les auteurs faisaient état d'une corrélation négative entre la concentration sérique et folliculaire de PROK1 et les taux sériques d'E2 (68). Or, malgré la mise en évidence de taux sériques d'E2 significativement augmentés dans leur groupe de patientes non enceintes suite au transfert embryonnaire, les auteurs ne procèdent à aucune analyse multivariée pour déterminer l'impact de cette hétérogénéité sur les taux folliculaires de PROK1 et les taux d'implantation embryonnaire. De plus, plusieurs publications suggèrent des variations dans l'expression du système PROK1/PROKR chez les patientes fumeuses (98, 100), souffrant du syndrome des ovaires polykystiques (67) et d'hyperstimulation ovarienne (68), ainsi que chez les patientes sujettes aux pathologies de l'implantation comme les fausses-couches à répétition (82, 101) et les grossesses ectopiques (97, 99). Aucun élément de l'article ne permet de s'assurer de la prise en compte de l'influence de ces pathologies dans leurs résultats. Ainsi, à mon sens, la publication du groupe de Zhang ne remet pas en question nos propres conclusions.

A ce jour, nos premiers résultats semblent être en faveur d'un rôle pro-implantatoire de PROK1 dans le succès de la tentative de FIV. Nous proposons deux hypothèses pour tenter d'expliquer le lien entre les taux élevés de PROK1 dans le microenvironnement folliculaire et l'augmentation des taux de grossesse suite au transfert embryonnaire. La première est en faveur d'un rôle direct de PROK1 sur la maturation folliculaire et la compétence ovocytaire. Ainsi, des taux folliculaires élevés en PROK1 favoriseraient la croissance et la maturation des complexes cumulo-ovocytaires au sein des follicules, augmentant ainsi la compétence de l'ovocyte à la fécondation, puis au développement et à l'implantation de l'embryon dans la cavité utérine. Une étude prospective de cohorte est en cours au laboratoire pour tester cette première hypothèse (voir partie Perspectives). Notre deuxième hypothèse est en faveur d'un effet indirect des taux folliculaires de PROK1 sur la réceptivité endométriale. En effet, plusieurs études ont démontré le rôle de PROK1 dans l'induction de l'angiogenèse endométriale, et l'augmentation de plusieurs facteurs de croissance et gènes pro-implantatoires (73-76). Ainsi, on pourrait supposer que les taux folliculaires élevés en PROK1 soient en faveur d'une imprégnation du tractus féminin par ce facteur, ce qui conduirait à l'augmentation de la réceptivité endométriale, puis des taux de grossesse. On pourrait également supposer que les embryons issus des follicules présentant des taux élevés en

[16] Aucune dilution des échantillons de LF n'est rapportée dans la publication.

PROK1 soient eux-mêmes associés à une sécrétion embryonnaire importante de PROK1, ce qui augmenterait localement la réceptivité endométriale lors de leur apposition sur les cellules épithéliales endométriales, favorisant ainsi l'adhésion puis l'invasion de l'embryon dans l'endomètre maternel. A ce jour, l'absence de fausse-couches dans notre population étudiée, associée à l'absence de détection de PROK1 dans le surnageant des zygotes, des embryons clivés, et des blastocystes en culture seraient plutôt en faveur de notre première hypothèse. Néanmoins, des expériences préliminaires suggèrent la sécrétion de PROK1 par le trophectoderme *(données non montrées)*. Nous sommes actuellement en contact avec une entreprise privée afin d'évaluer la faisabilité de développement d'un Test ELISA plus sensible, nous permettant d'établir les cinétiques de sécrétion de PROK1 par l'embryon au cours de son développement. Des expériences sont en cours afin d'évaluer la participation de ces deux hypothèses dans l'augmentation des taux de grossesse chez les patientes présentant des taux folliculaires élevés en PROK1, et ainsi nous permettre de mieux appréhender la complexité du dialogue entre l'embryon et l'endomètre.

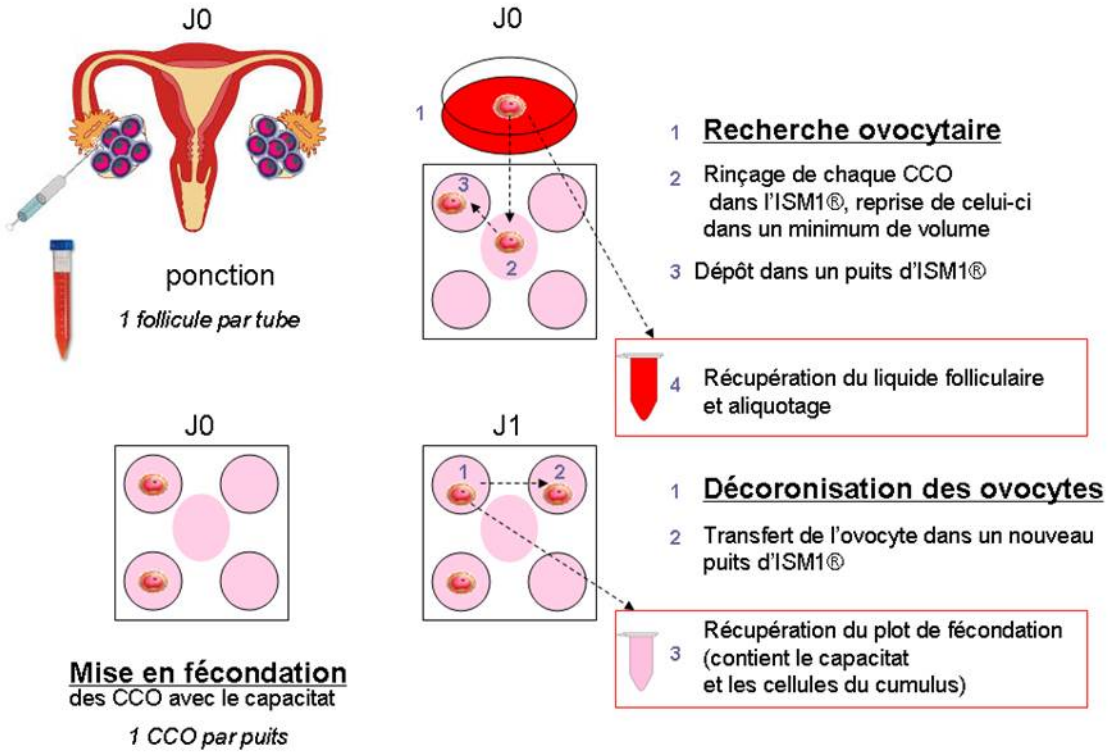


Figure 25 : Méthodologie de l'étude prospective de cohorte en cours au laboratoire.

Perspectives

1. PROK1, biomarqueur du potentiel implantatoire embryonnaire en FIVc ?

L'extension de la politique de transfert d'embryon unique, seul rempart contre la mortalité et morbidité associées aux grossesses gémellaires, impose la validation de nouveaux critères pronostiques dans le choix des embryons à haut potentiel implantatoire à transférer en FIV (7). Nos premiers résultats engagent à étudier le rôle de PROK1 dans l'acquisition de la compétence ovocytaire humaine, aptitude indispensable au développement et à l'implantation ultérieure de l'embryon dans la cavité utérine. Une étude prospective de cohorte[17] a débuté en Novembre 2014 au laboratoire d'Aide à la Procréation-CECOS pour une durée de deux ans, afin d'évaluer l'intérêt du dosage folliculaire de PROK1 dans l'identification des ovocytes compétents à se développer en embryons de haut potentiel implantatoire. Pour cela, la méthodologie clinico-biologique en vigueur dans notre centre a été modifiée afin de pouvoir attribuer à chaque échantillon biologique son ovocyte et embryon correspondant : la ponction ovarienne est réalisée à raison d'un follicule par tube et la mise en fécondation à raison d'un CCO par plot (figure 25). Les critères d'inclusion et d'exclusion sont les mêmes que ceux utilisés dans notre première étude. Les échantillons sont conservés et gérés dans le cadre du CRB GERMETHEQUE, qui dispose des autorisations de collection et cession (autorisation n°AC-2009-886). Nos premiers résultats ont montré une hausse significative de la sécrétion de PROK1 dans le liquide des follicules au cours de leur croissance, et suggèrent une augmentation de sa concentration folliculaire avec l'acquisition de la compétence ovocytaire à la fécondation ($n=35$, $p<0,05$) et au développement ($n=25$, $p<0,01$). Ces premières données sont donc en faveur d'un rôle de PROK1 dans la compétence ovocytaire humaine, et engagent à poursuivre nos recherches sur l'utilisation du dosage de PROK1 comme nouveau critère prédictif du potentiel implantatoire de l'embryon en FIV.

[17] Avec le soutien financier de l'Agence de la Biomédecine (ABM, 30 k€) et du Groupe Pasteur Mutualité (GPM,10 k€).

2. Compréhension des mécanismes de régulations de l'expression de PROK1 dans le follicule ovarien humain.

Les niveaux d'expression variables de PROK1 et de ses deux récepteurs dans le follicule ovarien humain suggèrent une régulation dynamique au cours de la croissance folliculaire, qui est contrôlée en FIV par l'administration des gonadotrophines FSH et hCG. Suite à la mise en place des cultures primaires de cellules folliculaires au Laboratoire d'AMP, nous avons étudié l'impact de la FSH et de l'hCG sur la sécrétion de PROK1 dans ces deux modèles cellulaires. A ce jour, nos résultats montrent une augmentation significative de la sécrétion de PROK1 dans les surnageants des cellules de cumulus traitées par 100 U.I./ml de FSH et par 1 U.I./ml d'hCG à 24h, 48h, et 72h de culture ($n=5$, $p<0,01$ et $n=10$, $p<0,001$, respectivement). En revanche, nos expérimentations montrent une diminution significative de la sécrétion de PROK1 dans les surnageants des cellules de la granulosa traitées 1 U.I./ml d'hCG à 24h et 48h de culture ($n=5$, $p<0,01$). Ces premières données mettent en évidence une régulation différentielle de PROK1 dans ces deux types cellulaires, et suggèrent la participation de PROK1 et de ses deux récepteurs dans les cascades intracellulaires déclenchées par ces deux hormones au cours des étapes tardives de maturation ovocytaire et dans le déclenchement de l'ovulation. Des expériences sont en cours afin d'évaluer le rôle du système PROK1/PROKR dans les régulations hormonales participant au développement folliculaire chez la femme.

CONCLUSION

THESE SOUTENUE PAR : Sophie BROUILLET

TITRE : PROKINETICINE 1 : NOUVEAU BIOMARQUEUR DE L'IMPLANTATION EMBRYONNAIRE EN FECONDATION *IN VITRO*.

CONCLUSION : L'infertilité touche environ 15% des couples en âge de procréer, soit plus de 80 millions de couples dans le monde. Depuis plus de 35 ans, la fécondation *in vitro* (FIV) a révolutionné la médecine reproductive en contribuant à la naissance de plus de 5 millions d'enfants à l'échelle mondiale, depuis celle de Louise Brown en 1978. Malgré les nombreux progrès réalisés dans les techniques de FIV, un défi reste aujourd'hui à relever : l'augmentation des taux de grossesses uniques, seul rempart contre les risques fœto-maternels associés aux grossesses multiples. Actuellement, le choix des embryons à transférer repose sur l'établissement de scores morphocinétiques, dont l'utilisation exclusive semble aujourd'hui montrer ses limites. En effet, plus de 80% des embryons choisis pour le transfert ne s'implantent pas, participant ainsi à l'échec de 3 cycles de FIV sur 4. Ainsi, la validation de nouveaux critères pronostiques fiables de l'implantation embryonnaire en FIV représente un enjeu actuel majeur du Biologiste de la Reproduction. Récemment, la prokinéticine 1 (PROK1) a été proposée comme un candidat prometteur pour ses caractéristiques biologiques en lien direct avec la grossesse, en particulier pour son rôle dans la réceptivité endométriale et le développement placentaire.

Mon projet de thèse a porté sur l'évaluation de l'intérêt du dosage de PROK1 dans les échantillons biologiques issus des tentatives de FIV comme critère décisionnel supplémentaire dans la stratégie de transfert embryonnaire en FIV. Pour cela, nous avons inclus 135 patients infertiles dans le cadre d'une étude longitudinale prospective de cohorte de janvier 2013 à juin 2015 dans le centre d'AMP du Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble. Après accord des patients, les différents échantillons biologiques ont été gérés dans le cadre du Centre de Ressources Biologiques GERMETHEQUE. Mes résultats ont montré : (1) l'expression forte de PROK1 et ses deux récepteurs (PROKR1 et PROKR2) dans les follicules ovariens tout au long de leur développement (du follicule primordial à antral), (2) la sécrétion de PROK1 par les cellules folliculaires en cultures primaires, avec une sécrétion significativement plus élevée par les cellules de la granulosa en comparaison aux cellules du cumulus, (3) l'augmentation significative du taux d'implantation embryonnaire chez les patientes présentant un taux élevé de PROK1 dans les échantillons biologiques issus de la tentative de FIV (liquide folliculaire et plots de fécondation).

Ces résultats démontrent l'intérêt pronostique du dosage de PROK1 comme nouveau biomarqueur de l'implantation embryonnaire en routine hospitalière. L'évaluation des taux de PROK1 pourrait alors représenter un critère décisionnel supplémentaire, en association aux critères morphocinétiques, dans le choix de la stratégie de transfert embryonnaire, et ainsi permettre l'augmentation des taux de grossesses en FIV.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le : 09/09/2015

LE DOYEN ET PRESIDENT DE LA THESE

Pr. Christophe RIBUOT

Pr. Christophe RIBUOT
Directeur UFR Pharmacie
Université Joseph Fourier

Dr. Delphine ALDEBERT

Références

1. Ombelet W, Cooke I, Dyer S, Serour G, Devroey P. Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. Hum Reprod Update. 2008;14(6):605-21.
2. Iliadou AN, Janson PC, Cnattingius S. Epigenetics and assisted reproductive technology. J Intern Med. 2011;270(5):414-20.
3. Botros L, Sakkas D, Seli E. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. Mol Hum Reprod. 2008;14(12):679-90.
4. Pandian Z, Marjoribanks J, Ozturk O, Serour G, Bhattacharya S. Number of embryos for transfer following in vitro fertilisation or intra-cytoplasmic sperm injection. Cochrane Database Syst Rev. 2013;7:CD003416.
5. Medicine PcotASfR. Multiple pregnancy associated with infertility therapy. Fertility and sterility. 2006.
6. Devaux A, Levy R. How to improve assisted reproductive techniques results? Biological aspects. Gynecol Obstet Fertil. 2006;34(9):781-5.
7. Alter L, Boitrelle F, Sifer C. How can we nowadays select the best embryo to transfer? Gynecol Obstet Fertil. 2014;42(7-8):515-25.
8. Cummins JM, Breen TM, Harrison KL, Shaw JM, Wilson LM, Hennessey JF. A formula for scoring human embryo growth rates in in vitro fertilization: its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. J In Vitro Fert Embryo Transf. 1986;3(5):284-95.
9. Bolton VN, Hawes SM, Taylor CT, Parsons JH. Development of spare human preimplantation embryos in vitro: an analysis of the correlations among gross morphology, cleavage rates, and development to the blastocyst. J In Vitro Fert Embryo Transf. 1989;6(1):30-5.
10. Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. Hum Reprod. 1997;12(7):1545-9.
11. Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. Hum Reprod. 1999;14(5):1318-23.
12. Baczkowski T, Kurzawa R, Glabowski W. Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. Reprod Biol. 2004;4(1):5-22.
13. Rijnders PM, Jansen CA. The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1998;13(10):2869-73.
14. Guerif F, Le Gouge A, Giraudeau B, Poindron J, Bidault R, Gasnier O, et al. Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: a prospective study based on 4042 embryos. Hum Reprod. 2007;22(7):1973-81.
15. Kovalevsky G, Patrizio P. High rates of embryo wastage with use of assisted reproductive technology: a look at the trends between 1995 and 2001 in the United States. Fertil Steril. 2005;84(2):325-30.
16. Royere D, Feuerstein P, Cadoret V, Puard V, Uzbekova S, Dalbies-Tran R, et al. Non invasive assessment of embryo quality: proteomics, metabolomics and oocyte-cumulus dialogue. Gynecol Obstet Fertil. 2009;37(11-12):917-20.
17. Dumesic DA, Meldrum DR, Katz-Jaffe MG, Krisher RL, Schoolcraft WB. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. Fertil Steril. 2015;103(2):303-16.

18. 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.
19. Brouillet S, Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N. EG-VEGF: a key endocrine factor in placental development. Trends Endocrinol Metab. 2012;23(10):501-8.
20. Brouillet S, Hoffmann P, Thomas-Cadi C, Bergues U, Feige JJ, Alfaidy N, et al. PROK1, prognostic marker of embryo implantation? Gynecol Obstet Fertil. 2013;41(9):562-5.
21. Maldonado-Perez D, Evans J, Denison F, Millar RP, Jabbour HN. Potential roles of the prokineticins in reproduction. Trends Endocrinol Metab. 2007;18(2):66-72.
22. Gao MZ, Zhao XM, Lin Y, Sun ZG, Zhang HQ. Effects of EG-VEGF, VEGF and TGF-beta1 on pregnancy outcome in patients undergoing IVF-ET treatment. J Assist Reprod Genet. 2012;29(10):1091-6.
23. INSERM. Rapports publiés [en ligne]. Rapport du groupe de travail réuni par l'Institut national de la santé et de la recherche médicale et par l'Agence de la biomédecine à la demande du Parlement (Article 51 de la loi n°2011-814 du 7 juillet 2011). Les troubles de la fertilité : état des connaissances et pistes pour la recherche 18 décembre 2012 [consulté le 10 septembre 2015]. Disponible : http://www.inserm.fr/thematiques/sante-publique/rapports-publies.
24. ABM. L'assistance médicale à la procréation - Agence de la biomédecine [en ligne]. L'AMP et la baisse de la fertilité avec l'âge : une réalité dont les couples doivent avoir conscience. [consulté le 10 septembre 2015]. Disponible : http://www.agence-biomedecine.fr/L-assistance-medicale-a-la,64.
25. Sibert L, Lacarriere E, Safsaf A, Rives N. Aging of the human testis. Presse medicale. 2014;43(2):171-7.
26. Hassan MA, Killick SR. Effect of male age on fertility: evidence for the decline in male fertility with increasing age. Fertil Steril. 2003;79 Suppl 3:1520-7.
27. Slama R DB, Keiding N, Blondel B, Bouyer J. La fertilité des couples en France [en ligne]. Available from: http://opac.invs.sante.fr/doc_num.php?explnum_id=794.
28. Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O, Adamson GD, de Mouzon J, Nygren KG, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology: world report on assisted reproductive technology, 2005. Fertil Steril. 2014;101(2):366-78.
29. Gurunath S, Pandian Z, Anderson RA, Bhattacharya S. Defining infertility--a systematic review of prevalence studies. Hum Reprod Update. 2011;17(5):575-88.
30. Gnoth C, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Friol K, Tigges J, Freundl G. Definition and prevalence of subfertility and infertility. Hum Reprod. 2005;20(5):1144-7.
31. Lindsay TJ, Vitrikas KR. Evaluation and treatment of infertility. American family physician. 2015;91(5):308-14.
32. Balaban B, Sakkas D, Gardner DK. Laboratory procedures for human in vitro fertilization. Semin Reprod Med. 2014;32(4):272-82.
33. Malvezzi H, Sharma R, Agarwal A, Abuzenadah AM, Abu-Elmagd M. Sperm quality after density gradient centrifugation with three commercially available media: a controlled trial. Reprod Biol Endocrinol. 2014;12:121.
34. Polat M, Bozdag G, Yarali H. Best protocol for controlled ovarian hyperstimulation in assisted reproductive technologies: fact or opinion? Semin Reprod Med. 2014;32(4):262-71.
35. biomédecine Adl. Le rapport médical et scientifique de l'assistance médicale à la procréation et de la génétique humaines en France : Activité d'Assistance Médicale à la Procréation 2012. 2013.
36. FIV.fr [en ligne]. Available from: http://www.fiv.fr/.
37. Gougeon A. Frequent occurrence of multiovular follicles and multinuclear oocytes in the adult human ovary. Fertil Steril. 1981;35(4):417-22.
38. E DLR. 200 000 enfants conçus par fécondation in vitro en France depuis 30 ans. 2008.
39. Leridon H. Studies of fertility and fecundity: comparative approaches from demography and epidemiology. C R Biol. 2007;330(4):339-46.

40. Leridon H, Slama R. The impact of a decline in fecundity and of pregnancy postponement on final number of children and demand for assisted reproduction technology. Hum Reprod. 2008;23(6):1312-9.
41. De La Rochebrochard E TP, Bailly E, Guibert J, Bouyer J. Quelles sont les chances d'avoir un enfant durant ou après une prise en charge pour FIV ? Une enquête de cohorte rétrospective en France. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire. 2011.
42. Kaveh M, Ghajarzadeh M, Davari Tanha F, Nayeri F, Keramati Z, Shariat M, et al. Pregnancy Complications and Neonatal Outcomes in Multiple Pregnancies: A Comparison between Assisted Reproductive Techniques and Spontaneous Conception. International journal of fertility & sterility. 2015;8(4):367-72.
43. Strandell A, Bergh C, Lundin K. Selection of patients suitable for one-embryo transfer may reduce the rate of multiple births by half without impairment of overall birth rates. Hum Reprod. 2000;15(12):2520-5.
44. Bergh C. Single embryo transfer: a mini-review. Hum Reprod. 2005;20(2):323-7.
45. Ferraretti AP, Goossens V, Kupka M, Bhattacharya S, de Mouzon J, Castilla JA, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2009: results generated from European registers by ESHRE. Hum Reprod. 2013;28(9):2318-31.
46. Hamamah S. Oocyte and embryo quality: is their morphology a good criterion? Journal de gynecologie, obstetrique et biologie de la reproduction. 2005;34(7 Pt 2):5S38-5S41.
47. Ebner T, Maurer M, Shebl O, Moser M, Mayer RB, Duba HC, et al. Planar embryos have poor prognosis in terms of blastocyst formation and implantation. Reproductive Biomedicine Online. 2012;25(3):267-72.
48. Medicine TPCotASfR. Multiple pregnancy associated with infertility therapy. Fertil Steril. 2006;86(5 Suppl 1):S106-10.
49. Katz-Jaffe MG, Gardner DK. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Can proteomics help to shape the future of human assisted conception? Reprod Biomed Online. 2008;17(4):497-501.
50. Ledee N, Munaut C, Serazin V, Perrier d'Hauterive S, Lombardelli L, Logiodice F, 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(2):126-32.
51. Singh R, Sinclair KD. Metabolomics: approaches to assessing oocyte and embryo quality. Theriogenology. 2007;68 Suppl 1:S56-62.
52. Aghajanova L, Hamilton AE, Giudice LC. Uterine receptivity to human embryonic implantation: histology, biomarkers, and transcriptomics. Semin Cell Dev Biol. 2008;19(2):204-11.
53. Al-Ghamdi A, Coskun S, Al-Hassan S, Al-Rejjal R, Awartani K. The correlation between endometrial thickness and outcome of in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) outcome. Reprod Biol Endocrinol. 2008;6:37.
54. De Geyter C, Schmitter M, De Geyter M, Nieschlag E, Holzgreve W, Schneider HP. Prospective evaluation of the ultrasound appearance of the endometrium in a cohort of 1,186 infertile women. Fertil Steril. 2000;73(1):106-13.
55. Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. Fertil Steril. 2000;74(3):429-38.
56. VanBlerkom J, Antczak M, Schrader R. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: Association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. Human Reproduction. 1997;12(5):1047-55.
57. Wulff C, Wiegand SJ, Saunders PT, Scobie GA, Fraser HM. Angiogenesis during follicular development in the primate and its inhibition by treatment with truncated Flt-1-Fc (vascular endothelial growth factor Trap(A40)). Endocrinology. 2001;142(7):3244-54.
58. Kaufmann P, Mayhew TM, Charnock-Jones DS. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. Placenta. 2004;25(2-3):114-26.

59. LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, et al. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. Nature. 2001;412(6850):877-84.
60. Lin DC, Bullock CM, Ehlert FJ, Chen JL, Tian H, Zhou QY. Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. J Biol Chem. 2002;277(22):19276-80.
61. Li M, Bullock CM, Knauer DJ, Ehlert FJ, Zhou QY. Identification of two prokineticin cDNAs: recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle. Mol Pharmacol. 2001;59(4):692-8.
62. Chen J, Kuei C, Sutton S, Wilson S, Yu J, Kamme F, et al. Identification and pharmacological characterization of prokineticin 2 beta as a selective ligand for prokineticin receptor 1. Mol Pharmacol. 2005;67(6):2070-6.
63. Kaser A, Winklmayr M, Lepperdinger G, Kreil G. The AVIT protein family. Secreted cysteine-rich vertebrate proteins with diverse functions. EMBO Rep. 2003;4(5):469-73.
64. Soga T, Matsumoto S, Oda T, Saito T, Hiyama H, Takasaki J, et al. Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. Biochim Biophys Acta. 2002;1579(2-3):173-9.
65. Masuda Y, Takatsu Y, Terao Y, Kumano S, Ishibashi Y, Suenaga M, et al. Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. Biochem Biophys Res Commun. 2002;293(1):396-402.
66. Fraser HM, Bell J, Wilson H, Taylor PD, Morgan K, Anderson RA, et al. Localization and quantification of cyclic changes in the expression of endocrine gland vascular endothelial growth factor in the human corpus luteum. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90(1):427-34.
67. Ferrara N, Frantz G, LeCouter J, Dillard-Telm L, Pham T, Draksharapu A, et al. Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. Am J Pathol. 2003;162(6):1881-93.
68. Gao MZ, Zhao XM, Sun ZG, Hong Y, Zhao LW, Zhang HQ. Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor concentrations in follicular fluid and serum may predict ovarian hyperstimulation syndrome in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. Fertil Steril. 2011;95(2):673-8.
69. Balu S, Pirtea L, Gaje P, Cimpean AM, Raica M. The immunohistochemical expression of endocrine gland-derived-VEGF (EG-VEGF) as a prognostic marker in ovarian cancer. Rom J Morphol Embryo. 2012;53(3):479-83.
70. Zhang L, Yang N, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Mohamed-Hadley A, Fracchioli S, et al. Expression of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor in ovarian carcinoma. Clinical Cancer Research. 2003;9(1):264-72.
71. Matsumoto S, Yamazaki C, Masumoto KH, Nagano M, Naito M, Soga T, et al. Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(11):4140-5.
72. Kisliouk T, Podlovni H, Meidan R. Unique expression and regulatory mechanisms of EG-VEGF/prokineticin-1 and its receptors in the corpus luteum. Ann Anat. 2005;187(5-6):529-37.
73. Evans J, Catalano RD, Brown P, Sherwin R, Critchley HO, Fazleabas AT, et al. Prokineticin 1 mediates fetal-maternal dialogue regulating endometrial leukemia inhibitory factor. FASEB J. 2009;23(7):2165-75.
74. Evans J, Catalano RD, Morgan K, Critchley HO, Millar RP, Jabbour HN. Prokineticin 1 signaling and gene regulation in early human pregnancy. Endocrinology. 2008;149(6):2877-87.
75. Haouzi D, Mahmoud K, Fourar M, Bendhaou K, Dechaud H, De Vos J, et al. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. Hum Reprod. 2009;24(1):198-205.

76. Maldonado-Perez D, Brown P, Morgan K, Millar RP, Thompson EA, Jabbour HN. Prokineticin 1 modulates IL-8 expression via the calcineurin/NFAT signaling pathway. Biochim Biophys Acta. 2009;1793(7):1315-24.
77. Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N. Expression and oxygen regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in human placenta during early pregnancy. Endocrinology. 2006;147(4):1675-84.
78. Hoffmann P, Saoudi Y, Benharouga M, Graham CH, Schaal JP, Mazouni C, et al. Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications. J Cell Mol Med. 2009;13(8B):2224-35.
79. Salker M, Teklenburg G, Molokhia M, Lavery S, Trew G, Aojanepong T, et al. Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. PloS one.5(4):e10287.
80. Shaw JL, Denison FC, Evans J, Durno K, Williams AR, Entrican G, et al. Evidence of prokineticin dysregulation in fallopian tube from women with ectopic pregnancy. Fertil Steril.94(5):1601-8 e1.
81. Brouillet S, Murthi P, Hoffmann P, Salomon A, Sergent F, De Mazancourt P, et al. EG-VEGF controls placental growth and survival in normal and pathological pregnancies: case of fetal growth restriction (FGR). Cell Mol Life Sci.
82. Su MT, Lin SH, Lee IW, Chen YC, Hsu CC, Pan HA, et al. Polymorphisms of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor gene and its receptor genes are associated with recurrent pregnancy loss. Hum Reprod. 2010;25(11):2923-30.
83. Su MT, Lin SH, Chen YC, Wu LW, Kuo PL. Prokineticin receptor variants (PKR1-I379V and PKR2-V331M) are protective genotypes in human early pregnancy. Reproduction. 2013;146(1):63-73.
84. Bastings L, Beerendonk CC, Westphal JR, Massuger LF, Kaal SE, van Leeuwen FE, et al. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue in cancer survivors and the risk of reintroducing malignancy: a systematic review. Hum Reprod Update. 2013;19(5):483-506.
85. Koot YE, Macklon NS. Embryo implantation: biology, evaluation, and enhancement. Current opinion in obstetrics & gynecology. 2013;25(4):274-9.
86. Hammadeh ME, Ertan AK, Zeppezauer M, Baltes S, Georg T, Rosenbaum P, et al. Immunoglobulins and cytokines level in follicular fluid in relation to etiology of infertility and their relevance to IVF outcome. Am J Reprod Immunol. 2002;47(2):82-90.
87. Ledee N, Petitbarat M, Rahmati M, Dubanchet S, Chaouat G, Sandra O, et al. New pre-conception immune biomarkers for clinical practice: interleukin-18, interleukin-15 and TWEAK on the endometrial side, G-CSF on the follicular side. J Reprod Immunol. 2011;88(2):118-23.
88. Vercammen M, Verloes A, Haentjens P, Van de Velde H. Can soluble human leucocyte antigen-G predict successful pregnancy in assisted reproductive technology? Current opinion in obstetrics & gynecology. 2009;21(3):285-90.
89. Hammadeh ME, Fischer-Hammadeh C, Amer AS, Rosenbaum P, Schmidt W. Relationship between cytokine concentration in serum and preovulatory follicular fluid and in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection outcome. Chemical immunology and allergy. 2005;88:80-97.
90. Brouillet S, Hoffmann P, Alfaidy N, Feige JJ. [Prokineticins: new regulatory peptides in human reproduction]. Med Sci (Paris). 2014;30(3):274-9.
91. Kisliouk T, Levy N, Hurwitz A, Meidan R. Presence and regulation of endocrine gland vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in ovarian cells. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(8):3700-7.
92. Battersby S, Critchley HO, Morgan K, Millar RP, Jabbour HN. Expression and regulation of the prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bv8) and their receptors in the human endometrium across the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89(5):2463-9.

93. Ngan ES, Lee KY, Yeung WS, Ngan HY, Ng EH, Ho PC. Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor is expressed in human peri-implantation endometrium, but not in endometrial carcinoma. Endocrinology. 2006;147(1):88-95.
94. Macdonald LJ, Sales KJ, Grant V, Brown P, Jabbour HN, Catalano RD. Prokineticin 1 induces Dickkopf 1 expression and regulates cell proliferation and decidualization in the human endometrium. Mol Hum Reprod. 2011;17(10):626-36.
95. Brouillet S, Hoffmann P, Benharouga M, Salomon A, Schaal JP, Feige JJ, et al. Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells. Mol Biol Cell. 2010;21(16):2832-43.
96. Brouillet S, Murthi P, Hoffmann P, Salomon A, Sergent F, De Mazancourt P, et al. EG-VEGF controls placental growth and survival in normal and pathological pregnancies: case of fetal growth restriction (FGR). Cell Mol Life Sci. 2013;70(3):511-25.
97. Shaw JL, Denison FC, Evans J, Durno K, Williams AR, Entrican G, et al. Evidence of prokineticin dysregulation in fallopian tube from women with ectopic pregnancy. Fertil Steril. 2010;94(5):1601-8 e1.
98. Shaw JL, Oliver E, Lee KF, Entrican G, Jabbour HN, Critchley HO, et al. Cotinine exposure increases Fallopian tube PROKR1 expression via nicotinic AChRalpha-7: a potential mechanism explaining the link between smoking and tubal ectopic pregnancy. Am J Pathol. 2010;177(5):2509-15.
99. Shaw JL, Wills GS, Lee KF, Horner PJ, McClure MO, Abrahams VM, et al. Chlamydia trachomatis infection increases fallopian tube PROKR2 via TLR2 and NFkappaB activation resulting in a microenvironment predisposed to ectopic pregnancy. Am J Pathol. 2011;178(1):253-60.
100. Holloway AC, Salomon A, Soares MJ, Garnier V, Raha S, Sergent F, et al. Characterization of the adverse effects of nicotine on placental development: In vivo and in vitro studies. American journal of physiology. 2013.
101. Salker M, Teklenburg G, Molokhia M, Lavery S, Trew G, Aojanepong T, et al. Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. PLoS One. 2010;5(4):e10287.
102. Salmassi A, Schmutzler AG, Huang L, Hedderich J, Jonat W, Mettler L. Detection of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in human follicular luteinized granulosa cells. Fertil Steril. 2004;81 Suppl 1:786-91.
103. Machelon V, Nome F, Durand-Gasselin I, Emilie D. Macrophage and granulosa interleukin-1 beta mRNA in human ovulatory follicles. Hum Reprod. 1995;10(8):2198-203.
104. Brouillet S, Hoffmann P, Chauvet S, Salomon A, Chamboredon S, Sergent F, et al. Revisiting the role of hCG: new regulation of the angiogenic factor EG-VEGF and its receptors. Cell Mol Life Sci. 2012;69(9):1537-50.
105. Nebigil CG. Prokineticin receptors in cardiovascular function: foe or friend? Trends Cardiovasc Med. 2009;19(2):55-60.
106. Guilini C, Urayama K, Turkeri G, Dedeoglu DB, Kurose H, Messaddeq N, et al. Divergent roles of prokineticin receptors in the endothelial cells: angiogenesis and fenestration. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009;298(3):H844-52.
107. Urayama K, Dedeoglu DB, Guilini C, Frantz S, Ertl G, Messaddeq N, et al. Transgenic myocardial overexpression of prokineticin receptor-2 (GPR73b) induces hypertrophy and capillary vessel leakage. Cardiovasc Res. 2009;81(1):28-37.
108. Urayama K, Guilini C, Messaddeq N, Hu K, Steenman M, Kurose H, et al. The prokineticin receptor-1 (GPR73) promotes cardiomyocyte survival and angiogenesis. FASEB J. 2007;21(11):2980-93.

Annexe 1

GermEtheque

Consentement à la conservation de ressources biologiques dans un Centre de Ressources Biologiques à des buts de recherches scientifiques et développements biotechnologiques

Ref : DE-S1-093-03

Je soussigné(e),
Nom :
Prénom :
Date et lieu de naissance :
Adresse :
N° de sécurité sociale :

- certifie avoir pris connaissance de la note d'information expliquant les objectifs et modalités de conservation et d'utilisation secondaire de ressources biologiques (RB) issues de prélèvements que j'ai effectués,
- consens à ce que des RB issues de ces prélèvements soient conservées de manière anonyme au sein des collections du Centre de Ressources Biologiques GERMETHEQUE, ces RB pouvant être des liquides biologiques, des cellules, des gamètes (spermatozoïdes ou ovocytes), du tissu testiculaire ou ovarien, de l'ADN, ces RB seront conservées jusqu'à épuisement,
- consens à ce que ces RB puissent ultérieurement faire l'objet d'analyses scientifiques y compris génétiques (ADN) avec la finalité de faire progresser les connaissances dans le champ de la fertilité, la procréation ou le développement humain par les équipes de recherche du centre ou par d'autres équipes auxquelles les RB auraient pu être cédées par convention ou contrat. Ces RB peuvent éventuellement être soumises à des recherches ayant d'autres finalités scientifiques ou être utilisées pour le développement biotechnologique.

J'ai bien compris que ma participation n'entraînait pas d'actes médicaux supplémentaires.
J'ai bien été informé que dans le fichier informatisé, les données médicales étaient rendues anonymes en accord avec la législation actuelle. Le CRB a obtenu l'avis favorable du Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest Outre mer II le 2 juillet 2009 et a reçu une autorisation du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche en date du 27 août 2009 (AC 2009-886).
Je déclare avoir été informé(e) de la possibilité de révoquer mon consentement à tout moment et de demander ainsi la destruction de mes échantillons et données associées, en exerçant ce droit auprès du Pr Bujan responsable du CRB GERMETHEQUE (05 67 77 14 35) ou auprès du responsable de site. J'atteste ne pas être sous sauvegarde de justice, curatelle ou tutelle.

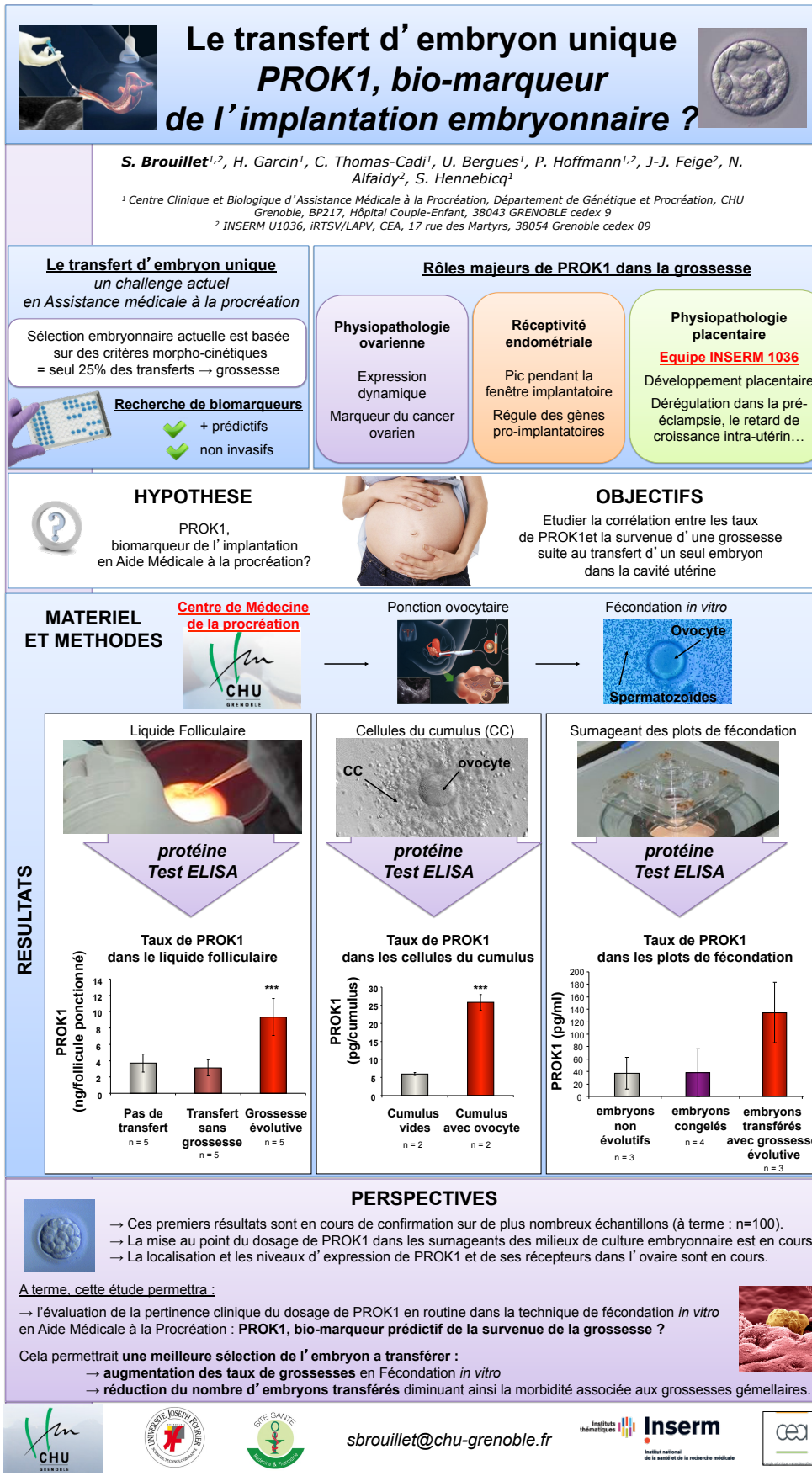
Site	Contact	Téléphone
TOULOUSE	Nathalie MOINARD	05 67 77 10 50
MARSEILLE	Catherine GUILLEMAIN	04 91 38 36 06
GRENOBLE	Sylvianne HENNEBICQ	04 76 76 53 60
CLERMONT-FERRAND	Laurent JANNY	04 73 75 01 27
PARIS-TENON	Isabelle BERTHAUT	01 56 01 78 02
RENNES	Célia RAVEL	02 99 26 59 11
STRASBOURG	Marius TELETIN	03 69 55 34 23
BORDEAUX	Aline PAPAXANTHOS	05 56 79 56 79
LILLE	Valérie MITCHELL	03 20 44 54 85
ROUEN	Nathalie RIVES	02 32 88 82 25
PARIS-COCHIN	Céline CHALAS	01 58 41 37 46

Fait à le Signature du patient

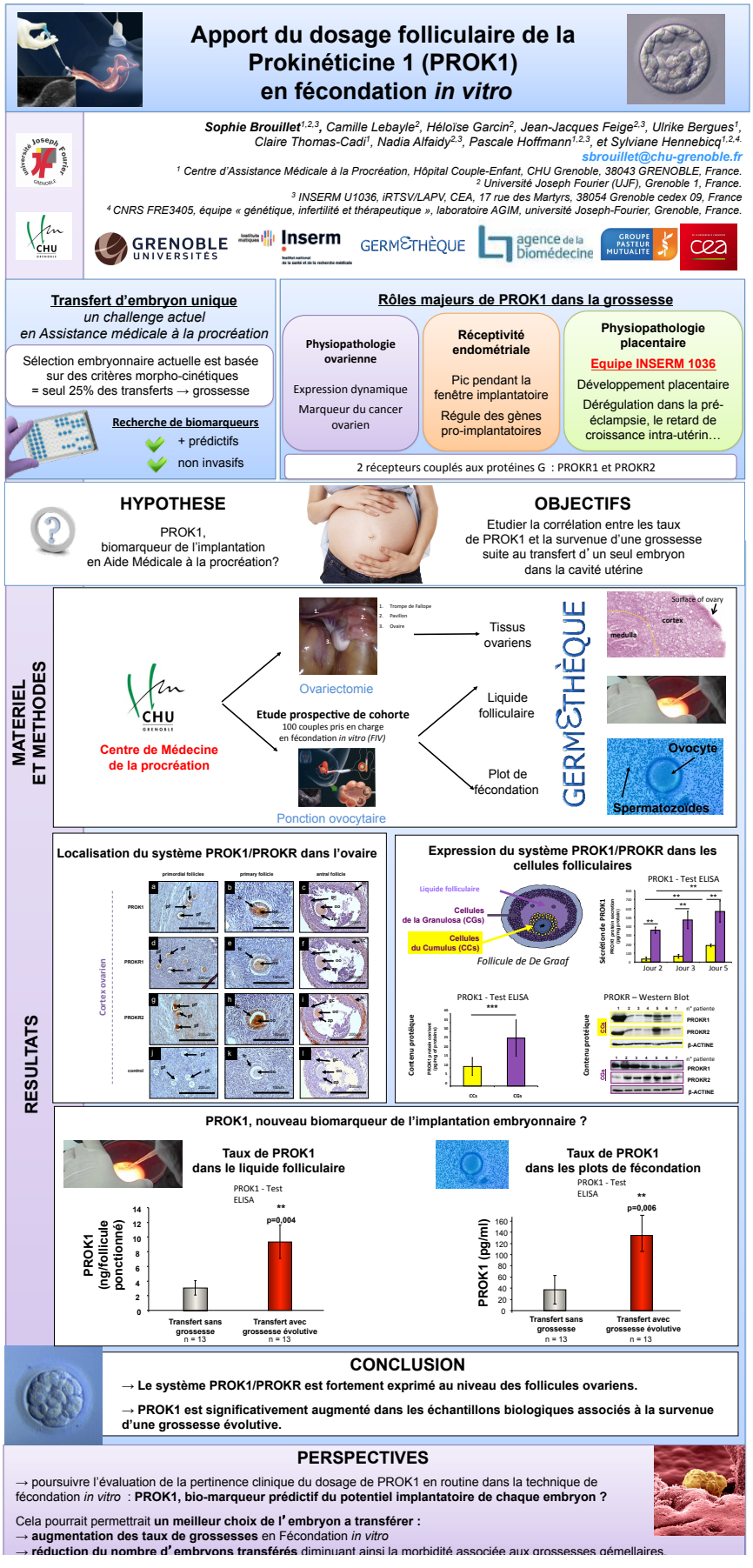
Nom et signature du médecin accueillant le patient

1/1

Annexe 2


Le transfert d'embryon unique
PROK1, bio-marqueur
de l'implantation embryonnaire ?
S. Brouillet[1,2], H. Garcin[1], C. Thomas-Cadi[1], U. Bergues[1], P. Hoffmann[1,2], J-J. Feige[2], N. Alfaidy[2], S. Hennebicq[1]
[1] Centre Clinique et Biologique d'Assistance Médicale à la Procréation, Département de Génétique et Procréation, CHU Grenoble, BP217, Hôpital Couple-Enfant, 38043 GRENOBLE cedex 9
[2] INSERM U1036, iRTSV/LAPV, CEA, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 09
Le transfert d'embryon unique
un challenge actuel
en Assistance médicale à la procréation
Sélection embryonnaire actuelle est basée sur des critères morpho-cinétiques
= seul 25% des transferts → grossesse
Recherche de biomarqueurs
+ prédictifs
non invasifs
Rôles majeurs de PROK1 dans la grossesse
Physiopathologie ovarienne
Expression dynamique
Marqueur du cancer ovarien
Réceptivité endométriale
Pic pendant la fenêtre implantatoire
Régule des gènes pro-implantatoires
Physiopathologie placentaire
Equipe INSERM 1036
Développement placentaire
Dérégulation dans la pré-éclampsie, le retard de croissance intra-utérin…
HYPOTHESE
PROK1,
biomarqueur de l'implantation
en Aide Médicale à la procréation?
OBJECTIFS
Etudier la corrélation entre les taux de PROK1et la survenue d'une grossesse suite au transfert d'un seul embryon dans la cavité utérine
MATERIEL ET METHODES
Centre de Médecine de la procréation
CHU GRENOBLE
Ponction ovocytaire
Fécondation in vitro
Ovocyte
Spermatozoïdes
RESULTATS
Liquide Folliculaire
protéine Test ELISA
Taux de PROK1 dans le liquide folliculaire
PROK1 (ng/follicule ponctionné)
Pas de transfert n = 5
Transfert sans grossesse n = 5
Grossesse évolutive n = 5
Cellules du cumulus (CC)
CC
ovocyte
protéine Test ELISA
Taux de PROK1 dans les cellules du cumulus
PROK1 (pg/cumulus)
Cumulus vides n = 2
Cumulus avec ovocyte n = 2
Surnageant des plots de fécondation
protéine Test ELISA
Taux de PROK1 dans les plots de fécondation
PROK1 (pg/ml)
embryons non évolutifs n = 3
embryons congelés n = 4
embryons transférés avec grossesse évolutive n = 3
PERSPECTIVES
→ Ces premiers résultats sont en cours de confirmation sur de plus nombreux échantillons (à terme : n=100).
→ La mise au point du dosage de PROK1 dans les surnageants des milieux de culture embryonnaire est en cours.
→ La localisation et les niveaux d'expression de PROK1 et de ses récepteurs dans l'ovaire sont en cours.
A terme, cette étude permettra :
→ l'évaluation de la pertinence clinique du dosage de PROK1 en routine dans la technique de fécondation in vitro en Aide Médicale à la Procréation : PROK1, bio-marqueur prédictif de la survenue de la grossesse ?
Cela permettrait une meilleure sélection de l'embryon a transférer :
→ augmentation des taux de grossesses en Fécondation in vitro
→ réduction du nombre d'embryons transférés diminuant ainsi la morbidité associée aux grossesses gémellaires.
sbrouillet@chu-grenoble.fr

Annexe 3


Apport du dosage folliculaire de la Prokinéticine 1 (PROK1) en fécondation in vitro
Sophie Brouillet[1,2,3], Camille Lebayle[2], Héloïse Garcin[2], Jean-Jacques Feige[2,3], Ulrike Bergues[1], Claire Thomas-Cadi[1], Nadia Alfaidy[2,3], Pascale Hoffmann[1,2,3], et Sylviane Hennebicq[1,2,4].
sbrouillet@chu-grenoble.fr
[1] Centre d'Assistance Médicale à la Procréation, Hôpital Couple-Enfant, CHU Grenoble, 38043 GRENOBLE, France.
[2] Université Joseph Fourier (UJF), Grenoble 1, France.
[3] INSERM U1036, iRTSV/LAPV, CEA, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 09, France
[4] CNRS FRE3405, équipe « génétique, infertilité et thérapeutique », laboratoire AGIM, université Joseph-Fourier, Grenoble, France.
Transfert d'embryon unique
un challenge actuel
en Assistance médicale à la procréation
Sélection embryonnaire actuelle est basée sur des critères morpho-cinétiques
= seul 25% des transferts → grossesse
Recherche de biomarqueurs
+ prédictifs
non invasifs
Rôles majeurs de PROK1 dans la grossesse
Physiopathologie ovarienne
Expression dynamique
Marqueur du cancer ovarien
Réceptivité endométriale
Pic pendant la fenêtre implantatoire
Régule des gènes pro-implantatoires
Physiopathologie placentaire
Equipe INSERM 1036
Développement placentaire
Dérégulation dans la pré-éclampsie, le retard de croissance intra-utérin…
2 récepteurs couplés aux protéines G : PROKR1 et PROKR2
HYPOTHESE
PROK1, biomarqueur de l'implantation en Aide Médicale à la procréation?
OBJECTIFS
Etudier la corrélation entre les taux de PROK1 et la survenue d'une grossesse suite au transfert d'un seul embryon dans la cavité utérine
MATERIEL ET METHODES
Centre de Médecine de la procréation
Ovariectomie
Etude prospective de cohorte
100 couples pris en charge en fécondation in vitro (FIV)
Ponction ovocytaire
Tissus ovariens
Liquide folliculaire
Plot de fécondation
GERMETHÈQUE
Surface of ovary
cortex
medulla
Ovocyte
Spermatozoïdes
RESULTATS
Localisation du système PROK1/PROKR dans l'ovaire
Cortex ovarien
Expression du système PROK1/PROKR dans les cellules folliculaires
Liquide folliculaire
Cellules de la Granulosa (CGs)
Cellules du Cumulus (CCs)
Follicule de De Graaf
PROK1 - Test ELISA
Jour 2
Jour 3
Jour 5
PROKR – Western Blot
PROKR1
PROKR2
β-ACTINE
PROK1, nouveau biomarqueur de l'implantation embryonnaire ?
Taux de PROK1 dans le liquide folliculaire
PROK1 (ng/follicule ponctionné)
p=0,004
Transfert sans grossesse n = 13
Transfert avec grossesse évolutive n = 13
Taux de PROK1 dans les plots de fécondation
PROK1 (pg/ml)
p=0,006
CONCLUSION
→ Le système PROK1/PROKR est fortement exprimé au niveau des follicules ovariens.
→ PROK1 est significativement augmenté dans les échantillons biologiques associés à la survenue d'une grossesse évolutive.
PERSPECTIVES
→ poursuivre l'évaluation de la pertinence clinique du dosage de PROK1 en routine dans la technique de fécondation in vitro : PROK1, bio-marqueur prédictif du potentiel implantatoire de chaque embryon ?
Cela pourrait permettrait un meilleur choix de l'embryon a transférer :
→ augmentation des taux de grossesses en Fécondation in vitro
→ réduction du nombre d'embryons transférés diminuant ainsi la morbidité associée aux grossesses gémellaires.

Annexe 4

La prokinéticine 1, nouvel acteur clé dans l'acquisition de la compétence ovocytaire : Régulation par le système LH/hCG

Sophie Brouillet[1,2,3], Camille Lebayle[2], Héloïse Garcin[2], Claire Thomas-Cadi[1], Julien Bessonnat[1,4], Nicole Quenard[1], Ulrike Bergues[1], Jean-Jacques Feige[2,3], Pascale Hoffmann[1,2,3], Nadia Alfaidy[2,3], et Sylviane Hennebicq[1,2,4].

sbrouillet@chu-grenoble.fr

[1] Centre d'Assistance Médicale à la Procréation, Hôpital Couple-Enfant, CHU Grenoble, 38043 GRENOBLE, France.
[2] Université Joseph Fourier (UJF), Grenoble 1, France.
[3] INSERM U1036, IRTSV/LAPV, CEA, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 09, France
[4] CNRS FRE3405, équipe « génétique, infertilité et thérapeutique », laboratoire AGIM, université Joseph-Fourier, Grenoble, France.

Transfert d'embryon unique

un challenge actuel

➔ Validation de biomarqueurs
- ✔ + prédictifs
- ✔ non invasifs

Données récentes du laboratoire

J0 : ponction ovarienne — Pool du liquide folliculaire
J1 : pelage des ovocytes — Pool des plots de fécondation
Dosage de PROK1 — *Test ELISA*
PROK1 — biomarqueur de la compétence ovocytaire et de l'implantation embryonnaire

Mécanismes ?

LH/hCG = rôle clé dans l'acquisition de la maturation ovocytaire *(revue : Castillo et al., 2014).*
hCG = régulateur du système PROK1/PROKR dans les trophoblastes *(Brouillet et al., 2012).*

Objectifs

Etudier la localisation du système PROK1/PROKR dans les follicules en développement
Etudier l'effet de l'hCG sur la sécrétion de PROK1 par les cellules folliculaires

Matériel & méthodes

Centre de Médecine de la procréation

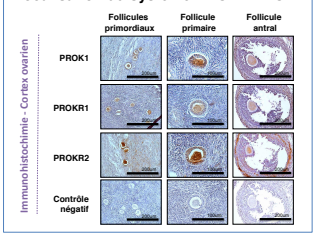
Ovariectomie
1. Trompe de Fallope
2. Pavillon
3. Ovaire
➔ Tissus ovariens ➔ Epithélium de surface, cortex, medulla

Ponction ovocytaire
Etude prospective de cohorte
100 couples *FIV +/- ICSI*
➔ Cellules du cumulus (CCs) / Cellules de la Granulosa (CGs) ➔

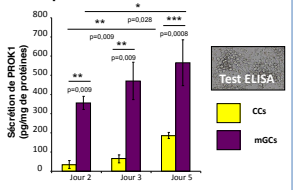
GERMETHÈQUE

Résultats

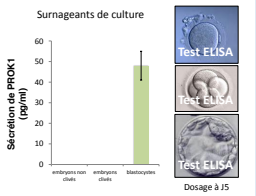
Localisation du système PROK1/PROKR



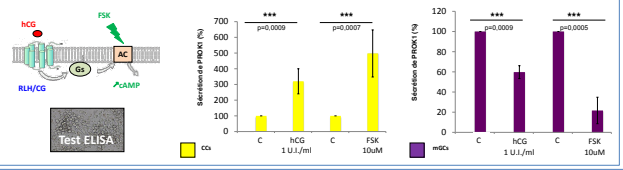
Sécrétion de PROK1 par les cellules folliculaires



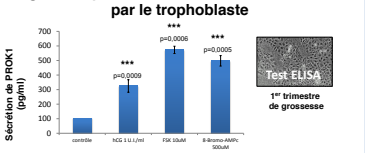
Sécrétion de PROK1 par les embryons



Régulation par l'hCG de la sécrétion de PROK1 par les cellules folliculaires



Régulation par l'hCG de la sécrétion de PROK1 par le trophoblaste



Conclusion

Le **système PROK1/PROKR** est un **nouvel acteur clé de la physiologie ovarienne**, qui est impliqué dans **l'acquisition de la compétence ovocytaire et l'implantation embryonnaire.**

Perspectives

Evaluation de la pertinence clinique du dosage de PROK1 en routine en FIV
= PROK1, bio-marqueur prédictif du potentiel implantatoire de chaque embryon ?

Faculté de Pharmacie,
Université Joseph Fourier Grenoble I.

Serment de Galien

« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

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 l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».