



HAL
open science

Prokinéticine 1 : nouvel acteur de la physiologie ovocytaire humaine

Sami Boulahfa

► **To cite this version:**

Sami Boulahfa. Prokinéticine 1 : nouvel acteur de la physiologie ovocytaire humaine. Sciences pharmaceutiques. 2015. dumas-01871418

HAL Id: dumas-01871418

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01871418v1>

Submitted on 10 Sep 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

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 : NOUVEL ACTEUR DE LA PHYSIOLOGIE
OVOCYTAIRE HUMAINE**

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

DIPLÔME D'ÉTAT

Sami Boulahfa

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE
GRENOBLE

Le : 02/09/2015

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury : M.le Pr Christophe Ribuot

Directrice de thèse : Mme le Dr Sophie Brouillet

Tutrice universitaire : Mme le Dr Anne Briançon-Marjollet

Membres :

Mme le Dr Nadia Alfaidy-Benharouga

Mme le Dr Marie Bidart

Mr le Dr Philippe Harel

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.

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	Benoît	D5	ThEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
PU	BAKRI	Aziz	D5	TIMC-IMAG
MCU	BATANDIER	Cécile	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU-PH	BEDOUCHE	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	Benoît	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 Lantou.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	WOESSIDJEWE	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 : Maitres 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

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Doyen Ribuoit pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse. Je le remercie également pour ses précieux conseils et sa grande disponibilité.

J'exprime ma profonde gratitude au Docteur Sophie Brouillet pour m'avoir encadré durant cette année de recherche, pour ses commentaires avisés, sa patience et son acharnement plus que nécessaire. Sa rigueur et sa persévérance ont été et seront pour moi un modèle à suivre. Je lui souhaite toute la réussite possible dans sa carrière hospitalo-universitaire plus que prometteuse. Je lui présente également toutes mes excuses pour les possibles tournures de phrase emberlificotées qui pourraient subsister dans ce manuscrit.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire BCI (Inserm 1036) du CEA de Grenoble et son directeur le Docteur Feige pour m'avoir accueilli durant ces six mois de stage. Je remercie également le Docteur Alfaidy-Benharouga pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse ainsi que le Docteur Cherradi. Je pense également à Christine et Christine sans qui le laboratoire ne fonctionnerait pas. Je remercie le Docteur Agnès Castan pour son sang froid et ses conseils précieux pour rédiger la partie la plus importante de cette thèse! Je n'oublie pas mes collègues étudiants en M2R Jonathan Laugier et Déborah Reynaud pour avoir partagé avec moi leur expérience et m'avoir remonté le moral après mes premiers Western-blot! Je leur souhaite toute la réussite possible. Je pense également au brillant et futur Docteur Waël Traboulsi ainsi qu'à Josiane Denis pour leur disponibilité et leur gentillesse.

Je remercie le Docteur Philippe Harel pour avoir accepté de participer à mon jury mais également pour sa gentillesse et son soutien. Je le remercie également avec le Docteur Chapot pour m'avoir encadré et appris le métier de pharmacien d'officine durant ces cinq années. Ils m'ont également donné le sens des responsabilités et accordé leur confiance dès mes débuts et je leur en suis profondément reconnaissant. Je remercie aussi les Docteurs Patrick et Yaël Sitbon ainsi que le Docteur Roselyne Pinto-Amzallag pour m'avoir accueilli dans leurs officines à mon arrivée à Paris.

Je remercie tous mes enseignants de l'UFR de pharmacie et de médecine de l'Université Joseph pour les enseignements de qualité qu'ils ont pu me dispenser tout au long de mon parcours universitaire et le Docteur Aldebert pour avoir encadré la filière recherche dans l'UFR de pharmacie. Je pense également aux enseignants et encadrants du Master 2 ReproDev de l'Université Paris Diderot et en particulier à Mme Rouiller-Fabre et les remercie pour cette année riche d'expérience et d'apprentissage.

Je remercie le Professeur Cornet, le Docteur Joyeux-Faure et le Docteur Launois qui m'ont encadré durant mes précédents stages et m'ont formé et donné le goût à la recherche.

Je remercie également Monsieur le Doyen Romanet, le Professeur Vuillez et toute l'équipe de la scolarité de pharmacie du Master 1 ISM et du premier cycle de médecine et surtout Madame Panella, Madame Bert et Monsieur Dutourné pour leur disponibilité, leur accueil, leur gentillesse et également pour avoir supporté avec bienveillance mon cursus pour le moins atypique.

Je remercie aussi le Docteur Chardon-Tourné, le Docteur Sylvoz et le Professeur Guimier, le Docteur Mondet et le Professeur Mossuz, les Professeurs Juvin et Gaudin et le Docteur Baillet, responsables de stage que j'ai pu rencontrer lors de ma cinquième année hospitalo-universitaire pour avoir accepté mes horaires de stage décalés.

Je remercie également toute l'équipe du laboratoire de garde du CHU de Grenoble et en particulier le Docteur Guergour, l'ensemble des internes de biologie médicale, mes anciens collègues externes Ahmed, Maud, Chloé, Clément, Paul, Edouard, Dalila, mes anciens co-externes Flore-Anne et Raphaël et tous les techniciens et particulièrement Camille, Marianne, Julien, Marlène, Nicolas, Célia, et Jules pour toutes ces soirées et ces (longs) dimanches passés ensemble et grâce à qui Synergie n'a plus de secret pour moi!

Je remercie tous les internes de médecine et de pharmacie que j'ai côtoyé durant ces cinq années au CHU de Grenoble pour m'avoir formé à mon futur métier et m'avoir donné le goût à la clinique et à la biologie médicale.

Je remercie le Professeur Grillot et le Professeur Allenet pour leur écoute attentionnée lorsque je les ai rencontrés pour leur confier mon souhait de réintégrer les études de médecine.

Je remercie également le Professeur Saragaglia, les internes d'orthopédie de l'Hôpital Sud, le Docteur Cassez et le Docteur Véran ainsi que les internes de neurologie Pauline et Jérémy pour avoir renforcé mon souhait de devenir clinicien lors de mes stages d'externat de médecine.

Je remercie l'équipe d'Hôpital Service à la Clinique Générale de Savoie et Madame Farida Mohamed et Madame Zoulikha Boumaza de Sodexo Santé pour m'avoir donné l'opportunité de très rapidement côtoyer l'environnement hospitalier. Je remercie par ailleurs toute l'équipe des Urgences et du bloc opératoire de la Clinique des Cèdres avec qui j'ai travaillé durant ces étés passés.

Je remercie également tous mes camarades de promotion de médecine et de pharmacie avec qui j'ai partagé des moments privilégiés, des galas mémorables, quelques TP et TD dont on gardera des bons souvenirs j'en suis sûr. Je leur souhaite à tous une carrière professionnelle riche et épanouie ainsi que tout le bonheur possible.

Je remercie également le Docteur G. sans qui je pense je n'aurai pas accompli tout ce que j'ai fait aujourd'hui. Il m'a fait comprendre que la volonté permettait d'accomplir l'impossible.

Je termine ces remerciements en exprimant ma profonde reconnaissance à mes parents, Tata, toute ma famille dont je ne pourrai citer tous les membres, Grand-Maman, Jeanne-Aimée, Paul et Emilie pour leur écoute permanente, leur soutien, leur aide durant toutes ces années, leur gentillesse et leurs relectures.

A mes parents,
A Tata,
A ma famille,
A Grand-Maman,
A Jeanne-Aimée et ses merveilleux enfants,
A mes amis et Damien en particulier,

A mes Grands-parents que je n'ai pas assez connu,
A Tonton qui nous a quitté trop tôt,
A Lucette J.,

Sommaire

Liste des tableaux et des figures.....	11
Liste des abréviations	12
Lexique.....	14
Introduction	16
Rappels bibliographiques et historiques.....	18
1. La fertilité.....	18
1.1 Définitions.....	18
1.2 La fertilité féminine.....	18
1.2.1 L'ovogenèse.....	18
1.2.2 La folliculogenèse.....	19
1.2.3 La compétence ovocytaire.....	21
1.2.4 Le cycle ovarien.....	22
1.3 La fertilité masculine.....	23
1.3.1 La spermatogenèse.....	23
1.4 La fertilité du couple	24
1.4.1 La fécondation.....	24
1.4.2 L'implantation.....	24
2. L'infertilité	24
2.1 Les différentes causes d'infertilité	26
2.1.1 Infertilité masculine.....	26
2.1.2 Infertilité féminine.....	26
2.1.3 Les autres infertilités.....	28
3. Les options thérapeutiques proposées en AMP.....	28
3.1 L'IUI.....	28
3.2 La FIV et l'ICSI	28
3.2.1 La stimulation.....	30
3.2.2 Ponction ovocytaire.....	33
3.2.3 Recherche ovocytaire, fécondation et culture embryonnaire.....	35
3.2.4 Le choix de l'embryon à réimplanter.....	35
4. La famille des prokinétines	37
4.1 Rôle de PROK1 dans la fertilité féminine.....	38
4.2 PROK1/PROKR et réceptivité endométriale	38
4.3 Rôle de PROK1 dans la placentation	38
4.4 PROK1 et l'implantation.....	39
4.5 PROK1, biomarqueur de l'implantation embryonnaire en FIV ?	39
Matériels et Méthodes	41
1. Patients et échantillons	41

1.1 Ponction des follicules	41
1.2 Récolte des CCO	42
1.3 Collecte des liquides folliculaires	42
1.4 Recueil et préparation du sperme	42
1.5 Mise en fécondation des gamètes	43
1.6 Evaluation de la fécondation et mise en culture des embryons.....	43
1.7 Evaluation du potentiel implantatoire des embryons	43
2. Cultures primaires des cellules du cumulus	45
2.1 Mise en culture	45
2.2 Traitement des cellules du cumulus	45
2.3 Collecte des surnageants	45
2.4 Extraction des protéines	46
2.5 Détermination de la concentration en protéines totales des extraits protéiques.....	46
2.6 Western Blot.....	46
2.7 Extraction des ARN	48
2.8 Reverse Transcription (RT).....	48
2.9 PCR quantitative	48
2.10 Dosage de PROK1 par test ELISA	48
3. Statistiques	50
Résultats	52
1. Validation de méthode : étude du volume en fonction de la taille folliculaire	52
2. Etude des variations de concentration intrafolliculaire de PROK1.....	52
3. Expression de PROK1 en fonction de la taille folliculaire	54
4. Expression de PROK1 en fonction du statut folliculaire	56
5. Expression de PROK1 en fonction du devenir embryonnaire	58
6. Expression de PROK1 en fonction de l'issue du transfert embryonnaire.....	60
7. Régulation de l'expression de PROK1 par la FSH	62
7.1 Régulation de l'expression et de la sécrétion de PROK1 par la FSH	62
7.2 Régulation de l'expression en ARNm de PROK1 par la FSH.....	62
8. Régulation de l'expression de PROK1 par l'hCG	62
9. Régulation de l'expression de PROK1 par la FSK	64
10. Régulation de l'expression des récepteurs PROKR1/PROKR2 par la FSH.....	64
11. Régulation de l'expression des récepteurs PROKR1/PROKR2 par l'hCG	64
Discussion	65
Bibliographie.....	72
Conclusion.....	71
Bibliographie.....	72

Liste des tableaux et des figures

Figure 1 : L'ovogenèse	page 17
Figure 2 : Coupe histologique d'un follicule de De Graaf	page 20
Figure 3 : Communications étroites entre les cellules du cumulus et l'ovocyte	page 20
Figure 4: Principales causes d'infertilité féminine selon leur localisation anatomique	page 25
Figure 5 : Déroulement de la FIV	page 27
Figure 6 : L'axe hypothalamo-hypophysaire gonadotrope féminin	page 29
Figure 7 : Embryons de qualité différente	page 34
Figure 8 : Représentation du développement embryonnaire in vitro	page 44
Figure 9 : Volume en fonction de la taille du follicule	page 51
Figure 10 : Variations intra et interindividuelles des concentrations folliculaires en PROK1	page 51
Figure 11 : Concentration de la protéine PROK1 dans le liquide de chaque follicule en fonction de la taille des follicules	page 53
Figure 12 : Niveau d'expression de la protéine PROK1 dans le liquide de ponction en fonction de la taille des follicules	page 53
Figure 13: Concentration de la protéine PROK1 dans le liquide de chaque follicule en fonction du statut folliculaire	page 55
Figure 14 : Niveau d'expression de la protéine PROK1 dans le liquide de chaque follicule en fonction du statut folliculaire	page 55
Figure 15 : Concentration de la protéine PROK1 (en pg/ml) dans le liquide de chaque follicule en fonction du devenir embryonnaire	page 57
Figure 16 : Niveau d'expression de la protéine PROK1 (en %) dans le liquide de chaque follicule en fonction du devenir embryonnaire	page 57
Figure 17 : Concentration de la protéine PROK1 (en pg/ml) dans le liquide folliculaire des embryons sélectionnés pour un transfert frais en fonction de l'issue du transfert	page 59
Figure 18 : Niveau d'expression de la protéine PROK1 dans le liquide folliculaire des embryons sélectionnés pour un transfert frais en fonction de l'issue du transfert	page 59
Figure 19 : Taux de la protéine PROK1 dans le liquide folliculaire des embryons sélectionnés pour un transfert frais en fonction de l'issue du transfert	page 59
Figure 20 : Niveau d'expression de la protéine PROK1 dans des cultures de cellules du cumulus en réponse à la FSH	page 61
Figure 21: Niveau d'expression du gène de PROK1 rapporté à la GAPDH dans des cultures de cellules du cumulus en réponse à la FSH	page 61
Figure 22 : Niveau d'expression de la protéine PROK1 dans des cultures de cellules du cumulus en réponse à l'hCG	page 61
Figure 23 : Niveau d'expression de la protéine PROK1 dans des cultures de cellules du cumulus en réponse à la FSK	page 63
Figure 24 : Niveau d'expression des protéines PROKR1 et PROKR2 dans des cellules du cumulus en réponse à la FSH	page 63
Figure 25 : Niveau d'expression des protéines PROKR1 et PROKR2 dans des cellules du cumulus en réponse à l'hCG	page 63
Figure 26 : Les différentes étapes de la synthèse protéique	page 68
Tableau I : Liste des gonadotrophines utilisées dans le cadre de FIV	page 31
Tableau II : Caractéristiques des PROKs/PROKRs	page 36
Tableau III: Amorces utilisées pour la PCR quantitative	page 47

Liste des abréviations

AA : Acide Aminé

ABTS: 2,2'-Azinobis [3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt

Ac : Anticorps

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

AMH : Hormone Anti Müllérienne

AMP : Assistance Médicale à la Procréation

ANOVA : ANALyses Of VARIance

ARN : Acide Ribo Nucléique

BSA : Bovine Serum Albumine

CC : Cellules du Cumulus

CEA : Commissariat à l'Énergie Atomique

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

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNase : Désoxyribo Nucléase

E2 : 17 bêta oestradiol

ECL : Enhanced ChemiLuminescent

EG-VEGF : Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FIV : Fécondation *in vitro*

FSH : Follicle Stimulating Hormone

FSK: Forskoline

G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone

hCG : human Chorionic Gonadotrophin

ICSI : IntraCytoplasmic Sperm Injection

IUI : Insémination Intra Utérine

INSEE : Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques

kDa : kilo Dalton

LH : Luteinizing Hormone

mm : millimètre

PBS : Phosphate Buffered Saline

PIF : PreImplantation Factor

PROK : Prokinéticine

PROKR : Récepteur des prokinéticines

qPCR : quantitative Polymérase Chain Reaction

RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G

RIPA : Radio ImmunoPrecipitation Assay

rpm : rotations par minute

SDS-PAGE : Sodium dodécyl sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis

SOPK : Syndrome des Ovaires Polykystiques

TBS : Tris Buffered Saline

U.I. : Unité Internationale

Lexique

Adénohypophyse : Partie antérieure de l'hypophyse destinée à la régulation de nombreuses glandes endocrines.

Anamnèse : Ensemble des renseignements fournis au médecin par le malade ou son entourage sur l'histoire d'une maladie ou les circonstances qui l'ont précédée.

Anovulation : Absence d'ovulation, c'est-à-dire du gamète femelle.

Atrésie : Diminution physiologique du nombre d'ovocytes

Capacitat : Préparation biologique composée de milieu de culture et de spermatozoïdes sélectionnés sur leur forme et leur mobilité

Capacitation : Acquisition par le spermatozoïde de son pouvoir fécondant sous l'influence des voies génitales masculines puis féminines.

Coelioscopie : Visualisation directe de la cavité abdominale préalablement distendue et des organes qui s'y trouvent au moyen d'un endoscope. Elle permet la chirurgie à ventre fermé.

Corona radiata : Partie du cumulus qui entoure l'ovocyte et l'accompagne lorsqu'il est expulsé du follicule.

Critères morphocinétiques : Critères comprenant les caractéristiques morphologiques et la vitesse de développement embryonnaire et permettant d'évaluer la qualité de l'embryon.

Cumulus : Amas de cellules folliculaires qui portent l'ovocyte au sein de la cavité antrale du follicule.

Diapause : Période de vie ralentie caractérisée par un arrêt de développement à un stade précis et une réduction de son métabolisme.

Dictyé : Autre dénomination du noyau au stade vésicule germinative.

Dysovulation : Trouble de l'ovulation secondaire à une anomalie de la fonction gonadotrope.

Etiologie : Etude des causes des maladies.

Fibronectine : Glycoprotéine de haut poids moléculaire ayant un rôle dans la prolifération et la migration cellulaire.

Folliculogenèse : Maturation du follicule ovarien au cours du cycle menstruel

Glaire cervicale : Produit de la sécrétion des glandes cervicales dont l'aspect et la constitution varient au cours du cycle menstruel.

Granulosa : Couche de cellules tapissant la cavité du follicule de De Graaf.

Hydrosalpinx : Collection séreuse enkystée dans la lumière d'une trompe utérine.

Hystérocopie : Examen visant à explorer la cavité utérine et ses annexes et qui consiste à introduire un hystéroscope à travers le col utérin.

Hystérosalpingographie : Radiographie de l'utérus et des trompes dont la cavité est opacifiée par l'injection d'un produit de contraste iodé dans la cavité utérine.

Interleukine : Protéine ayant le rôle de médiateur soluble et produite par des leucocytes et agissant sur d'autres leucocytes.

Laminine : Glycoprotéine présente dans les lames basales des matrices extracellulaires.

Lutéinisation : Transformation du follicule de De Graaf et des cellules qui le comprennent en corps jaune cyclique après l'ovulation.

Lysosome : Organite intracellulaire limité par des membranes et renfermant des enzymes hydrolytiques.

Ménopause : Période de la vie de la femme correspondant à l'arrêt de la menstruation.

Myomètre : Muscle utérin.

Oligospermie : Etat correspondant à la présence d'un nombre insuffisant de spermatozoïdes dans un éjaculat.

Ovogenèse : Ensemble des étapes aboutissant à la formation d'un ovocyte apte à être fécondé.

Salpingite : Inflammation d'une trompe de Fallope.

Testostérone : Hormone stéroïde mâle sécrétée par les cellules interstitielles folliculaires chez l'homme.

Thèque : Couche de tissu conjonctif entourant le follicule ovarien.

Transvaginale, voie : Voie d'abord traversant la paroi vaginale.

Zone pellucide : Enveloppe glycoprotéique entourant l'ovocyte.

Introduction

La fertilité, ou aptitude à se reproduire, est depuis l'aube des temps une préoccupation de l'homme. L'infertilité touche environ un couple sur six dans le monde, soit plus de 80 millions de couples au total (1).

Depuis 1978, la fécondation in vitro (FIV) a révolutionné la prise en charge de l'infertilité en permettant la naissance de plus de 5 millions d'enfants à l'échelle mondiale (2). Malgré de nombreuses avancées, la FIV est vécue comme une épreuve par les couples qui se confrontent au succès limité de cette technique. En effet, plus de trente ans après la première naissance par FIV, on ne sait toujours pas évaluer de manière fiable la qualité des ovocytes, et prédire l'évolution et l'implantation des embryons dans la cavité utérine. La validation de nouveaux biomarqueurs du potentiel implantatoire de chaque embryon est donc devenue un enjeu majeur en FIV, afin de pouvoir augmenter les taux de grossesse, tout en diminuant le taux de grossesses multiples et de fausses couches.

La capacité d'un embryon à s'implanter étant majoritairement déterminée par la qualité de l'ovocyte, l'amélioration des connaissances sur les mécanismes participant à la maturation folliculaire pourrait permettre d'identifier de nouveaux candidats. Parmi ceux-ci, la prokinéticine 1 (PROK1) semble prometteuse pour son expression importante dans l'ovaire et ses caractéristiques biologiques en lien direct avec l'implantation embryonnaire, en particulier pour son rôle dans le développement placentaire et la réceptivité endométriale (3).

Face à l'absence de données sur l'expression de PROK1 au cours de la folliculogénèse, l'objectif de ma thèse a été d'approfondir les connaissances du système PROK1/PROKRs dans l'acquisition de la compétence ovocytaire. Pour cela, j'ai étudié les niveaux d'expression de ce facteur dans le microenvironnement ovocytaire au cours de la folliculogénèse et caractérisé les régulations hormonales de PROK1 et de ses récepteurs par deux hormones clés de la maturation ovocytaire, la FSH et l'hCG.

Ce travail participe à l'amélioration de la compréhension de la complexité des mécanismes de régulations du dialogue follicule/ovocyte encore largement incompris à ce jour, et engageant à approfondir les recherches sur l'utilisation de PROK1 dans l'identification des embryons à fort potentiel implantatoire en FIV.

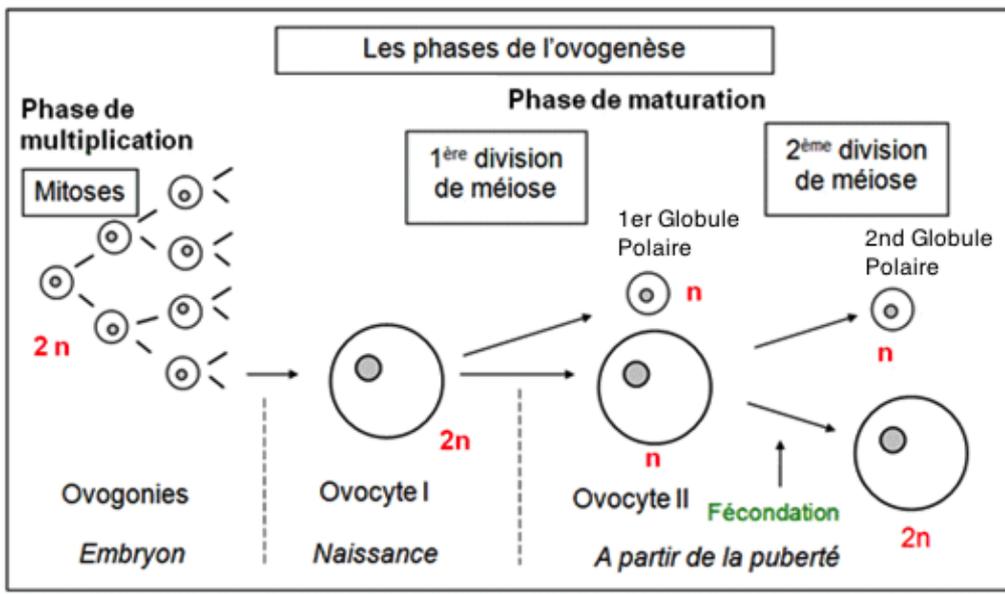


Figure 1 : L'ovogenèse (d'après Georges Dolisi, modifié)

Rappels bibliographiques et historiques

1. La fertilité

1.1 Définitions

La fertilité, ou aptitude à se reproduire, est depuis l'aube des temps une préoccupation de l'homme. Les actes de vénération des déesses de la fertilité Déméter de la Grèce antique et Diane chez les Romains, pour les plus connues, en témoignaient déjà à l'époque (4).

Plusieurs paramètres permettent de l'évaluer. Le taux de fécondité à un âge donné est « le nombre d'enfants nés vivants des femmes de cet âge au cours de l'année, rapporté à la population moyenne de l'année des femmes de même âge » (5). En France, il est de 12,3 enfants pour 100 femmes ayant entre 25 et 29 ans en 2014 (6). La fécondabilité est quant à elle la probabilité mensuelle d'obtenir une grossesse. Elle est chez les femmes de 25% à 25 ans. A 35 ans, elle n'est plus que de 12% et de seulement 6% à 45 ans (7). L'âge est donc un facteur critique qui conditionne l'état de fertilité d'un individu (8).

1.2 La fertilité féminine

1.2.1 L'ovogenèse

L'ovogenèse est le processus qui permet la différenciation des cellules germinales femelles en gamète femelle fécondable : l'ovocyte (9). C'est un processus discontinu qui s'étend de la vie fœtale jusqu'à la ménopause, et qui comporte trois phases : une phase de multiplication, une phase de maturation nucléaire incomplète et une phase de maturation cytoplasmique (Figure 1).- Phase de multiplication :

L'ovogenèse débute dès la 3^{ème} semaine de vie fœtale par une étape de multiplication intensive des gonocytes, qui se différencieront en ovogonies puis en ovocytes I (10) jusqu'à 7 mois de vie intra-utérine. Le stock maximal atteint alors environ 7 millions d'ovocytes I (10).

- Phase de maturation nucléaire :

Durant l'ovogenèse, la méiose comporte 3 particularités : un premier blocage en prophase I, un deuxième blocage en métaphase II, et une inégalité cytoplasmique dans les divisions de méiose (11). Les ovocytes I entament leur 1^{ère} division de méiose dès leur formation, et vont

rester bloqués en prophase I de méiose au stade diplotène, avec un noyau typique appelé « noyau dictyé * » ou « vésicule germinative » (11). Cette phase de blocage dure jusqu'à la reprise de la deuxième division de méiose au moment de l'ovulation, où l'ovocyte II reste alors bloqué en métaphase II jusqu'à la fécondation (11). Au cours de la méiose, la répartition du cytoplasme est inégale. L'ovocyte conserve la quasi-totalité du cytoplasme, contrairement aux globules polaires. Tout au long de ces étapes, un large phénomène d'atrésie* diminuera le stock initial d'ovocytes I à 700 000 à la naissance, puis à 400 000 à l'entrée en puberté, jusqu'à l'épuisement des réserves lors de la ménopause* (11).

- Phase de maturation cytoplasmique :

Cette phase comporte une étape de synthèse d'ARN pendant la prophase de la première division de méiose, une étape de traduction de ces ARN qui a lieu essentiellement dans l'ovocyte I, et une étape de mise en réserve des ARN (12). Ces étapes sont indispensables à l'acquisition de la maturité ovocytaire qui rend l'ovocyte compétent à reprendre la méiose, à devenir fécondable, puis à donner un embryon apte au développement et à l'implantation.

1.2.2 La folliculogénèse

Au cours de la phase de maturation, la croissance de l'ovocyte dépend de cellules somatiques au sein d'une structure complexe : le follicule ovarien. La folliculogénèse est l'ensemble des processus par lesquels un follicule primordial se développe pour atteindre l'ovulation, ce qui concerne moins de 0.1% des follicules, ou régresse par apoptose pour 99.9% d'entre eux. Contrairement à l'ovogénèse, c'est un processus continu de la puberté à la ménopause (11). Le premier stade de développement est le follicule primordial. L'ovocyte I est alors entouré d'une seule couche de cellules folliculaires aplaties dites endothéliformes,

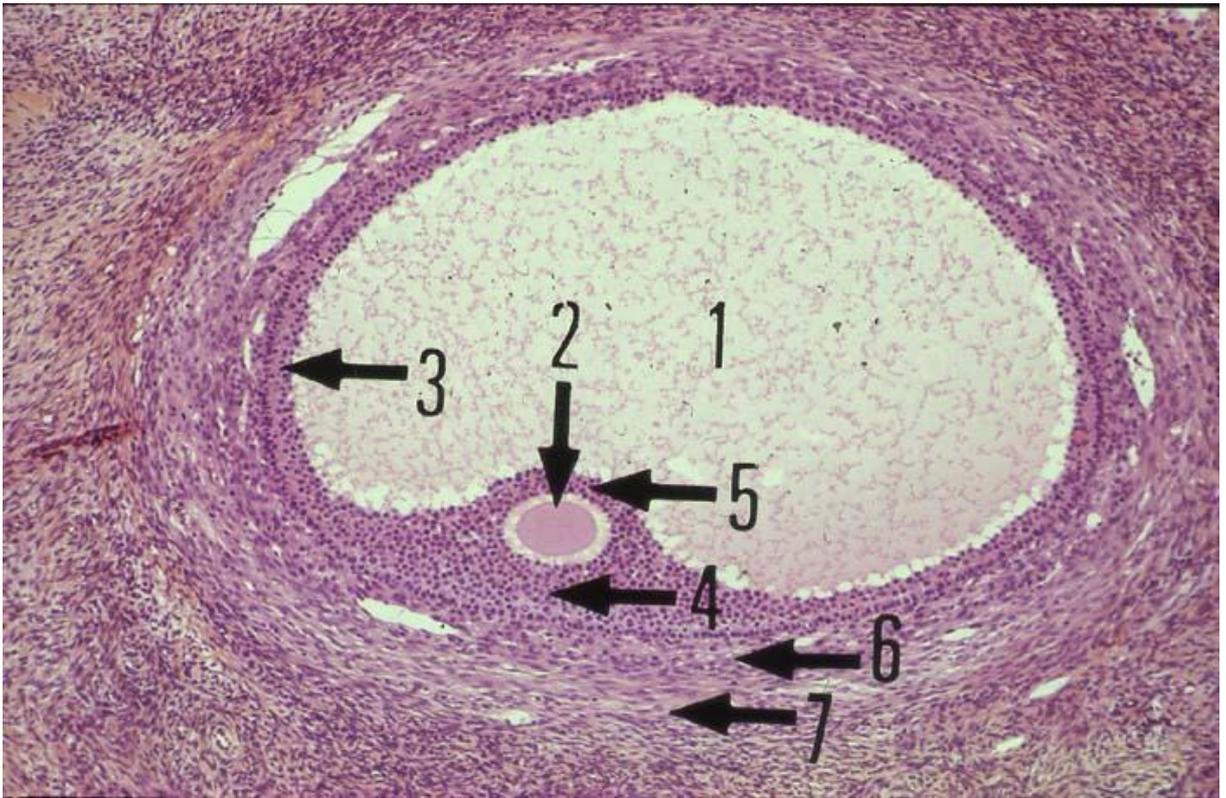


Figure 2 : Coupe histologique d'un follicule de De Graaf (de webapps.fundp.ac.be)

1 : antrum, 2 : ovocyte I, 3 : cellules de la granulosa, 4 : cellules du cumulus, 5 : corona radiata, 6 :
thèque interne, 7 : thèque externe

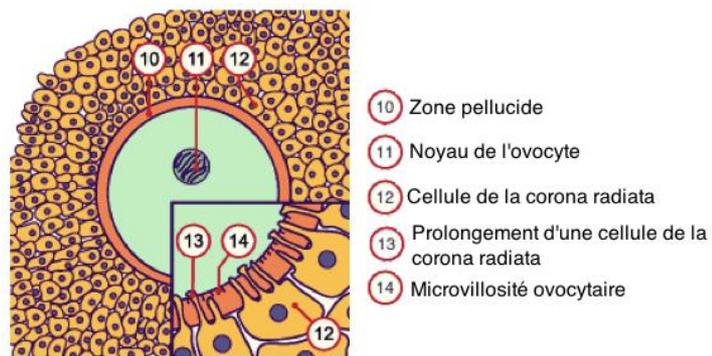


Figure 3 : Communications étroites entre les cellules du cumulus et l'ovocyte
(d'après embryology.ch, modifié)

séparée du stroma ovarien par une membrane basale, la membrane de Slavjanski (11). Les follicules primordiaux représentent la majorité des follicules dans l'ovaire. L'épithélium folliculaire qui entoure l'ovocyte devient par la suite cubique, c'est le follicule primaire. Ces cellules s'organisent ensuite en plusieurs couches et forment la granulosa* : c'est le follicule secondaire (11). Une couche de glycoprotéines, la zone pellucide*, apparaît alors entre l'ovocyte et l'épithélium du follicule secondaire. Des prolongements cytoplasmiques des cellules de la granulosa traversent la zone pellucide pour assurer la croissance de l'ovocyte. Les cellules de la thèque* se forment autour de la membrane de Slavjanski. Le stade suivant est celui du follicule tertiaire, qui se caractérise par l'apparition d'une cavité, appelée antrum. Cette cavité est remplie de liquide issu de la sécrétion des cellules folliculaires et de sérum issu des vaisseaux sanguins avoisinant lors du stade du follicule antral (11). Les cellules folliculaires avoisinant l'ovocyte se sont différenciées en cellules du cumulus*, tandis que celles en contact direct avec celui-ci sont devenues les cellules de la corona radiata*, aboutissant ainsi à la formation du complexe cumulo-ovocytaire (CCO, ou cumulus oophorus) qui fait alors saillie dans l'antrum (figure 2). Ce complexe favorise la création d'interactions étroites entre l'ovocyte et les cellules du cumulus, notamment par le biais de prolongements cytoplasmiques, de jonctions communicantes et de signaux paracrines tels que l'interaction de Kit-ligand avec son récepteur (13) (figure 3). Ces échanges sont indispensables à la maturation de l'ovocyte (14). Le tissu conjonctif autour du follicule s'est différencié en une thèque interne vascularisée avec de grandes cellules riches en lipides, sécrétant des androgènes, et en une thèque externe qui contient les grands vaisseaux. La dernière étape est celle du follicule pré-ovulatoire ou follicule de De Graaf. Chez la femme, il faut 85 jours pour passer du stade de follicule primordial au stade de follicule de De Graaf.

1.2.3 La compétence ovocytaire

Au cours de l'ovogenèse et de la folliculogenèse, l'ovocyte acquiert la compétence à reprendre la méiose, à devenir fécondable, puis à donner un embryon apte au développement et à l'implantation : c'est la compétence ovocytaire (15,16). Cette étape est acquise lors la maturation nucléaire et cytoplasmique de l'ovocyte grâce à des interactions étroites avec les cellules folliculaires. A ce jour, les différentes étapes nécessaires à l'acquisition de la compétence ovocytaire sont encore largement incomprises. De ce fait, l'implantation

embryonnaire est considérée comme le paramètre le plus fiable pour apprécier la compétence de l'ovocyte (16)

1.2.4 Le cycle ovarien

Le cycle ovarien comporte trois phases : la phase folliculaire, l'ovulation et la phase lutéale. (17).

- La phase folliculaire s'étend du 1^{er} jour des règles jusqu'à l'ovulation, qui a lieu théoriquement le 14^{ème} jour du cycle (18). Néanmoins, la durée de cette phase peut considérablement varier d'une femme à l'autre. La croissance folliculaire dépend de quatre phases: le recrutement (ou initiation), la croissance basale, la sélection et la dominance (19). Lors des étapes de recrutement et de croissance basale, le follicule primordial quiescent reprend son développement pour évoluer en quelques mois vers un follicule secondaire, puis vers le stade pré-antral vascularisé. Les régulations autocrine et paracrine de ces étapes sont indépendantes des gonadotrophines (sous le rôle des facteurs FGF, TNF, C-kit-KL entre autres), et encore largement méconnues à ce jour (18). En revanche, la sélection et la dominance sont des étapes dépendantes des gonadotrophines (18). Lors de la sélection, une dizaine de follicules pré-antraux vont augmenter de taille sous l'influence de la FSH, et sécréter des androgènes sous l'effet de la LH par les cellules de la thèque (19). Ces androgènes vont ensuite diffuser dans les cellules de la granulosa où ils seront convertis en œstrogènes par une aromatasase. La croissance de ces follicules est donc associée à une sécrétion d'œstrogènes, dont le taux va augmenter dès le 5^{ème} jour du cycle, et qui entraîne une diminution de sécrétion de la FSH par l'hypophyse par un mécanisme de rétrocontrôle négatif (18). Cette baisse du taux de FSH dans le sang sera responsable de l'atresie de la plupart des follicules. En général, un unique follicule (le plus sensible à la FSH) va poursuivre sa croissance : c'est la dominance (18). Ce follicule évoluera jusqu'au stade de follicule de De Graaf. Sous l'influence des œstrogènes, l'endomètre qui avait été éliminé lors des règles, commence à se régénérer : c'est la phase proliférative (19).

- L'ovulation correspond à une période d'environ 48 heures qui se caractérise par l'expulsion de l'ovocyte mature par l'ovaire. Lorsque le taux d'œstrogène atteint un seuil de 300 à 350 pg/ml, il déclenche la sécrétion du pic de LH par l'hypophyse, qui entraîne alors l'ovulation en moyenne 36 à 48h après le début de ce pic (19).

- La phase lutéale s'étend de l'ovulation à l'arrivée des règles, et dure en général environ 14 jours. Suite à l'expulsion du complexe cumulo-ovocyttaire hors du follicule de De Graaf, celui-ci va se transformer en corps jaune, sécrétant principalement de la progestérone

et un peu d'œstrogènes (19). La sécrétion de progestérone atteindra un pic maximal aux alentours du 9^{ème} jour post-ovulatoire. Sous l'action de la progestérone, la paroi de l'endomètre s'épaissit et se vascularise : c'est la phase sécrétoire. En l'absence de fécondation et nidation, le corps jaune va régresser puis se transformer en corps blanc. L'endomètre sera éliminée en fin de cycle : ce sont les menstruations (19).

1.3 La fertilité masculine

Contrairement à la fertilité féminine, la fertilité masculine s'exprime par un phénomène continu de la puberté à la mort, la spermatogenèse. Elle correspond à la transformation en plusieurs étapes des cellules souches, les spermatogonies, en spermatozoïdes. Elle a lieu au sein des testicules et dure environ 74 jours (20).

1.3.1 La spermatogenèse

La spermatogenèse suit les étapes de division méiotique et se fait de manière centripète dans la lumière des tubes séminifères testiculaires. Les cellules souches masculines sont les spermatogonies. Il en existe deux types : A et B (20). Les premières servent de pool de réserve et les secondes évoluent en spermatocytes I. Ces dernières subissent la méiose I jusqu'au stade diplotène de prophase I. Le stade suivant est celui de la fin de la méiose I, les cellules correspondantes sont les spermatocytes II (20). A la fin de la méiose II, on obtient des spermatides. Les cellules de Sertoli, cellules somatiques du tube séminifère, servent de soutien aux cellules gonadiques et sont nécessaires à la spermatogenèse (21). Les cellules de Leydig, sous l'influence de la LH, sécrètent la testostérone*, hormone masculine qui permet entre autres la maturation des spermatozoïdes (22).

La spermiogenèse est l'étape finale de la spermatogenèse. Elle consiste en l'évolution morphologique de la spermatide en spermatozoïde et intègre la modification des organites intracellulaires et de la condensation du matériel génétique (23). Les spermatozoïdes rejoignent alors la lumière du tube séminifère et se dirigent vers l'épididyme où ils seront stockés et où ils achèveront leur maturation. Le spermatozoïde acquiert son pouvoir fécondant dans l'épididyme. Le spermatozoïde possède alors une mobilité fléchante et une capacité de fixation à la zone pellucide (24). La capacitation* du spermatozoïde a physiologiquement lieu dans les voies génitales féminines au contact de la glaire cervicale (25). Cette étape de capacitation est reproductible *in vitro* (26) en déposant une fraction de sperme sur un gradient de densité, puis en centrifugeant et en récupérant le culot. Ceci permet de séparer le liquide

séminal des spermatozoïdes et de récupérer les spermatozoïdes les plus mobiles et les plus morphologiquement typiques.

1.4 La fertilité du couple

1.4.1 La fécondation

Lors d'un rapport sexuel fécondant, les spermatozoïdes transitent par le canal déférent puis l'urètre, et sont finalement éjaculés dans le vagin. Ils sont ensuite capotés lors de leur passage dans la glaire cervicale*. Après avoir remonté le tractus génital féminin, la fécondation a alors lieu dans le 1/3 externe de la trompe par un seul spermatozoïde qui doit traverser la couche de cellules du cumulus et la zone pellucide avant de pouvoir atteindre l'ovocyte (27).

1.4.2 L'implantation

Le développement précoce embryonnaire se fait au sein de la trompe de Fallope. L'embryon se dirige progressivement vers la cavité utérine où il s'implantera au stade blastocyste à 6-7 jours de développement embryonnaire (28). L'implantation embryonnaire se fait en plusieurs étapes (apposition, adhésion, et invasion) et met en jeu l'apparition de protrusions cytoplasmiques endométriales appelées pinopodes jusqu'à son enfouissement complet dans la muqueuse endométriale à 9 jours de développement embryonnaire (29).

La réceptivité de l'endomètre est essentielle afin de permettre l'implantation de l'embryon (30). Le seul moment durant lequel la nidation est possible est la fenêtre implantatoire. Elle dure environ 4 jours, du 20^e au 23^e jour du cycle, sous la dépendance de la sécrétion de progestérone (31). C'est une période durant laquelle une prolifération endothéliale du tissu endométrial et une modification des cellules épithéliales de l'endomètre permettent l'implantation optimale de l'embryon (32).

2. L'infertilité

L'infertilité touche environ un couple sur six dans le monde, soit plus de 80 millions au total (1). Elle est définie par l'OMS comme l'incapacité d'un couple à procréer ou à mener une grossesse à terme au bout d'une année ou plus de rapports sexuels réguliers non protégés. Cette pathologie intègre une dimension physique, psychologique et sociale (33). Elle peut concerner le couple ou seulement un de ses membres. On parle d'infertilité primaire si aucun enfant n'a été conçu et d'infertilité secondaire si un enfant est déjà né. Les recours aux

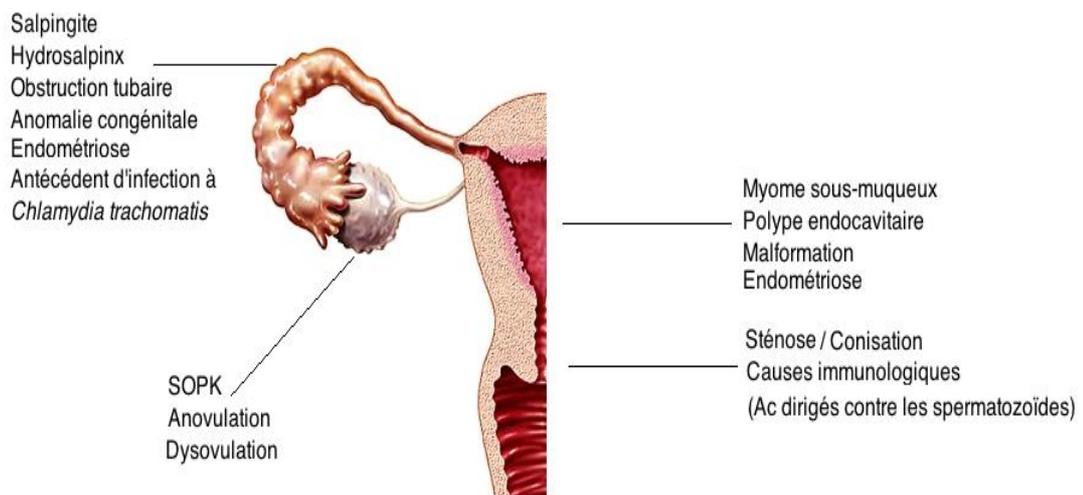


Figure 4: Principales causes d'infertilité féminine selon leur localisation anatomique (à partir d'une illustration Larousse.fr)

techniques d'assistance à la procréation sont de plus en plus nombreux avec une augmentation du nombre de FIV de 16% entre 2008 et 2011 (34) et **60000** tentatives enregistrées en 2012 (34). Les dépenses liées à l'AMP sont intégralement prises en charge par les organismes de sécurité sociale obligatoire dans la limite de 6 inséminations et de 4 tentatives de FIV avec transfert embryonnaire, à condition que la patiente ait moins de 43 ans (35). Lors d'une grossesse clinique, les compteurs sont remis à zéro (35). Le coût total d'une insémination s'élève à environ 1000€ alors qu'une FIV coûte entre 4000 et 4600€ si elle est assistée par micro-injection. Ces montants incluent les traitements médicaux, les actes infirmiers, biologiques et radiologiques, l'hospitalisation avec la ponction et le transfert. Les arrêts de travail ne sont par contre pas comptabilisés dans ces sommes et doivent s'y ajouter. Ainsi, les coûts engendrés font de la fécondation *in vitro* un problème de santé publique majeur.

La détermination de l'étiologie* est indispensable pour permettre une prise en charge adaptée et efficace. Elle repose principalement sur l'interrogatoire clinique, étape critique de l'examen clinique où le clinicien interroge le couple sur le motif de la consultation, l'anamnèse*, les antécédents personnels et familiaux des 2 membres du couple, les éventuels traitements en cours et son mode de vie. On évalue la part d'infertilité d'origine masculine à 20%, féminine à 38%, et mixte à 27%. L'origine reste indéterminée dans 10% des cas (36).

2.1 Les différentes causes d'infertilité

2.1.1 Infertilité masculine

L'OMS définit des normes pour qualifier un sperme de bonne qualité qui intègrent à la fois la numération des spermatozoïdes, leur mobilité et la proportion de formes typiques.

Les causes d'infertilité masculine comprennent les causes obstructives, ayant pour conséquence une anomalie d'excrétion des spermatozoïdes et les causes non-obstructives avec une anomalie dans la production des spermatozoïdes (quantitative et/ou qualitative) (37).

2.1.2 Infertilité féminine

Les causes féminines sont nombreuses et peuvent être liées à un problème d'ovulation comme l'anovulation* ou la dysovulation* pouvant être par exemple causé par le syndrome des ovaires polykystiques* (SOPK). Elles peuvent être également expliquées par une anomalie tubaire obstructive (salpingite*, hydrosalpinx*, obstruction tubaire) ou fonctionnelle (endométriose), un défaut d'implantation par atteinte endométriale, ou un problème cervical (figure 4). Elles peuvent être explorées et/ou traitées pour la plupart par coelioscopie*,

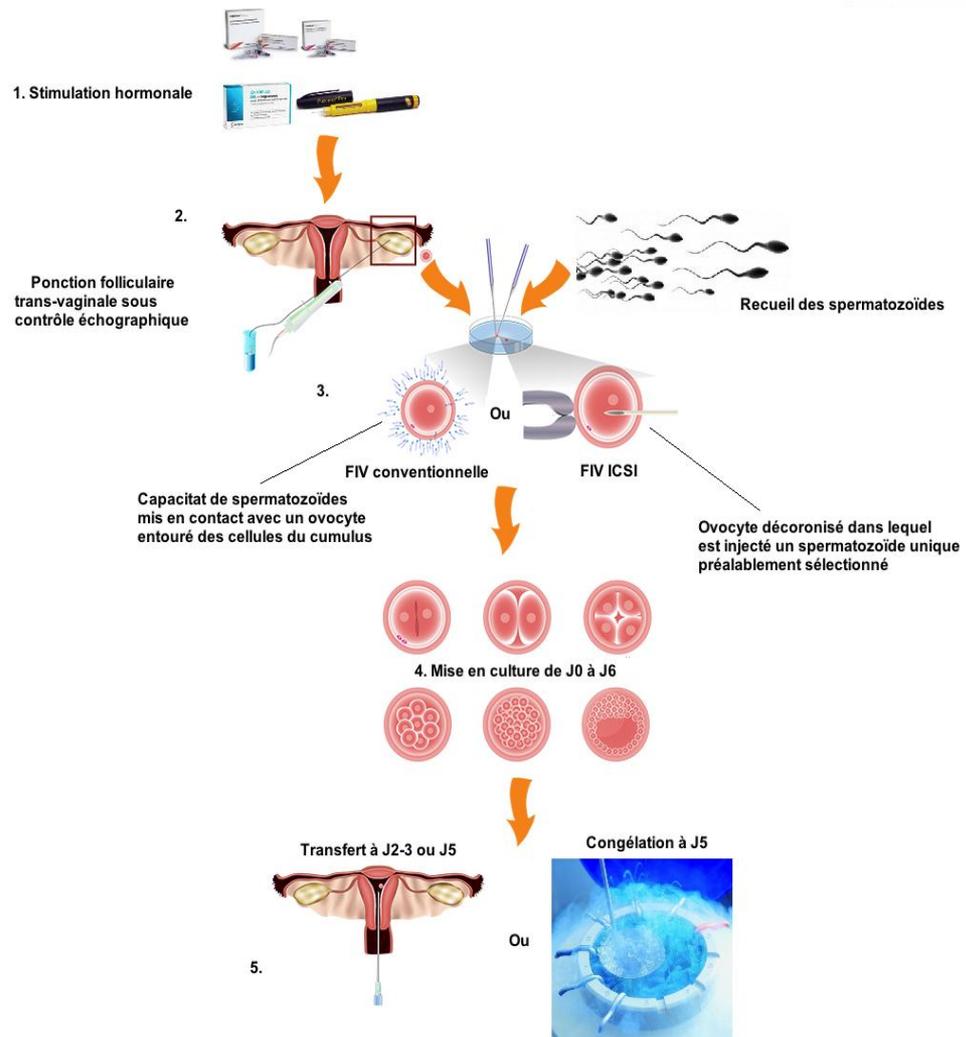


Figure 5 : Déroulement de la FIV (modifié d'après fotolia.com)

hystérocopie* ou hystérosalpingographie*. Lors de la prise en charge des patientes, le statut ovarien est évalué par des dosages hormonaux, une surveillance de l'ovulation et le compte des follicules antraux par échographie au troisième jour du cycle.

2.1.3 Les autres infertilités

Dans certains cas, l'origine de l'infertilité est à la fois féminine et masculine, on parle d'infertilité mixte. Parfois, on ne peut pas mettre clairement en évidence l'origine de l'infertilité, on parle d'infertilité idiopathique.

3. Les options thérapeutiques proposées en AMP

La prise en charge des couples infertiles en AMP est soumise à des critères légaux spécifiques à chaque pays. En France, une prise en charge est proposée pour les couples infertiles hétérosexuels « stables », dont les deux membres sont vivants. La stabilité du couple est une notion subjective, il est donc communément admis que le couple doit vivre ensemble depuis au moins deux ans ou être marié/PACsé (38). Différentes options peuvent être proposées en fonction de l'infertilité.

3.1 L'IIU

L'Insémination Intra-Utérine (IIU) est proposée dans le cadre d'une infertilité d'origine cervicale pure, ou lorsque qu'aucune étiologie n'a pu être identifiée (39). Elle consiste en l'injection de spermatozoïdes capotés dans la cavité utérine par un petit cathéter.

3.2 La FIV et l'ICSI

La fécondation *in vitro* (FIV) est proposée dans le cadre d'une infertilité d'origine féminine (anomalies des trompes) et/ou d'origine masculine (anomalies quantitatives ou qualitatives des spermatozoïdes) (figure 5). C'est la technique d'AMP la plus utilisée. On dénombre environ 60 000 tentatives par an (40). On distingue deux modalités de mise en fécondation des gamètes selon la cause de l'infertilité : la FIV conventionnelle et la FIV assistée par ICSI (Injection Intra-Cytoplasmique de Spermatozoïde) (figure 5).

La FIV conventionnelle consiste à mettre en contact des ovocytes et des spermatozoïdes dans une boîte de culture *in vitro*. La fécondation a lieu spontanément en

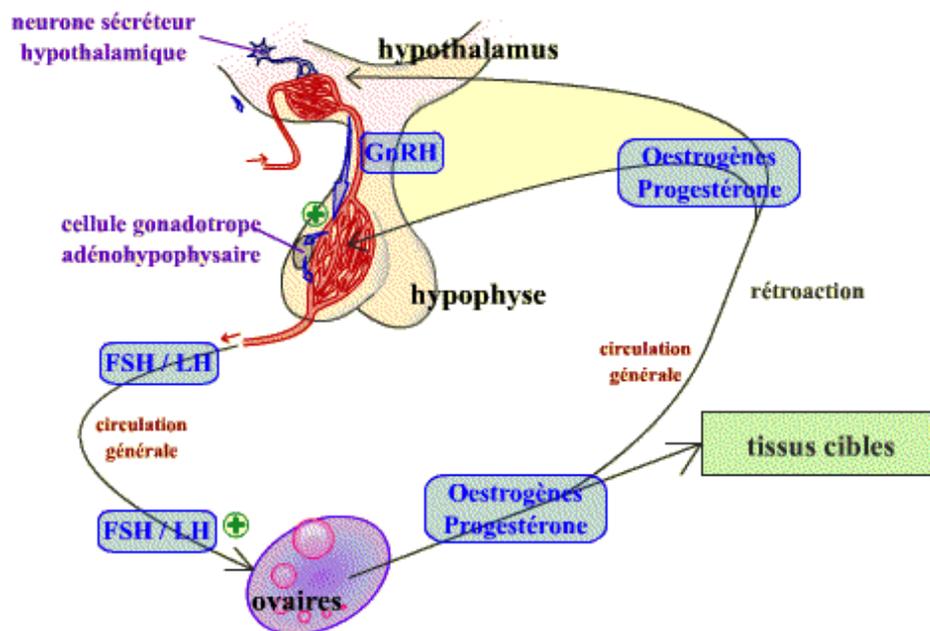


Figure 6 : L'axe hypothalamo-hypophysaire gonadotrope féminin, (de ac-dijon.fr)

quelques heures. Cette technique est indiquée en cas d'oligospermie* modérée ou/et d'anomalies tubaires.

La FIV-ICSI consiste à choisir un spermatozoïde et à l'injecter directement dans le cytoplasme de l'ovocyte à l'aide de micropipettes. Cette technique est indiquée lorsque les spermatozoïdes n'ont pas la capacité de féconder spontanément l'ovocyte (anomalies quantitatives ou qualitative sévères). La FIV-ICSI représente plus de 50% des tentatives de FIV (40).

3.2.1 La stimulation

La première étape de la FIV est la stimulation ovarienne. Différents protocoles de stimulation existent actuellement. Leur choix est conditionné par l'évaluation de la réserve ovarienne, et modulé en fonction de la réponse à d'éventuels traitements antérieurs. En pratique, la réserve ovarienne est évaluée par le compte des follicules antraux mesuré par échographie et par un bilan hormonal comprenant le dosage de la FSH, de la LH, de l'AMH et de l'oestradiol au troisième jour du cycle. L'objectif de la stimulation ovarienne est double : obtenir la croissance simultanée de plusieurs follicules tout en inhibant l'ovulation naturelle. Ce but est atteint par un traitement hormonal adapté, décomposable en trois phases : une phase de blocage, une phase de stimulation de la croissance folliculaire, et une phase de déclenchement de l'ovulation.

- Fonctionnement physiologique

De manière physiologique, l'hypothalamus sécrète de manière pulsatile l'hormone GnRH dans la circulation porte hypothalamo-hypophysaire. Après sa libération, cette neurohormone va se lier à son récepteur de type RCPG*, ce qui va occasionner la libération par l'adénohypophyse* dans la circulation générale de manière également pulsatile des glycoprotéines FSH et LH. Ainsi, chez la femme, FSH et LH vont être responsables de la croissance, de la maturation folliculaire et de l'ovulation, ainsi que de la sécrétion des hormones stéroïdes sexuelles que sont l'œstrogène et la progestérone au niveau des ovaires (figure 6). Il existe un phénomène de rétrocontrôle par ces deux hormones qui va permettre de réguler la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus.

Substance active	Nom commercial	Origine	Activité	Indication
Urofollitropine	Fostimon®	Humaine purifiée	FSH	Stimulation de la croissance folliculaire*
Follitropine α	Gonal F®	Recombinante		
Follitropine β	Puregon®			
Lutropine α	Luveris®		LH	
Gonadotrophine humaine ménopausale	Menopur®	Humaine purifiée	FSH/LH	
Follitropine α et Lutropine α	Pergoveris®	Recombinante		
Gonadotrophine chorionique	Gonadotrophine chorionique Endo®	Recombinante	LH	Déclenchement de l'ovulation
Choriogonadotropine α	Ovitrelle®			

*en association avec la FSH pour Luveris®

Tableau I : Liste des gonadotrophines utilisées dans le cadre de FIV (construit à partir du site theriaque.org)

- Les trois phases de stimulation ovarienne

- ▲ La phase de blocage :

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

Protocole agoniste

Les protocoles agonistes sont les plus utilisés. Ils sont basés sur l'administration initiale d'agonistes de la GnRH. Cette administration de GnRH occasionne tout d'abord une libération importante de FSH et de LH, c'est l'effet « flare-up » (41). C'est l'administration prolongée qui entraînera une inhibition de la sécrétion gonadotrope.

Le principal agoniste utilisé en France est la triptoréline (Decapeptyl®). Il est commercialisé sous deux formes : libération immédiate (acétate de triptoréline, injecté en sous-cutané) ou prolongée (pamoate de triptoréline, injecté en intra-musculaire). Les autres molécules faisant partie de la même famille (busereline, leuprorelina, gosereline, histrelina) sont utilisées dans le cadre de cancers métastatiques du sein ou de la prostate ou de castration chimique chez l'homme (42).

Protocole antagoniste

Par opposition au protocole présenté précédemment, le protocole antagoniste est basé sur l'administration d'un antagoniste au récepteur à la GnRH (41). C'est le protocole le plus récent. Il entraîne une chute immédiate des taux circulants de LH et de FSH. Les gonadotrophines sont instaurées par la suite. Deux molécules existent sur le marché français : le Ganirelix (Orgalutran®) et le Cetorelix (Cetrotide®). Ce sont deux antagonistes agissant par compétition et dont l'effet est dose dépendant. L'administration est quotidienne par injection sous-cutanée (42).

- ▲ La phase de croissance folliculaire :

La stimulation de la croissance simultanée de plusieurs follicules est assurée par des injections contenant de la FSH seule, ou parfois de la FSH et de la LH. Les gonadotrophines utilisées dans le cadre des fécondations *in vitro* peuvent avoir une activité FSH, une activité LH, ou une activité mixte (tableau I). On différencie les gonadotrophines recombinantes des gonadotrophines humaines purifiées à partir d'urine de femmes ménopausées (tableau 1) qui

sont plus fortement concentrées en gonadotrophines par rapport à l'urine de femmes en âge de procréer, En effet, la stéroïdogénèse étant réduite à la ménopause, la libération et l'excrétion des gonadotrophines est augmentée et leur concentration dans les urines est très élevée (43), ce qui facilite leur extraction.

▲ La phase de déclenchement des étapes finales de maturation ovocytaire

La maturation finale des ovocytes est déclenchée artificiellement par une injection d'hCG, en substitut du pic de LH endogène qui est réprimé par les traitements administrés (44). En effet, la LH et l'hCG ayant la même activité biologique et partageant le même récepteur, le LH/CGR, on utilise en pratique l'hCG pour le déclenchement de l'ovulation, cette hormone possédant une demi-vie plus longue de par sa O-glycosylation et son coût de production plus faible (45). Le déclenchement est programmé lorsqu'il existe une majorité de follicules supérieurs à 14mm (les plus gros atteindront 19-20mm) et que le taux d'estradiol correspond au nombre de follicules matures visualisés, à raison de 250 à 300pg/follicule. Le respect de la date et de l'heure de l'injection d'hCG est crucial, les follicules étant ponctionnés juste avant l'ovulation, soit 36 heures après. L'hCG va entraîner la reprise de la méiose de l'ovocyte bloqué en métaphase I, la mucification et l'expansion du complexe cumulo-ovocytaire (CCO) par une augmentation de la synthèse d'acide hyaluronique (46), ainsi que l'augmentation de la quantité de liquide folliculaire par une augmentation de la perméabilité cellulaire. Ces processus, en coopération avec l'action d'enzymes lytiques, aboutiront à la rupture du follicule et à l'ovulation du CCO.

3.2.2 Ponction ovocytaire

La ponction est réalisée 36 heures après l'injection d'hCG au bloc opératoire par voie transvaginale* sous contrôle échographique et après anesthésie (hypnose, anesthésie locale ou générale). Le contenu de chaque follicule dont la taille est supérieure à 10mm est aspiré à l'aide d'une pompe permettant la collecte du liquide folliculaire contenant les CCO en suspension. Ce liquide est stocké dans des tubes contenant du milieu nutritif pendant toute la durée de l'opération. La ponction peut être réalisée en « globale », c'est-à-dire sans changement de tubes entre les follicules, ou au contraire être réalisée « follicule par follicule », ce qui présente l'avantage de pouvoir étudier les spécificités du microenvironnement de chaque CCO. Après la ponction, les tubes sont rapidement acheminés au laboratoire d'AMP dans des malles thermostatées à 37°C en vue de la recherche ovocytaire.

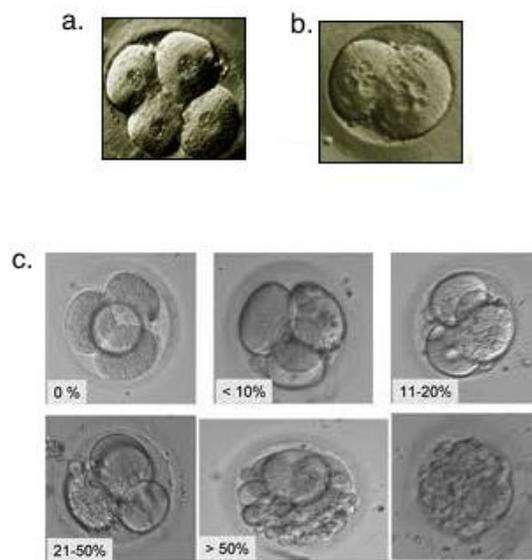


Figure 7 : Embryons de qualité différente (d'après inviafertility.com et fivfrance.com)
 a. embryon à J2 et blastomères mononucléés, b. embryon à J1 avec blastomères polynucléés
 c. embryons présentant différents degrés de fragmentation

3.2.3 Recherche ovocytaire, fécondation et culture embryonnaire

A l'arrivée au Laboratoire, les CCO sont immédiatement recherchés dans les liquides folliculaires. Les spermatozoïdes du conjoint sont également récupérés par recueil de sperme « frais » ou par décongélation de paillettes de sperme, puis capités le matin de la ponction ovocytaire.

Pour la FIV conventionnelle, les spermatozoïdes sont mis en contact des CCO dans une boîte de pétri, permettant ainsi la fécondation « spontanée » entre les gamètes. Il faut environ 100 000 spermatozoïdes par CCO.

Pour la FIV-ICSI, un spermatozoïde est choisi et injecté directement dans le cytoplasme de chaque ovocyte mature. Pour cela, il est nécessaire de préparer les ovocytes grâce à une étape de décoronisation, qui consiste à libérer l'ovocyte des cellules du cumulus qui l'entourent par une solution enzymatique composée de hyaluronidase associée à une action mécanique par passages répétés dans un capillaire en verre. Les ovocytes fécondés sont ensuite mis en culture dans un incubateur à 37°C sous 6% de CO₂. Le développement des embryons est contrôlé quotidiennement selon des critères morphologiques et cinétiques, permettant de les classer selon des critères dits morphocinétiques*. Une minorité d'embryons auront les critères suffisants pour être transférés dans la cavité utérine ou congelés en vue d'un transfert ultérieur.

3.2.4 Le choix de l'embryon à réimplanter

A ce jour, l'implantation embryonnaire reste le facteur le plus limitant en FIV, avec environ 10 à 15% de taux d'implantation par embryon replacé (47). Actuellement, le choix de l'embryon à réimplanter se fait principalement grâce aux critères morphocinétiques (48). Ces critères sont basés principalement sur le nombre, la taille, et la nucléation des blastomères, ainsi que sur la fragmentation cellulaire de l'embryon (figure 7). L'utilisation exclusive de ces critères montre aujourd'hui 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 (49). Paradoxalement, certains embryons jugés de « basse qualité » évoluent pourtant vers une grossesse physiologique et une naissance à terme. La validation de nouveaux critères décisionnels plus fiables pour le choix de l'embryon à transférer est une priorité pour augmenter le succès des prises en charge

	Localisation	Nombre d'exons	Nombre d'AA	Poids moléculaire
PROK1	1p21	3	86	8,6 kDa
PROK2	3p21.1	4	81	8,8 kDa
PROKR1	2p14	2	393	44,8 kDa
PROKR2	20p12.3	2	384	44 kDa

Source : genecards.org

Localisation selon le site HGNC

Tableau II : Caractéristiques des PROKs/PROKRs

de l'infertilité en FIV. Les facteurs impliqués dans les mécanismes de la compétence ovocytaire/embryonnaire et la réceptivité endométriale semblent être prometteurs mais restent à être validés en routine hospitalière. Parmi ces facteurs, les cytokines solubles sécrétées présentent un intérêt grandissant pour leur application potentielle comme biomarqueurs non-invasifs dans la pratique clinique.

Depuis 2001, un faisceau grandissant de publications place la Prokinéticine 1 (PROK1) au cœur des interactions foeto-maternelles, suggérant un rôle clé dans l'implantation embryonnaire (3).

4. La famille des prokinéticines

Cette famille est composée de deux protéines sécrétées : PROK1 (aussi appelée EG-VEGF pour Endocrine-Gland derived Vascular Endothelial Growth Factor) et PROK2 (ou encore Bv8) (tableau II). Chez l'homme, elles ont été caractérisées en 2001 conjointement par l'équipe de Ferrara et l'équipe de Zhou (50,51). Les prokinéticines présentent 44% de similarité dans leur séquence d'acides aminés avec un hexapeptide commun en position N-terminale dénommé AVITGA. Ce dernier est indispensable à leur activité (52).

PROK1 et PROK2 se lient avec une affinité comparable à deux Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG) : PROKR1 et PROKR2. Ces deux récepteurs possèdent près de 85% d'identité (50).

Cette famille présente une expression majoritaire dans les ovaires, le placenta, les testicules, et les glandes surrénales (51). 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 (51,53). Les prokinéticines sont impliquées dans la motilité gastro-intestinale, la sensibilité à la douleur, l'angiogenèse, le rythme circadien, le développement du système olfactif périphérique, l'hématopoïèse, la différenciation des monocytes et l'activation des macrophages, la survie neuronale et la neurogenèse, le cycle menstruel, la reproduction et la placentation ((50–52,54,55). L'expression des récepteurs de PROK est mal connue, elle paraît plus ubiquitaire que PROK1/PROK2. Dans l'ovocyte et l'embryon, seuls les travaux d'IHC et de RT-qPCR en cours au laboratoire ont démontré la présence des récepteurs dans l'ovaire et les follicules.

4.1 Rôle de PROK1 dans la fertilité féminine

L'implication de PROK1 et de ses récepteurs dans la fonction reproductive chez la femme est établie dans de nombreuses publications (53).

4.1.1 Rôle de PROK1 dans la folliculogénèse

Depuis sa découverte en 2001, plusieurs études ont suggéré son rôle dans la folliculogénèse, par un pattern d'expression dynamique dans l'ovaire au cours des stades de différenciation folliculaire (56). En effet, du stade primordial au stade secondaire, les transcrits de PROK1 sont fortement exprimés dans les cellules de la granulosa, suivie d'une baisse dans le follicule tertiaire. Après l'ovulation, les ARNm de PROK1 sont à nouveau abondants, et se localisent au niveau du corps jaune et des follicules atreétiques (57). La quantité des transcrits de PROK1 est augmentée *in vitro* par l'hCG mais pas par la progestérone, suggérant un rôle de la prokinéticine 1 dans la formation du corps jaune (57). Il a été montré que PROK1 est impliqué dans la prolifération et la survie des cellules endothéliales (58) ainsi que dans l'angiogénèse (59) dans le corps jaune. En 2011, la présence de PROK1 a été rapportée dans le liquide folliculaire pré-ovulatoire en FIV (60).

4.2 PROK1/PROKR et réceptivité endométriale

Durant la phase lutéale, l'expression des transcrits de PROK1 est augmentée au sein de l'endomètre pendant la fenêtre implantatoire. Il joue également un rôle direct dans l'induction de l'angiogénèse endométriale et augmente plusieurs facteurs de croissance et gènes pro-implantatoires (61).

4.3 Rôle de PROK1 dans la placentation

Le système PROK1/PROKR joue un rôle important dans le développement placentaire physiologique (62), en particulier dans la prolifération et la survie du trophoblaste villositaire (63–65). Cette étape d'expansion trophoblastique étant nécessaire à toute implantation embryonnaire, le système PROK1/PROKR pourrait donc intervenir précocement dans l'établissement de la grossesse.

4.4 PROK1 et l'implantation

Concernant l'implantation embryonnaire, plusieurs publications ont conclu à une augmentation du système des prokinétines dans les grossesses ectopiques (66) ainsi que dans les fausses-couches à répétition (67). Récemment, des polymorphismes dans les gènes de PROK1, PROKR1, et PROKR2 ont été associés aux fausses-couches à répétitions alors que d'autres variants semblent, au contraire, avoir un rôle protecteur aux stades précoces de la grossesse (68).

4.5 PROK1, biomarqueur de l'implantation embryonnaire en FIV ?

L'expression de PROK1 dans la physiopathologie ovarienne et implantatoire est rapportée dans de nombreuses publications, mais la faisabilité et l'utilité de son dosage dans les échantillons biologiques de FIV a été très peu étudiée. Des travaux récents du laboratoire ont démontré que le taux de PROK1 dans le liquide folliculaire global issu des ponctions de FIV conventionnelle de rang 1, c'est à dire lors d'une première tentative de FIV, était significativement augmenté dans les tentatives de FIV se concrétisant par une grossesse clinique (*article en révision dans le Journal JCEM*), permettant ainsi d'entrevoir le potentiel de PROK1 en tant que nouveau biomarqueur non-invasif et pronostique de l'issue de la tentative de FIV.

Ces premiers travaux suggèrent le rôle de PROK1 dans la compétence ovocytaire, processus contrôlé par la FSH, puis par le pic ovulatoire physiologique de LH ou par l'injection d'hCG lors d'une FIV.

L'objectif de ma thèse a été d'approfondir les connaissances du système PROK1/PROKRs dans l'acquisition de la compétence ovocytaire par l'étude des niveaux d'expression et la caractérisation des régulations hormonales de PROK1 et de ses récepteurs dans le follicule ovarien humain au cours de la folliculogenèse humaine.

→ Mon objectif principal a été de mesurer le niveau de sécrétion intrafolliculaire de PROK1 au cours des étapes finales de la folliculogenèse chez des patientes prises en charge en FIV conventionnelle de rang 1 au CHU de Grenoble, et d'analyser les résultats en fonction du stade de maturité folliculaire et de compétence ovocytaire.

→ Mon objectif secondaire a été de caractériser les régulations hormonales de l'expression du système PROK1/PROKRs par deux hormones clés de la compétence ovocytaire, la FSH et l'hCG, dans des cultures primaires de cellules du cumulus collectées

dans le cadre de FIV-ICSI. En effet, l'étude des régulations hormonales de PROK1/PROKR n'étant pas possible directement sur l'ovocyte humain pour des raisons éthiques, j'ai utilisé des cultures primaires de cellules du cumulus reconnues pour être un bon modèle d'étude du microenvironnement folliculaire humain.

Matériels et Méthodes

1. Patients et échantillons

Les échantillons utilisés sont issus de couples pris en charge pour infertilité dans le centre de Médecine de la Procréation du CHU de Grenoble dans le cadre d'une FIV. Le recrutement a débuté en septembre 2014 et s'est achevé en juin 2015. Lors de leur prise en charge, les couples ont été informés de la mission de recherche existant dans le CHU et de la possibilité que le reliquat des échantillons collecté soit conservé dans le Centre de Ressources Biologiques (CRB) GERMETHEQUE. Conformément à l'article L1211-2 du code de la santé publique, ils ont eu la possibilité de consentir ou de s'opposer par écrit à cette conservation dans le CRB. Le CRB GERMETHEQUE dispose des autorisations de collection et cession (autorisation n°AC-2009-886).

Pour l'étude de la sécrétion intra-folliculaire de PROK1 au cours des étapes finales de la folliculogenèse, les critères d'inclusion ont été une prise en charge des patients en FIV conventionnelle de rang 1, afin de minimiser les risques d'une composante masculine ou endométriale dans les causes d'infertilité. Les ponctions devaient être concrétisées par une récolte d'au moins trois CCO suite à la recherche ovocytaire.

Pour l'étude des régulations hormonales du système PROK1/PROKRs, les critères d'inclusion ont été une prise en charge des patients en FIV-ICSI, avec une récolte d'au moins dix CCO suite à la recherche ovocytaire, afin d'avoir un nombre suffisant de cellules à mettre en culture.

1.1 Ponction des follicules

L'aspiration du liquide des follicules d'un diamètre supérieur ou égal à 10 mm a été réalisée avec du Flushing Medium® (Flushing Medium with heparin 10 UI/ml, REF : 10765060A, Origio), le matin sous contrôle d'une échographie endovaginale au bloc opératoire, 36h après l'induction des étapes finales de maturation ovocytaire déclenchées par l'injection d'hCG.

Pour l'étude de la sécrétion intra-folliculaire de PROK1 au cours des étapes finales de la folliculogenèse, une ponction « follicule par follicule » a permis la collecte individuelle de chaque follicule. La taille de chaque follicule a été estimée par échographie endovaginale (selon une moyenne entre l'axe longitudinal et transversal) avant sa ponction, puis a été rapportée sur le tube correspondant.

Pour l'étude des régulations hormonales du système PROK1/PROKRs, une ponction « globale » a été réalisée, les follicules ont donc été ponctionnés à la suite sans changement de tube entre les follicules.

L'ensemble des liquides folliculaires de chaque ponction a été transporté rapidement jusqu'au laboratoire d'AMP dans une mallette thermostatée à 37°C.

1.2 Récolte des CCO

Pour l'étude de la sécrétion intra-folliculaire de PROK1 au cours des étapes finales de la folliculogénèse, chaque liquide folliculaire a été observé individuellement et chaque CCO retrouvé a été identifié et associé à son liquide folliculaire correspondant, puis récupéré à l'aide d'un capillaire stérile, rincé et placé individuellement dans un plot de 600 µl de CSCC® (Continuous Single Culture, REF 90164, Irvine Scientific).

Pour l'étude des régulations hormonales du système PROK1/PROKRs, les CCO ont été récupérés à l'aide d'un capillaire stérile, puis ont été rincés et placés dans le milieu nutritif IVF® (IVF, REF 20696-03, Vitrolife). Chaque CCO a été décoronisé par traitement à la hyaluronidase sous action enzymatique et mécanique avec un capillaire stérile. Suite à leur décoronisation, chaque ovocyte présentant un globule polaire a été injecté d'un spermatozoïde puis remis en culture dans un plot de 600 µl de CSCC®.

1.3 Collecte des liquides folliculaires

Pour l'étude de la sécrétion intra-folliculaire de PROK1 au cours des étapes finales de la folliculogénèse, chaque liquide folliculaire issu des FIV conventionnelle de rang 1 a été centrifugé individuellement après la recherche ovocytaire à 1500rpm pendant 10 min afin de débarrasser le liquide des débris tissulaires, des cellules de la granulosa et des hématies. Le surnageant a été aliquoté et conservé à -20°C en vue d'un dosage ultérieur de PROK1 par test ELISA, selon la méthodologie détaillée au paragraphe 2.10.

1.4 Recueil et préparation du sperme

Le recueil de sperme a été effectué au laboratoire par masturbation dans un réceptacle stérile (Laboratoire CCD, REF 1206000) après un délai de 48-72 heures d'abstinence sexuelle. Pour chaque recueil, les paramètres spermatiques ont été évalués (selon les normes de l'OMS de 2010) après liquéfaction du sperme pendant 30 minutes à 37°C. Le capacitat*

utilisé pour l'insémination des ovocytes en FIV a été obtenu suite au dépôt d'une fraction de sperme sur un gradient croissant discontinu de PureSperm® (à 40 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, et 100%), suivi d'une centrifugation pendant 20 min à 2000 rpm et la récupération de la fraction 100% +/- les fractions 80% et 90% selon les paramètres spermatiques initiaux. Suite au lavage des fractions d'intérêts par centrifugation dans du SPM (Sperm Preparation Medium, REF 10700060A, Origio) pendant 10 min à 2000 rpm, le culot a été remis en suspension dans un volume adapté de milieu SPM.

1.5 Mise en fécondation des gamètes

Pour l'étude de la sécrétion intra-folliculaire de PROK1 au cours des étapes finales de la folliculogénèse, chaque ovocyte a été inséminé avec environ 30 000 spermatozoïdes à mobilité rapide progressive provenant du capacitat dans un plot d'insémination contenant 600µl de milieu CSCC®.

1.6 Evaluation de la fécondation et mise en culture des embryons

Pour l'étude de la sécrétion intra-folliculaire de PROK1 au cours des étapes finales de la folliculogénèse, les ovocytes ont été décoronisés le lendemain de l'insémination à l'aide d'un stripper, puis replacés en milieu de culture propre CSCC®. L'ensemble des ovocytes est observé individuellement le lendemain matin de la ponction au microscope inversé (objectif x20 et x40) pour évaluer la présence et le nombre de pronoyaux attestant de leur fécondation. La présence de deux pronoyaux (2PN) atteste de la fécondation de l'ovocyte, et donc de la compétence de l'ovocyte à la fécondation. Un nombre inférieur de pronoyaux (0PN ou 1PN) suggère une absence de fécondation. Un nombre supérieur de pronoyaux (≥ 3 PN) suggère une aneuploïdie au niveau du conceptus, ce qui entraîne l'isolement et la destruction des embryons par le Laboratoire.

1.7 Evaluation du potentiel implantatoire des embryons

L'évolution embryonnaire et le potentiel de chaque embryon à s'implanter sont évalués tôt le matin selon les critères morphocinétiques. La cotation et le choix de l'embryon à transférer tiennent compte du nombre de blastomères, de leur forme et de leur taille ; du taux de fragmentation et de la présence de plusieurs noyaux à l'intérieur d'un blastomère.

Un embryon de qualité optimale ou « top embryo » sera défini : par 4 blastomères de tailles égales non polynuclées et sans fragmentation à 48h ; par 8 blastomères de tailles égales non

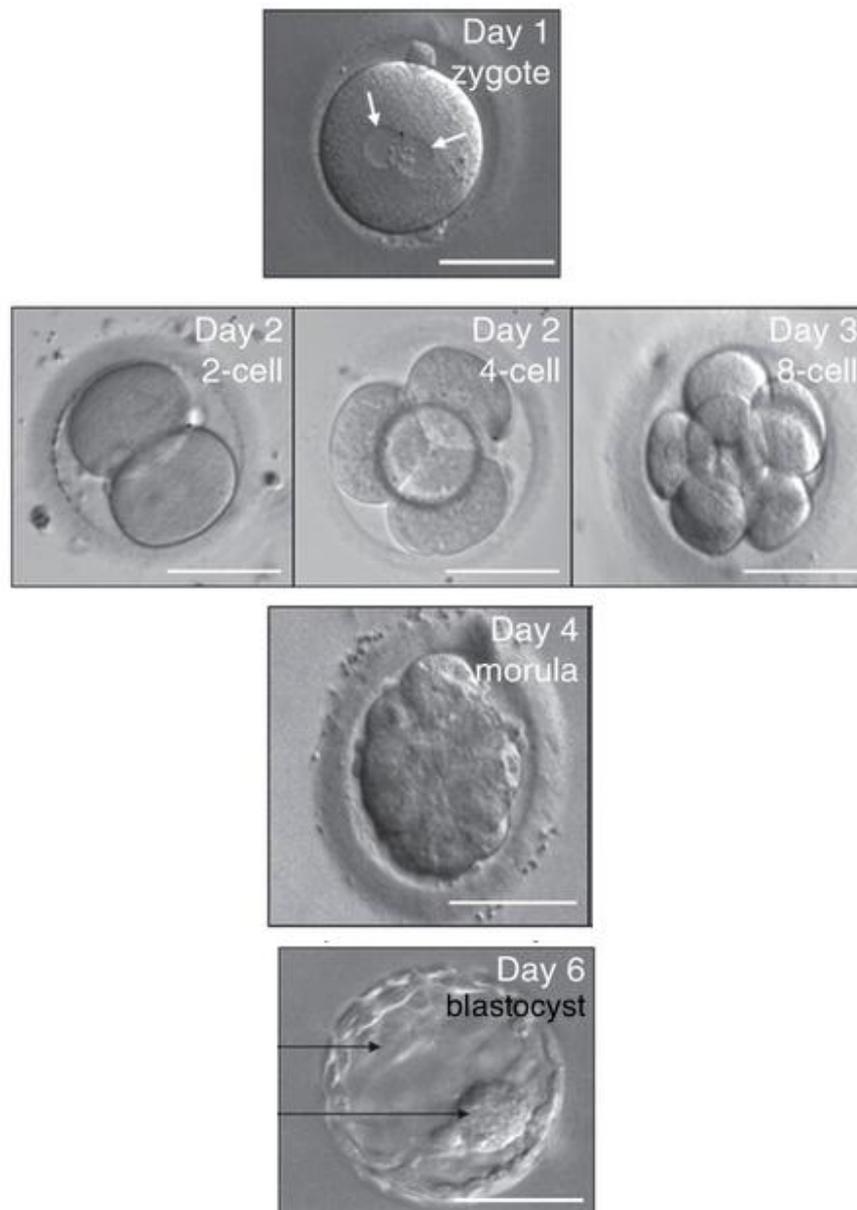


Figure 8 : Représentation du développement embryonnaire *in vitro* (modifié d'après (69))

polynuclées et sans fragmentation à 72h ; par un stade morula sans fragmentation à J4 ; par un stade blastocyste avec une masse embryonnaire bien définie et un trophoctoderme constitué de nombreuses cellules bien jointives à J5 ; par un stade blastocyste avec les mêmes caractéristiques et expansé à J6 (figure 8).

2. Cultures primaires des cellules du cumulus

Pour l'étude des régulations hormonales du système PROK1/PROKRs, les cellules du cumulus isolées dans le cadre des FIV-ICSI ont été collectées après décoronisation des ovocytes le jour de la ponction.

2.1 Mise en culture

Les cellules du cumulus ont été lavées avec 10ml de PBS 1X (DPBS, REF 14190-094, gibco/life technologies) à 37°C, puis centrifugées à 2000 rpm pendant 10 minutes et remises en suspension dans 500 µl de DMEM-F12® (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham, REF 31331-028, Life technologies) supplémenté avec 1% de pénicilline/streptomycine (Penicillin/streptomycin 100X, REF p11-010, PAA), puis ensemencées sur deux puits de boîte Nunc® (4 puits, REF144444, Nunc) et laissées à l'étuve à 37°C jusqu'au lendemain.

2.2 Traitement des cellules du cumulus

Les cellules ont été lavées trois fois avec du milieu DMEM-F12 à 37°C afin de se débarrasser des hématies et des cellules n'ayant pas adhéré. Selon la condition étudiée, les cultures ont été traitées par hCG 1U.I./ml (Ovitrelle®, Merck Serono), FSH 100U.I./ml (Puregon®, NV Organon) ou FSK 10µM (Forskoline, Sigma-Aldrich, REFF6886) pendant 48h.

2.3 Collecte des surnageants

Suite aux 48h de traitement, chaque surnageant de culture primaire de cellules du cumulus a été récupéré, puis centrifugé 5 minutes à 2000 rpm, afin de se débarrasser des quelques cellules qui se sont décollées. Le surnageant a été ensuite aliquoté et conservé à -20°C en vue d'un dosage ultérieur par test ELISA.

2.4 Extraction des protéines

Les cellules du cumulus ont été reprises dans 100µl de tampon de lyse RIPA (Ripa Buffer, REF 9806, Cell signaling), laissées sur glace pendant 15 minutes, puis décollées à l'aide d'une spatule stérile, et centrifugées à 1500rpm pendant 15 minutes à 4°C afin de se débarrasser des débris cellulaires. Le surnageant a été récupéré et stocké à -20°C en vue d'un dosage ultérieur de PROK1 par test ELISA ou d'une analyse ultérieure de l'expression des récepteurs de PROK1 par Western Blot.

2.5 Détermination de la concentration en protéines totales des extraits protéiques

La quantité de protéines totales extraites des échantillons a été calculée par dosage colorimétrique Bradford selon les recommandations du fabricant (Quick Start™ Bradford Protein Assay, Biorad) avec mesure spectrophotométrique à 595 nm. La protéine utilisée comme standard a été la BSA (bovine serum albumine) à des concentrations variant de 0 µg/µl à 25 µg/µl pour la courbe étalon.

2.6 Western Blot

L'électrophorèse des protéines a été réalisée en condition dénaturante (SDS-PAGE) sur un gel d'acrylamide à 12%. Chaque échantillon a été supplémenté en laemmli et porté à 100°C pendant 5 min. Pour chaque échantillon, 40 µg de protéines ont été déposées dans chaque puits. Un marqueur de taille a également été utilisé pour chaque gel. La migration a été réalisée pendant 2h à 100V dans des cuves d'électrophorèse de type Mini-Protean (Biorad). Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose à 0.45 µm (Biorad) à l'aide du Trans-Blot Turbo (Biorad). Les sites non spécifiques ont été saturés par du tampon de blocage (TBS 1X, 5% de lait écrémé, 0.1% Tween 20) pendant 1h à température ambiante sous agitation douce. L'incubation des anticorps primaires (anti-PROKR1 et anti-PROKR2, 44kDa et 45 kDa, Covalab) a été réalisée dans un tampon composé de TBS 1X – Tween 20 0,1% et de BSA 0,5%, à la dilution de 1/300 une nuit complète sous agitation en chambre froide. L'incubation de l'anticorps primaire anti-β-actine (42 kDa, Sigma Aldrich) a été réalisée dans un tampon composé de TBS 1X – Tween 20 0,1% à la dilution de 1/500 durant 2 heures sous agitation et à température ambiante. Les anticorps secondaires d'origine lapine couplés HRP pour PROKR1/PROKR2 et murine pour la β-actine ont été dilués dans du TBS/Tween 20 0,1% à 1/3000 et 1/5000 respectivement et

Amorce	Sens (5'-3')	Antisens (5'-3')	θ° d'hybridation
PROK1	AGGTCCCCTTCTTCAGGAAACG	TCCAGGCTGTGCTCAGGAAAAG	60°C
GAPDH	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	TTCTAGACGGCAGGTCAGGT	60°C

Tableau III: Amorces utilisées pour la PCR quantitative

incubés 2 heures à température ambiante sous agitation douce. Les membranes ont été lavées 3 fois durant 5 minutes sous agitation forte avec du TBS/Tween 20 0,1% entre les deux anticorps et la révélation. Les membranes ont alors été baignées dans de l'ECL durant 1 minute avant révélation en chambre noire.

2.7 Extraction des ARN

Les ARN des cellules du cumulus ont été extraits à l'aide d'un kit spécifique aux faibles quantités d'échantillons biologiques et selon le protocole recommandé par le fabricant (NucleoSpin® RNA XS, Macherey Nagel). Une étape de DNase a permis de se débarrasser de l'ADN génomique. La qualité et la concentration des échantillons ont été déterminées par mesure spectrophotométrique avec lecture de l'absorbance à 260 nm et à 280 nm (Nanodrop 1000 Spectrophotometer ®, ThermoScientific).

2.8 Reverse Transcription (RT)

L'étape de reverse-transcription a été réalisé sur 100ng d'ARN avec un kit spécifique pour la q-PCR (iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR®, Biorad). La contamination des échantillons par de l'ADN génomique a été vérifiée par la réalisation de RT sans enzyme. L'ensemble des échantillons a été soumis à une suite de cycles : 5 min à 30°C, 30 min à 42°C, puis 5 min à 85°C, avant une baisse de température à 4°C. Les échantillons d'ADN complémentaire (ADNc) ont ensuite été stockés à -20°C.

2.9 PCR quantitative

La q-PCR a été réalisée en SYBR Green (GoTaq® qPCR Master Mix, REF A6002, Promega) sur des plaques opaques de 96 puits sur un thermocycler (Biorad CFX96®, Biorad). La température d'hybridation a été de 60°C pour toutes les amorces utilisées (Tableau III).

2.10 Dosage de PROK1 par test ELISA

La protéine PROK1 a été mesurée dans les différents échantillons biologiques par un test ELISA commercial (human EG-VEGF/PROK1 ELISA development kit, Peprotec) utilisé selon les recommandations du fournisseur. Les plaques de 96 puits (Nunc MaxiSorp® flat-bottom 96 well plate) ont été incubées avec l'anticorps de capture dilué dans du PBS1X à la concentration de 0,5µg/ml (100µL par puits, concentration initiale 100µg/ml) sur la nuit à température ambiante. Le lendemain, les puits ont été rincés 4 fois à l'aide d'une solution de

Wash (PBS 1X, Tween-20 0,05%) puis les interactions non spécifiques ont été inhibées par une incubation avec une solution de Block (PBS 1X, BSA 1%) durant au moins 1 heure à température ambiante. Les puits ont été rincés 4 fois à l'aide d'une solution de Wash (PBS 1X, Tween-20 0,05%). Deux gammes étalon de PROK1 de 16 pg/ml à 1 ng/ml ont été réalisées par dilution en cascade, puis incubées à chaque extrémité de la plaque afin d'encadrer les échantillons.

Pour l'étude de la sécrétion intra-folliculaire de PROK1 au cours des étapes finales de la folliculogénèse, chaque échantillon a été dosé en triplicat avec une dilution au préalable d'un facteur cinq dans une solution de Diluent (PBS 1X, Tween-20 0.05%, BSA 0,1%) afin de s'assurer que les concentrations soient dans la linéarité de la courbe étalon.

Pour l'étude des régulations hormonales du système PROK1/PROKRs, les surnageants (100µL) ont été dosés en duplicat sans dilution au préalable, alors que les extraits protéiques de cellules du cumulus ont été dosés en simplicat sans dilution au préalable.

L'ensemble des échantillons a été incubé à température ambiante durant 2 heures puis chaque puits est lavé à nouveau 4 fois par la solution de Wash, et incubé durant 2 heures avec une solution d'anticorps de détection à la concentration de 0,5µg/ml (100µl par puits, concentration initiale 100µg/ml) à température ambiante. Les plaques ont été de nouveau lavées par 4 rinçages successifs au Wash, puis une solution d'avidine peroxydase diluée à 1/2000 dans du Diluent a été ajoutée pour incubation pendant 30 minutes à température ambiante. Les plaques ont été de nouveau lavées par 4 rinçages successifs au Wash, puis l'ABTS (substrat de la peroxydase, 100µl par puits, SIGMA, France) a été ajouté durant environ 5 min pour la réalisation de la réaction colorée (vert). La lecture de la plaque au spectrophotomètre à 405 nm et à 620nm a alors été réalisée avec le Multiskan EX (Thermolab Systems) couplé au logiciel Ascent Software for multiscan. Les données obtenues ont été traitées par le logiciel GraphPad Prism4 par régression linéaire.

3. Statistiques

Le test Mann-Whitney a été utilisé pour sa pertinence à tester deux populations d'échantillons entre elles en l'absence d'hypothèse sur la distribution sous-jacente. Le test One-Way ANOVA a été utilisé pour sa pertinence à étudier le comportement d'une variable continue en fonction d'une variable explicative catégorielle. L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel Graph Pad Prism4. Les valeurs ont été représentées en moyenne +/- SEM (erreur standard).

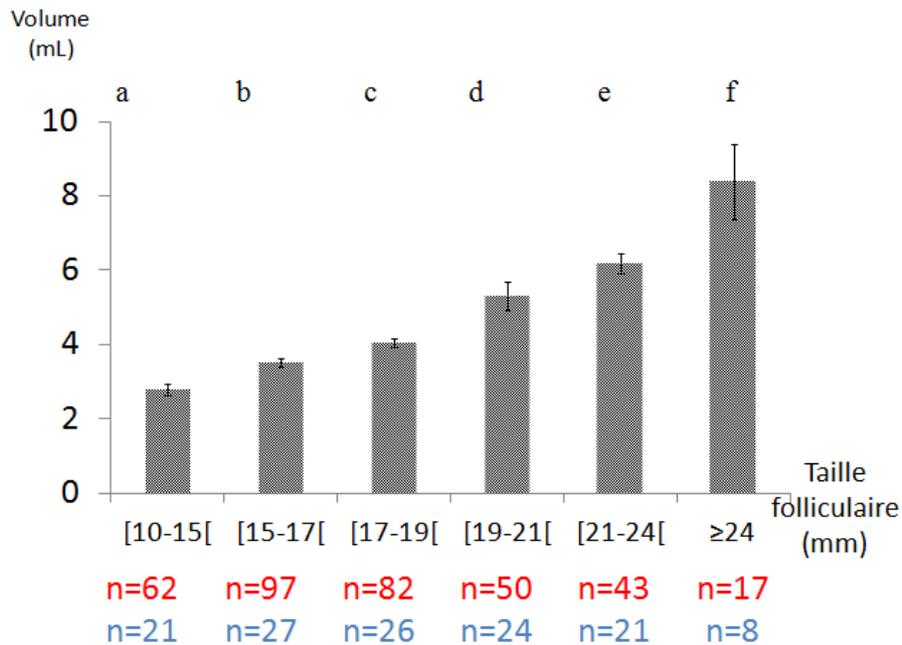


Figure 9 : Volume (en ml) en fonction de la taille du follicule (en mm). Les nombres notés en rouge correspondent au nombre de follicules et les nombres en bleu au nombre de familles analysés. L'analyse statistique a été réalisée sous Prism à l'aide d'un test One-way ANOVA. Des lettres différentes au-dessus de chaque colonne indiquent des différences significatives ($p < 0,001$).

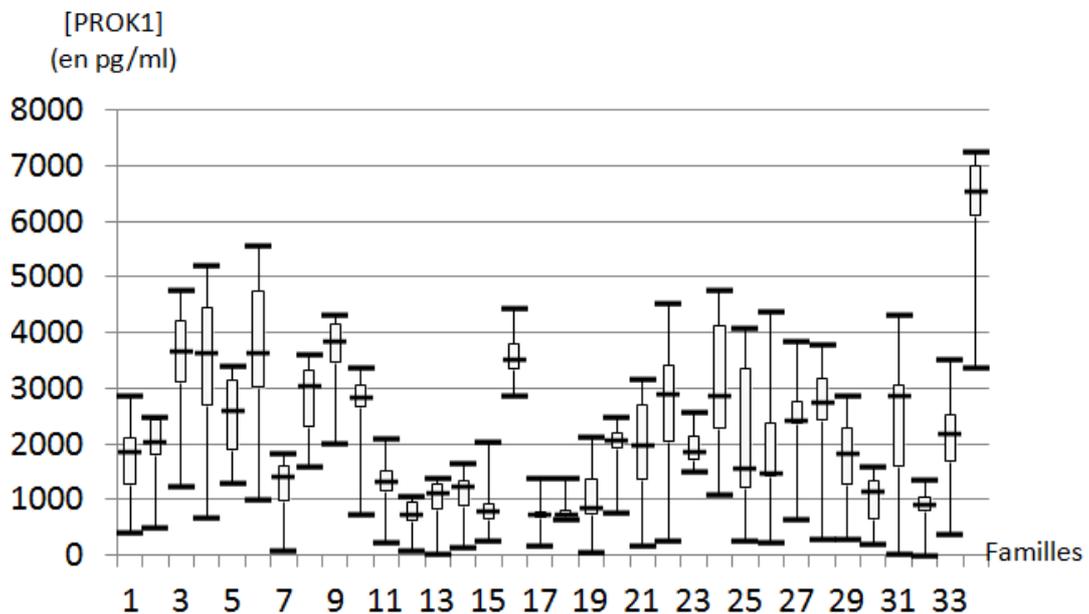


Figure 10 : Variations intra et interindividuelles des concentrations folliculaires en PROK1 (en pg/ml) dans les 34 familles étudiées. La concentration en pg/ml de chaque échantillon a été déterminée grâce au logiciel GraphPad par régression linéaire. Pour chaque famille, la médiane, les extrema, le premier et le troisième quartile ont été calculés en vue de construire un BoxPlot. Les nombres de d'échantillons utilisés pour chaque famille étaient compris entre 3 et 27 avec une moyenne de 13 échantillons par famille.

Résultats

Etude de la sécrétion intra-folliculaire de PROK1 au cours des étapes finales de la folliculogénèse chez des patientes prises en charge en FIV conventionnelle de rang 1

1. Validation de méthode : étude du volume en fonction de la taille folliculaire

La croissance folliculaire est caractérisée par une augmentation de la taille et donc du volume du follicule ovarien. Sur l'ensemble des échantillons analysés, on observe une augmentation significative du volume collecté de liquide avec la taille des follicules ponctionnés (One-Way ANOVA, $p < 0,001$, figure 9).

2. Etude des variations de concentration intrafolliculaire de PROK1

Les concentrations de PROK1 pour chaque follicule ponctionné ont été mesurées par test ELISA. On observe une importante hétérogénéité intra et interindividuelles dans les concentrations intrafolliculaires de PROK1 dans les 34 familles analysées (voir figure 10).

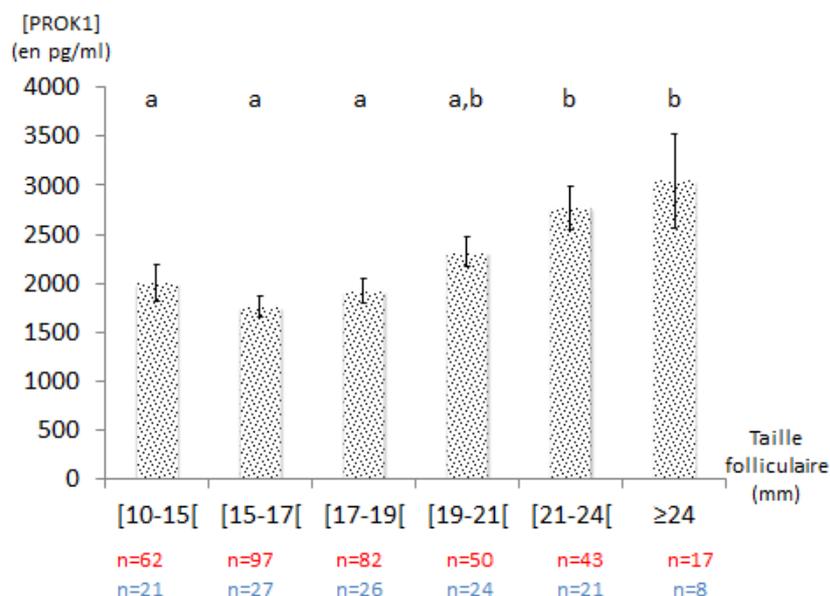


Figure 11 : Concentration de la protéine PROK1 (en pg/ml) dans le liquide de chaque follicule en fonction de la taille des follicules (en mm). La concentration en pg/ml a été déterminée grâce au logiciel GraphPad par régression linéaire. Les nombres notés en rouges correspondent au nombre de follicules et les nombres en bleu au nombre de familles analysées. L'analyse statistique a été réalisée sous Prism à l'aide d'un test One-Way ANOVA. Des lettres différentes indiquent des différences significatives. (***) $p < 0,001$.

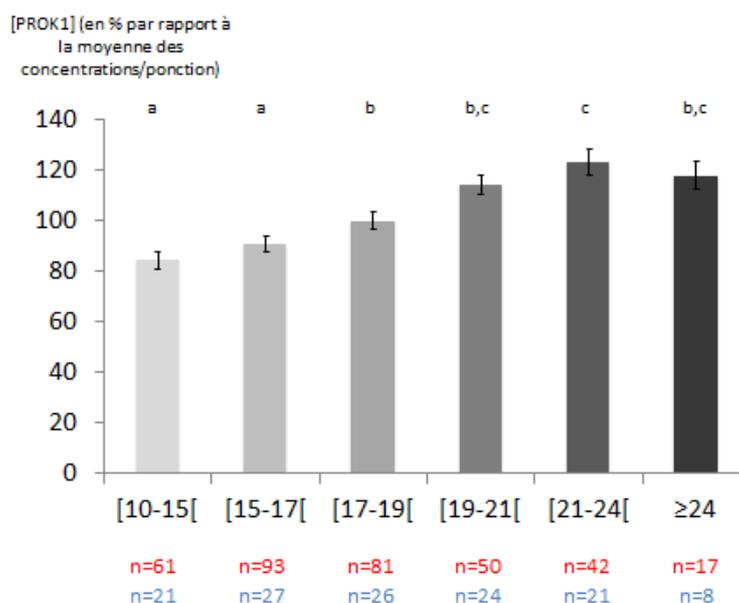


Figure 12 : Niveau d'expression de la protéine PROK1 (en % par rapport à la moyenne des concentrations pour chaque ponction ovocytaire) dans le liquide de ponction en fonction de la taille des follicules (en mm). La concentration en pg/ml a été déterminée grâce au logiciel GraphPad par régression linéaire, puis transformée en pourcentage par rapport à la moyenne des concentrations pour chaque ponction ovocytaire, afin de s'affranchir des variations inter-individuelles. Les nombres notés en rouges correspondent au nombre de follicules et les nombres en bleu au nombre de familles analysées. L'analyse statistique a été réalisée sous Prism à l'aide d'un One-Way ANOVA. Des lettres différentes indiquent des différences significatives. (***) $p < 0,001$.

3. Expression de PROK1 en fonction de la taille folliculaire

Les niveaux d'expression de PROK1 ont été quantifiés dans le liquide de chaque follicule ponctionné puis analysés en fonction de la taille folliculaire chez 34 couples. On observe une augmentation significative des concentrations de PROK1 au cours des étapes tardives de croissance folliculaire (One-Way ANOVA, $p < 0,001$, figure 11). Afin de tenter de s'affranchir des variabilités interindividuelles observées dans la figure 8, la concentration de PROK1 est exprimée en pourcentage par rapport à la moyenne des concentrations pour chaque ponction ovocytaire (figure 12). On observe une augmentation significative de l'expression de PROK1 dans les étapes tardives de la folliculogénèse (One-Way ANOVA, $p < 0,001$, figure 12).

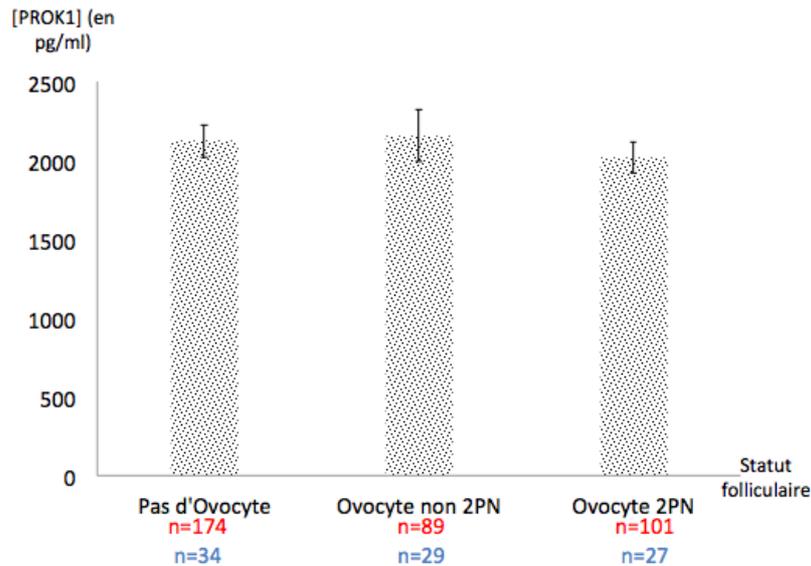


Figure 13: Concentration de la protéine PROK1 (en pg/ml) dans le liquide de chaque follicule en fonction du statut folliculaire. La concentration en pg/ml a été déterminée grâce au logiciel GraphPad par régression linéaire. La recherche ovocytaire a été effectuée au laboratoire d'AMP dans les différents liquides folliculaires. La mention « Pas d'ovocyte » signifie l'absence d'ovocyte dans le liquide folliculaire analysé, « Ovocyte non 2PN » se réfère à tous les ovocytes retrouvés dans les liquides folliculaires ne présentant pas 2 pronuclei le lendemain de la ponction suite à leur mise en fécondation et enfin « Ovocyte 2PN » correspond aux ovocytes présentant 2 pronuclei le lendemain de la ponction suite à leur mise en fécondation. Les nombres notés en rouges correspondent au nombre de liquides folliculaires analysés et les nombres en bleu au nombre de familles analysées. L'analyse statistique a été réalisée sous Sigma Plot à l'aide d'un One-Way ANOVA.

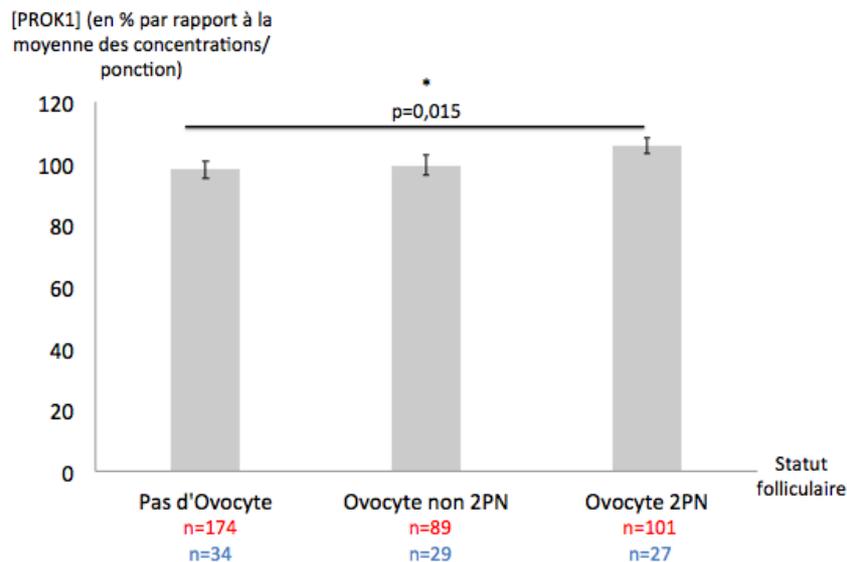


Figure 14 : Niveau d'expression de la protéine PROK1 (en % par rapport à la moyenne des concentrations pour chaque ponction ovocytaire) dans le liquide de chaque follicule en fonction du statut folliculaire. La concentration en pg/ml a été déterminée grâce au logiciel GraphPad par régression linéaire puis transformée en pourcentage par rapport à la moyenne des concentrations pour chaque ponction ovocytaire, afin de s'affranchir des variations inter-individuelles. La recherche ovocytaire a été effectuée au laboratoire d'AMP dans les différents liquides folliculaires. La mention « Pas d'ovocyte » signifie l'absence d'ovocyte dans le liquide folliculaire analysé, « Ovocyte non 2PN » se réfère à tous les ovocytes retrouvés dans les liquides folliculaires ne présentant pas 2 pronuclei le lendemain de la ponction suite à leur mise en fécondation et enfin « Ovocyte 2PN » correspond aux ovocytes présentant 2 pronuclei le lendemain de la ponction suite à leur mise en fécondation. Les nombres notés en rouges correspondent au nombre de liquides folliculaires analysés et les nombres en bleu au nombre de familles analysées. L'analyse statistique a été réalisée sous Sigma Plot à l'aide d'un One-Way ANOVA. (*p<0,05).

4. Expression de PROK1 en fonction du statut folliculaire

Les concentrations de PROK1 ont été analysées en fonction du statut folliculaire : pas d'ovocyte retrouvé dans le liquide folliculaire (« Pas d'ovocyte »), un ovocyte non compétent retrouvé dans le liquide folliculaire (« Ovocyte non 2PN) et un ovocyte compétent à la fécondation retrouvé dans le liquide folliculaire (« Ovocyte = 2PN) (figure 13). Sur l'analyse groupée des 34 familles (figure 14), on observe une concentration similaire de PROK1 dans ces 3 groupes, ce qui ne reflète pas les variations observées au sein de chaque famille. Nous supposons alors que les variations interindividuelles fortes (voir figure 10) « écrasent » les variations intra-individuelles. Une nouvelle analyse est alors conduite avec l'expression de la concentration de PROK1 en pourcentage, 100% correspondant pour chaque ponction à la moyenne de ses concentrations folliculaires (figure 14). On observe sur cette nouvelle analyse une augmentation significative de l'expression de PROK1 dans les liquides folliculaires comportant des ovocytes aptes à être fécondés, capacité attestée par la présence de 2 pronuclei (One-Way ANOVA, $p=0,0156$, figure 14, $97,96 \pm 2,89$ % versus $105,6 \pm 2,44$ %)

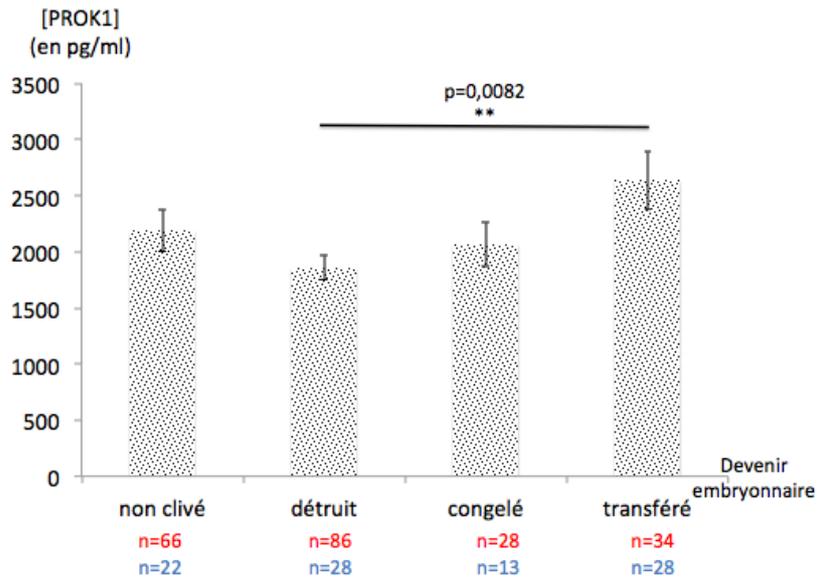


Figure 15 : Concentration de la protéine PROK1 (en pg/ml) dans le liquide de chaque follicule en fonction du devenir embryonnaire. La concentration en pg/ml a été déterminée grâce au logiciel GraphPad par régression linéaire. L'évolution embryonnaire a été observée quotidiennement selon les critères morphocinétiques. Les mentions en abscisse se réfèrent aux différents devenirs ovocytaires et embryonnaires (voir ci-contre). Les nombres notés en rouges correspondent au nombre d'embryons et les nombres en bleu au nombre de familles analysées. L'analyse statistique a été réalisée sous Sigma Plot à l'aide d'un One-Way ANOVA. (**p<0,01).

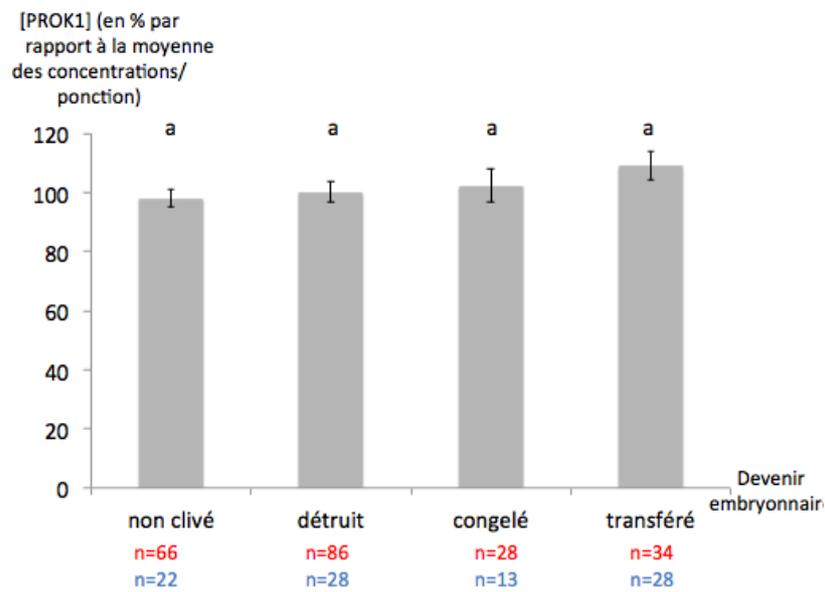


Figure 16 : Niveau d'expression de la protéine PROK1 (en %) dans le liquide de chaque follicule en fonction du devenir embryonnaire. La concentration en pg/ml a été déterminée grâce au logiciel GraphPad par régression linéaire puis transformée en pourcentage par rapport à la moyenne des concentrations pour chaque ponction ovocytaires, afin de s'affranchir des variations inter-individuelles. L'évolution embryonnaire a été observée quotidiennement selon les critères morphocinétiques. Les mentions en abscisse se réfèrent aux différents devenirs ovocytaires et embryonnaires (voir ci-contre). L'analyse statistique a été réalisée sous Sigma Plot à l'aide d'un One-Way ANOVA. Les nombres notés en rouges correspondent au nombre d'embryons et les nombres en bleu au nombre de familles analysées.

5. Expression de PROK1 en fonction du devenir embryonnaire

Nous avons analysé les concentrations intrafolliculaires de PROK1 en fonction du devenir des ovocytes et des embryons. Les ovocytes/embryons ont été classés en 4 catégories : « non clivé » en cas d'absence de division cellulaire, « détruit » en cas de développement défavorables selon les critères morphocinétiques, « transféré » pour les embryons sélectionnés pour un transfert « frais » dans la cavité utérine (ce sont les embryons au score morfo-cinétique le plus élevé de la cohorte embryonnaire pour chaque famille), ou « congelé » pour les embryons présentant un score morfo-cinétique favorable mais pas le plus élevé de la cohorte embryonnaire (ces embryons pourront être transférés ultérieurement dans la cavité utérine après décongélation). Nous avons pu observer une augmentation significative de la concentration de PROK1 dans les échantillons associés à des embryons qui ont été transférés par rapport aux embryons détruits (One-Way ANOVA, $p=0,0082$, figure 15, $1862,26 \pm 109,94$ pg/ml versus $2064,66 \pm 193,09$ pg/ml). En rapportant en pourcentage, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les échantillons (figure 16).

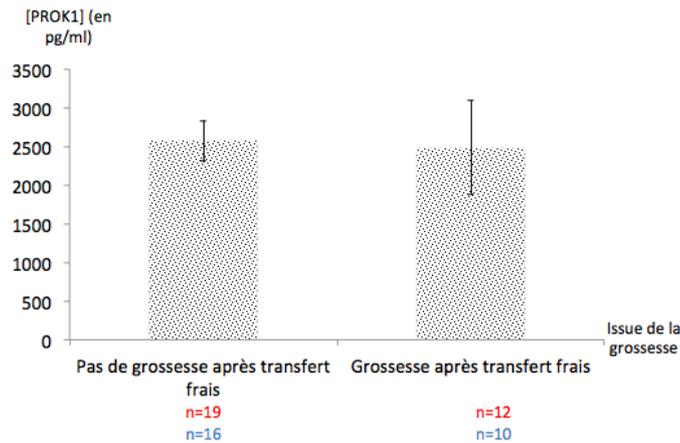


Figure 17 : Concentration de la protéine PROK1 (en pg/ml) dans le liquide folliculaire des embryons sélectionnés pour un transfert frais en fonction de l'issue du transfert. La concentration en pg/ml a été déterminée grâce au logiciel GraphPad par régression linéaire. Les nombres notés en rouges correspondent au nombre d'embryons replacés et les nombres en bleu au nombre de familles analysées. L'analyse statistique a été réalisée sous Sigma Plot à l'aide d'un test Mann-Whitney.

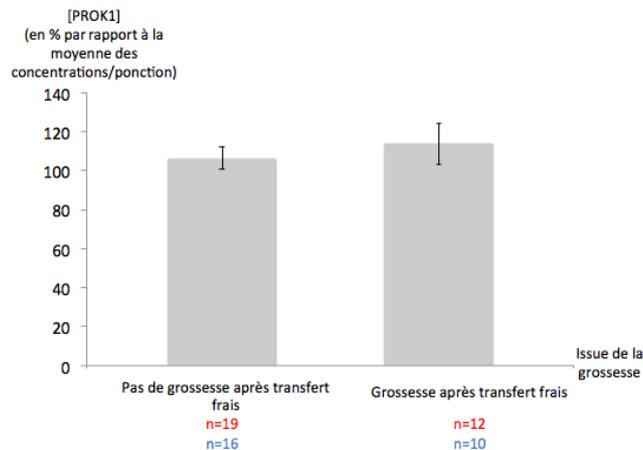


Figure 18 : Niveau d'expression de la protéine PROK1 (en % par rapport à la moyenne des concentrations pour chaque ponction ovocytaire) dans le liquide folliculaire des embryons sélectionnés pour un transfert frais en fonction de l'issue du transfert. La concentration en pg/ml a été déterminée grâce au logiciel GraphPad par régression linéaire. Les nombres notés en rouges correspondent au nombre d'embryons replacés et les nombres en bleu au nombre de familles analysées. L'analyse statistique a été réalisée sous Sigma Plot à l'aide d'un test Mann-Whitney.

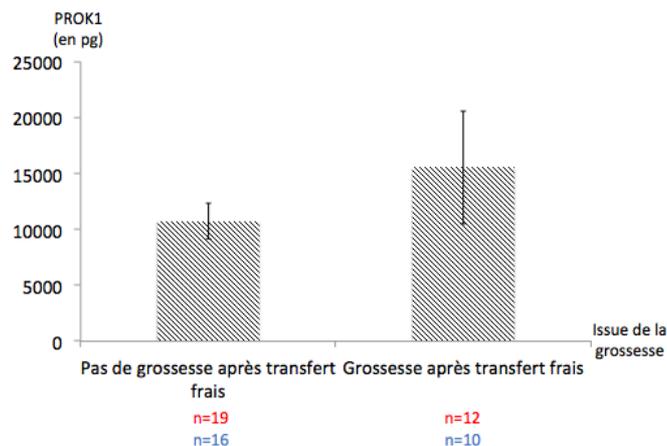


Figure 19 : Taux de la protéine PROK1 (en pg) dans le liquide folliculaire des embryons sélectionnés pour un transfert frais en fonction de l'issue du transfert. La concentration en pg/ml a été déterminée grâce au logiciel GraphPad par régression linéaire. Les nombres notés en rouges correspondent au nombre d'embryons replacés et les nombres en bleu au nombre de familles analysées. L'analyse statistique a été réalisée sous Sigma Plot à l'aide d'un test Mann-Whitney.

6. Expression de PROK1 en fonction de l'issue du transfert embryonnaire

Nous avons analysé les niveaux d'expression de PROK1 dans le liquide folliculaire de 31 ovocytes ayant abouti à un transfert « frais » d'embryon en fonction de l'issue de ce transfert chez 26 familles. Une grossesse clinique a été obtenue dans 38,7% (12/31) des transferts embryonnaires. Nous observons des concentrations, niveaux d'expression et taux similaires de PROK1 dans le microenvironnement folliculaire des ovocytes compétents à une implantation embryonnaire (figure 17, Mann-Whitney, $p=0,8234$, $2570,83 \pm 262,37$ pg/ml versus $2484,88 \pm 458,95$ pg/ml, figure 18, Mann-Whitney, $p=0,5033$, $106,25 \pm 5,69$ % versus $113,76 \pm 10,70$ %, figure 19, Mann-Whitney, $p=0,8551$, 10762 ± 1619 pg versus 15546 ± 4452 pg).

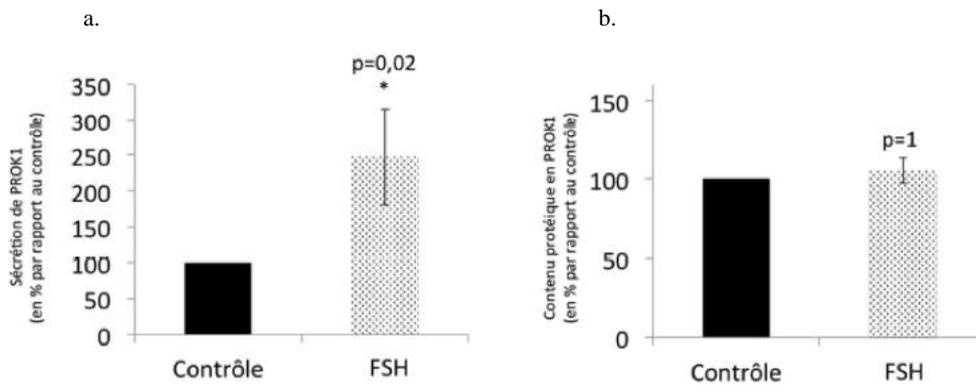


Figure 20 : Niveau d'expression de la protéine PROK1 (en % par rapport au contrôle) dans des cultures de cellules du cumulus (n=4) en réponse à la FSH à 100 U.I./ml pendant 48h par test ELISA. Sécrétion de PROK1 dans le surnageant (a) et contenu protéique en PROK1 dans les cellules du cumulus (b). La concentration a été déterminée grâce au logiciel GraphPad par régression linéaire et rapportée à la quantité totale de protéines dans l'échantillon, puis transformée en pourcentage par rapport au contrôle afin de s'affranchir des variations inter-individuelles. L'analyse statistique a été réalisée sous Sigma Plot à l'aide du test de Mann Whitney (* : $p < 0,05$).

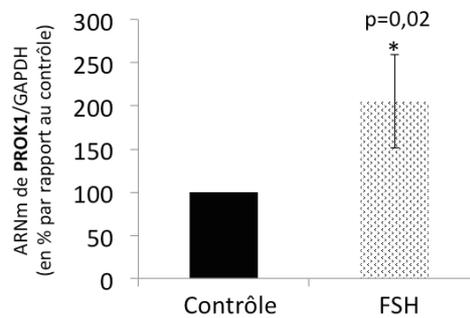


Figure 21: Niveau d'expression du gène de PROK1 rapporté à la GAPDH (en % par rapport au contrôle) dans des cultures de cellules du cumulus (n=4) en réponse à la FSH à 100 U.I./ml pendant 48h par RT-qPCR. Les cellules ont été mises en culture dans du milieu DMEM-F12 avec 1% de streptomycine-gentamicine. Les ARN totaux ont été extraits grâce à un kit spécifique (NucleoSpin® RNA XS, Macherey Nagel) comprenant une étape de DNase. L'ARN de PROK1 a été quantifié par RT-qPCR. (* : $p < 0,05$).

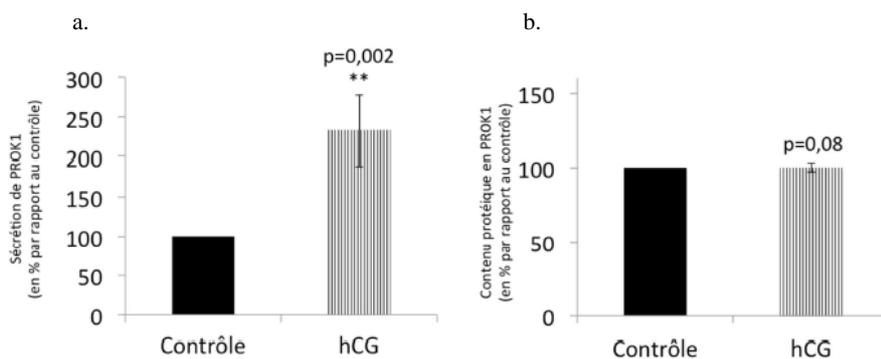


Figure 22 : Niveau d'expression de la protéine PROK1 (en % par rapport au contrôle) dans des cultures de cellules du cumulus (n=5) en réponse à l'hCG à 1 U.I./ml pendant 36h par test ELISA. Sécrétion de PROK1 dans le surnageant (a) et contenu protéique en PROK1 dans les cellules du cumulus (b). La concentration en pg/ml a été déterminée grâce au logiciel GraphPad par régression linéaire et rapportée à la quantité totale de protéines dans l'échantillon, puis transformée en pourcentage par rapport au contrôle afin de s'affranchir des variations inter-individuelles. L'analyse statistique a été réalisée sous Sigma Plot à l'aide du test de Mann Whitney (** : $p < 0,01$).

7. Régulation de l'expression de PROK1 par la FSH

7.1 Régulation de l'expression et de la sécrétion de PROK1 par la FSH

Les surnageants et les extraits protéiques de cellules du cumulus traitées par FSH à 100U.I./ml pendant 48 heures ont été dosés en PROK1 par test ELISA dans le but de mesurer le niveau de sécrétion et d'expression de la protéine PROK1 dans ces échantillons (voir figures 20a et 20b, respectivement). On observe une augmentation significative de la sécrétion de PROK1 dans le surnageant des cellules traitées par FSH (Mann Whitney, $p= 0,02$ figure 20a, 100% versus $247\% \pm 29,3\%$), contrairement à la concentration intracellulaire qui ne semble pas varier dans la condition traitée (Mann Whitney, $p= 1$, figure 20b, 100% versus $105\% \pm 1,2\%$).

7.2 Régulation de l'expression en ARNm de PROK1 par la FSH

Les transcrits de PROK1 ont été quantifiés par RT-qPCR dans des cultures de cellules du cumulus traitées par FSH à 100U.I./ml pendant 48 heures. Nous observons une expression significativement augmentée dans les cellules traitées (Mann Whitney, $p= 0,02$, figure 21, 100% versus $205\% \pm 26,8\%$).

8. Régulation de l'expression de PROK1 par l'hCG

Les surnageants et les extraits protéiques de cellules du cumulus traitées par l'hCG à 1U.I./ml pendant 36 heures ont été dosés en PROK1 par test ELISA dans le but de mesurer le niveau de sécrétion et d'expression de la protéine PROK1 dans ces échantillons (voir figures 20a et 20b, respectivement). On observe une augmentation significative de la sécrétion de PROK1 dans le surnageant des cellules traitées par hCG (Mann Whitney, $p= 0,002$, figure 22a, 100% versus $233\% \pm 19,3\%$) contrairement à la concentration intracellulaire qui ne semble pas varier dans la condition traitée (Mann Whitney, $p= 0,08$, figure 22b, 100% versus $100,1\% \pm 7,8\%$).

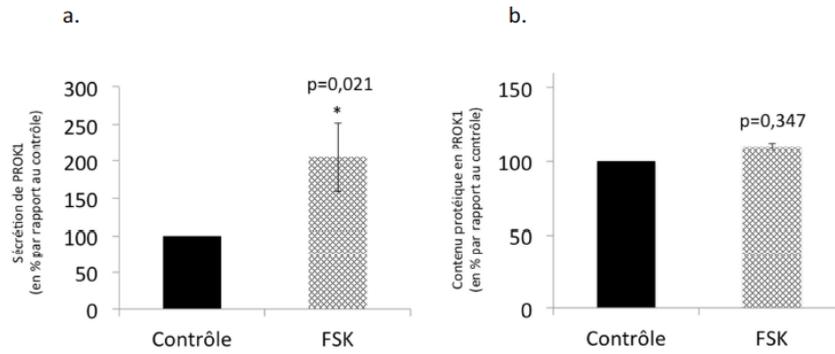


Figure 23 : Niveau d'expression de la protéine PROK1 (en % par rapport au contrôle) dans des cultures de cellules du cumulus (n=4) en réponse à la FSK à 10 μ M pendant 48h par test ELISA. Sécrétion de PROK1 dans le surnageant (a) et contenu protéique en PROK1 dans les cellules du cumulus (b). La concentration en pg/ml a été déterminée grâce au logiciel GraphPad par régression linéaire et rapportée à la quantité totale de protéines dans l'échantillon, puis transformée en pourcentage par rapport au contrôle afin de s'affranchir des variations inter-individuelles. L'analyse statistique a été réalisée sous Sigma Plot à l'aide du test de Mann Whitney (*: $p < 0,05$).

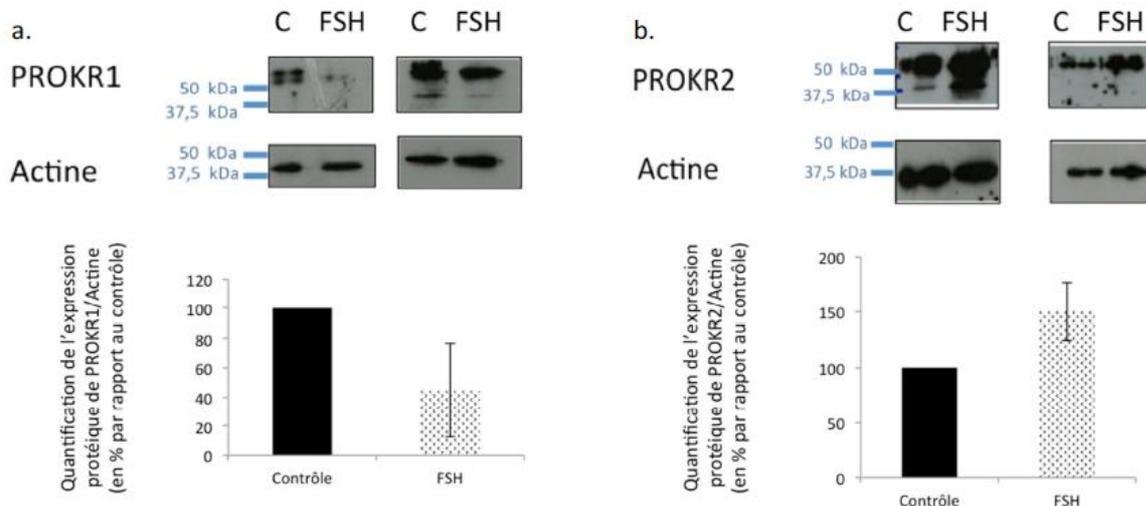


Figure 24 : Niveau d'expression des protéines PROKR1 et PROKR2 dans des cellules du cumulus (n=2) en réponse à la FSH à 100 U.I. / ml pendant 48h par Western Blot. L'intensité des bandes a été quantifiée par le logiciel Image J, et le résultat rapporté en % par rapport au contrôle.

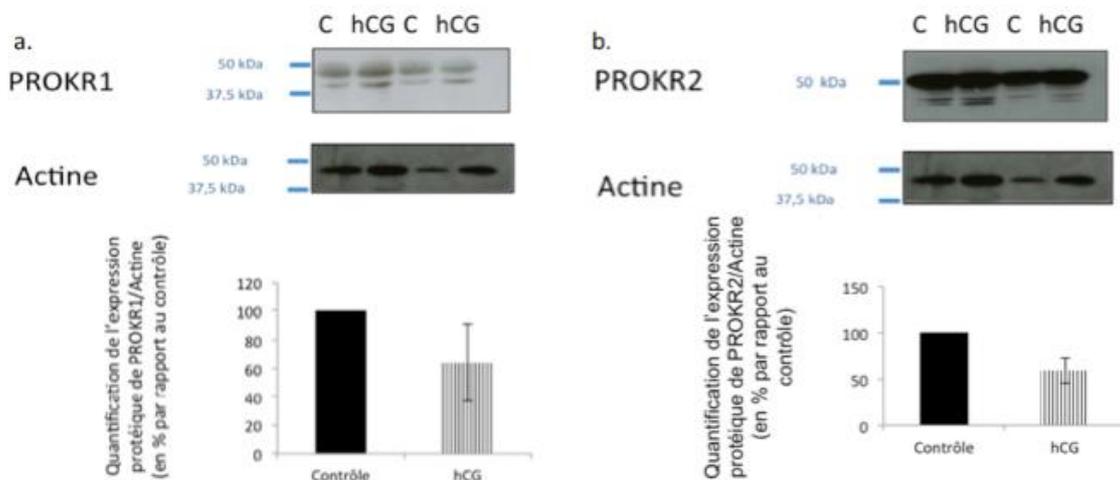


Figure 25 : Niveau d'expression des protéines PROKR1 et PROKR2 dans des cellules du cumulus (n=2) en réponse à l'hCG à 1 U.I. / ml pendant 36h par Western Blot. L'intensité des bandes a été quantifiée par le logiciel Image J, et le résultat rapporté en % par rapport au contrôle.

9. Régulation de l'expression de PROK1 par la FSK

Les surnageants et les extraits protéiques de cellules du cumulus traitées par FSK à 10 μ M pendant 48 heures ont été dosés en PROK1 par test ELISA afin de mesurer le niveau de sécrétion et d'expression de PROK1 dans ces échantillons (figures 23a et 23b, respectivement). On observe une augmentation significative de la sécrétion de PROK1 dans le surnageant des cellules traitées par FSK (Mann Whitney, $p=0,021$, figure 23a, 100% versus 205% \pm 21,8%), contrairement à la concentration intracellulaire qui ne semble pas varier dans la condition traitée (Mann Whitney, $p=0,347$, figure 23b, 100% versus 110% \pm 5,5%).

10. Régulation de l'expression des récepteurs PROKR1/PROKR2 par la FSH

L'expression des récepteurs de PROK1 a été étudiée par Western Blot dans des cellules du cumulus traitées par FSH à 100U.I./ml pendant 48 heures (figure 24a et 24b, respectivement). Ces résultats préliminaires suggèrent une tendance à la diminution pour l'expression de PROKR1, contrairement à celle de PROKR2 qui semblerait augmentée.

11. Régulation de l'expression des récepteurs PROKR1/PROKR2 par l'hCG

L'expression des récepteurs de PROK1 a été étudiée par Western Blot dans des cultures de cellules du cumulus traitées par hCG à 1 U.I./ml pendant 36 heures (figure 25a et 25b, respectivement). Ces résultats préliminaires suggèrent une tendance à la diminution pour l'expression de ces deux récepteurs.

Discussion

Le système PROK1/PROKR tient une place grandissante dans la fertilité féminine (53). Cependant, peu de données sont disponibles à ce jour sur l'expression et les rôles de PROK1 et de ses récepteurs dans la physiologie ovarienne. Dans le but d'approfondir les connaissances du système PROK1/PROKR dans l'acquisition de la compétence ovocytaire, l'objectif de ma thèse a été de caractériser les niveaux d'expression de PROK1 dans le follicule ovarien humain au cours de la folliculogénèse humaine, et de déterminer les régulations hormonales de PROK1 par deux hormones clés de la compétence ovocytaire, la FSH et l'hCG, dans un modèle cellulaire *in vitro* du microenvironnement folliculaire humain.

Au cours de ma thèse, j'ai mis en évidence des variations intra et interindividuelles importantes dans l'expression et la sécrétion de PROK1, ce qui a rendu l'analyse des résultats difficile. Dès les premières expérimentations, nous avons observé une augmentation progressive de la concentration de PROK1 en fonction de la taille folliculaire, suggérant une augmentation de la sécrétion de ce facteur au cours de la folliculogénèse. Malgré la reproductibilité de cette tendance entre les différentes familles analysées, l'analyse groupée des concentrations brutes semblait « écraser » nos résultats, en raison d'une forte variabilité interindividuelle. Nous avons alors tenté de nous en affranchir en « standardisant » la concentration de PROK1 entre les familles, afin de pouvoir comparer les variations intraindividuelles observées pour chacune d'entre elles. Pour cela, la moyenne des concentrations folliculaires de PROK1 de chaque ponction a été réévaluée arbitrairement à 100%, puis la concentration de chaque liquide folliculaire a été recalculée en fonction de cette « standardisation interne ». Nous avons ainsi pu mettre en évidence une augmentation significative de la concentration folliculaire de PROK1 en fonction de la taille, mais également en fonction du statut folliculaire, suggérant le rôle de PROK1 dans l'acquisition de la maturité ovocytaire. J'ai été confronté à la même problématique dans les expériences *in vitro* sur la régulation de la sécrétion de PROK1 par la FSH, l'hCG et la FSK. Pour s'affranchir des variabilités interindividuelles, nous avons fixé le niveau d'expression et de sécrétion de chaque contrôle à 100%, ce qui nous a permis de mettre en évidence l'augmentation significative de la sécrétion de PROK1 par les cellules du cumulus traitées par la FSH, l'hCG et la FSK. L'origine de cette forte variabilité interindividuelle est pour l'instant inconnue. L'existence de polymorphismes dans le gène *PROK1* pourrait contribuer à l'hétérogénéité observée entre les patientes (68).

Au cours de ma thèse, j'ai confirmé l'expression privilégiée de PROK1 dans le microenvironnement folliculaire. Ces résultats soulèvent la question de la source de sécrétion de ce facteur. Des travaux récents du laboratoire ont démontré la participation majeure des cellules de la granulosa, et dans une moindre mesure des cellules du cumulus, dans la sécrétion de PROK1 dans le liquide folliculaire (*données en cours de publication*). Ces données sont en faveur d'une production locale majeure au niveau folliculaire, la concentration de PROK1 étant basse dans le sérum (aux alentours de 50 pg/ml contre 2500 pg/ml dans le liquide folliculaire). De plus, la sécrétion élevée de PROK1 par les cellules folliculaires suggère le rôle de cette protéine dans l'acquisition de la compétence ovocytaire. En effet, la croissance et la maturation des follicules ovariens requièrent un dialogue bidirectionnel entre les cellules folliculaires et l'ovocyte. Ces cellules sécrètent tout au long de la croissance folliculaire des facteurs de croissance autocrines et/ou paracrines qui vont participer à l'acquisition de la compétence ovocytaire. Les cellules folliculaires étant étroitement liées à l'acquisition de la maturité folliculaire, nos résultats suggèrent un rôle de PROK1 dans l'acquisition de la compétence ovocytaire humaine.

Face à l'absence de critères fiables de la qualité folliculaire, l'évaluation de la capacité de l'ovocyte à être fécondé puis à donner un embryon apte à s'implanter est considéré à ce jour comme le meilleur marqueur de l'acquisition de la compétence ovocytaire. Nos résultats ont montré une augmentation significative de la sécrétion de PROK1 au cours de la croissance folliculaire avec un taux élevé en PROK1 dans le microenvironnement des follicules de grandes tailles, considérés comme des follicules plus matures que ceux de petites tailles. De plus, l'augmentation significative des taux de PROK1 dans le liquide folliculaires des ovocytes aptes à la fécondation (ovocyte à 2PN) et au développement embryonnaire (embryons sélectionnés pour le transfert frais dans la cavité utérine), suggère à nouveau un rôle de PROK1 en tant qu'acteur de la compétence ovocytaire humaine.

Ces résultats suggèrent l'utilisation du dosage de PROK1 comme nouveau critère prédictif du potentiel implantatoire de l'embryon en FIV. La technique de dosage par test ELISA est peu onéreuse¹ et permet d'envisager une application en routine. L'augmentation du nombre de patients permettra de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

¹ Moins de 50 centimes d'euros par échantillon dosé pour le consommable.

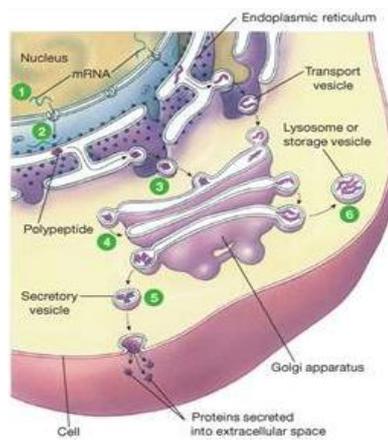
Dans le cadre de notre étude sur les régulations hormonales de la sécrétion de PROK1, nous avons démontré une augmentation de l'expression de l'ARNm et de la sécrétion de PROK1 par les cellules du cumulus en cultures primaires traitées par la FSH, contrairement à l'expression intracellulaire de PROK1 qui reste comparable dans les deux conditions. Nous avons également mis en évidence l'augmentation de la sécrétion de PROK1 par les cellules du cumulus en cultures primaires traitées par hCG, contrairement à l'expression intracellulaire de PROK1 qui reste également comparable dans les deux conditions.

Ces résultats sont en cohérence avec l'augmentation intrafolliculaire de PROK1 observée au cours des étapes tardives de maturation folliculaire chez les patientes de FIV. En effet, la croissance folliculaire et l'acquisition de la compétence ovocytaire dépendent de la FSH et de la LH/CG. Nos résultats suggèrent une participation de PROK1 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 pour évaluer le rôle de PROK1 dans le développement folliculaire.

En revanche, nous avons été surpris de l'absence d'augmentation dans le contenu en PROK1 des cellules traitées par FSH, hCG et FSK. A ce jour, nous proposons deux hypothèses :

La première hypothèse reposerait sur le système de biosynthèse de PROK1, encore largement méconnu à ce jour. Ce système comporte plusieurs étapes : la transcription du gène *PROK1* en ARNm, les modifications post-transcriptionnelles des ARNm, la traduction des ARNm en protéines, les modifications post-traductionnelles des protéines, la maturation des protéines au niveau de l'appareil de Golgi, la sécrétion des protéines dans le milieu extracellulaire, la stabilité des protéines dans le milieu intracellulaire et extracellulaire etc.

- 1 : Passage de l'ARNm vers le cytoplasme
- 2 : Traduction et modifications post-traductionnelles dans le REG
- 3 : Transport vers le Golgi
- 4 : Modifications post-traductionnelles du Golgi



- 5 : Export de la cellule par vésicules sécrétoires
- 6 : Stockage vésiculaire ou adressage aux lysosomes

Figure 26 : Les différentes étapes de la synthèse protéique

Nos résultats correspondraient à un état d'équilibre entre toutes ces étapes à un instant t au sein des cellules du cumulus. Des expérimentations de cinétiques sont actuellement en cours, afin d'étudier les variations potentielles de PROK1 dans le contenu protéique des cellules du cumulus traitées par FSH et hCG en fonction du temps.

La deuxième hypothèse reposerait sur l'induction hormonale de la vitesse de sécrétion des protéines du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. En effet, PROK1 est une protéine sécrétée, contenant un peptide signal de 19 acides aminés (70). Ainsi, les protéines néo-synthétisées au niveau du réticulum granuleux, puis maturées au niveau de l'appareil de Golgi, sont ensuite internalisées dans des vésicules de sécrétions qui sont adressées à la membrane plasmique (figure 26). Nous pourrions envisager que la FSH et l'hCG augmentent l'expression intracellulaire de PROK1 mais également la vitesse de sécrétion des protéines, conduisant ainsi à l'accumulation de PROK1 dans le milieu extracellulaire, sans modification du niveau relatif de PROK1 dans le contenu intracellulaire. Des expérimentations sont actuellement en cours, afin d'étudier l'implication des mécanismes de traduction, de transcription et de dégradation de PROK1 dans l'augmentation de sa concentration dans le milieu extracellulaire.

Concernant les mécanismes d'action de la FSH et de l'hCG sur l'expression et la sécrétion de PROK1, nous avons démontré que l'utilisation de la forskoline, activateur direct de l'adénylate cyclase, induisait les mêmes effets sur l'expression et la sécrétion de PROK1 dans les cellules du cumulus en cultures primaires. En effet, il est établi dans la littérature que la FSH et l'hCG stimulent toutes les deux l'adénylate cyclase, conduisant ainsi à une augmentation de l'AMPc intracellulaire (71). Or, le promoteur de PROK1 possède 2 sites CRE (cAMP response element), qui sont des sites de réponse à l'AMPc. L'ensemble de ces données suggère donc la régulation hormonale par la FSH et l'hCG de l'expression de l'ARNm de PROK1 *via* la fixation de facteurs régulateurs sur ces deux séquences CRE en réponse à l'augmentation d'AMPc intracellulaire. Des expérimentations sont en cours afin de déterminer l'implication effective de la voie AMPc dans l'induction de la sécrétion de PROK1 par la FSH et l'hCG, *via* l'utilisation d'inhibiteurs de la voie AMPc (Rp-AMPc et inhibiteur de la PKA).

Concernant les régulations hormonales des récepteurs de PROK1 dans les cellules du cumulus en cultures primaires, nos premiers résultats suggèrent une régulation différentielle de leurs expressions par la FSH et l'hCG. En effet, nos résultats préliminaires suggèrent une

régulation différentielle de l'expression de ces deux récepteurs sous FSH, avec une tendance à la diminution pour PROKR1, contrairement à l'expression de PROKR2 qui semble augmentée. En revanche, nos premiers résultats suggèrent une diminution conjointe de l'expression des deux récepteurs sous hCG. Une littérature grandissante dans d'autres organes (comme le placenta ou le cœur) confère des rôles distincts pour ces deux récepteurs dans la physiologie, avec des implications dans la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire pour PROKR1, alors que PROKR2 serait associé à la perméabilité et à la fenestration cellulaire (72,73). Ces rôles différentiels pour les récepteurs de PROK1 pourraient avoir des implications importantes dans la physiologie ovarienne et sont à mettre en parallèle avec l'évolution folliculaire, la mucification des cellules du cumulus et la libération de l'ovocyte lors de l'ovulation, ces événements mettant en jeu les mécanismes précédemment cités. De nouvelles expérimentations sont en cours de réalisation afin de confirmer ou d'infirmer ces premiers résultats. Nous testons actuellement d'autres protéines de standardisation que l'actine, afin de nous assurer de l'absence de régulation hormonale de cette protéine sous FSH, et plus particulièrement sous hCG. En effet, nos premiers résultats semblent montrer une augmentation de l'intensité des bandes d'actine dans les conditions « hCG », ce qui entraîne une baisse relative de l'expression des deux récepteurs lors de la quantification par le logiciel Image J de nos Western Blot. De plus, nous avons pour projet d'utiliser un appareil de détection de la chimiluminescence pour nos prochaines expérimentations, afin d'être quantitatif (utilisation de l'appareil My ECL-Imager de ThermoScientific à la place de la révélation sur films photographiques).

Au cours de ma thèse, j'ai pu démontrer l'augmentation significative des concentrations de PROK1 dans le liquide folliculaire au cours des étapes finales de maturation ovocytaire, et caractériser l'augmentation significative de la sécrétion de PROK1 par la FSH et l'hCG dans des cellules du cumulus en cultures primaires. Ces premiers résultats intéressants suggèrent le rôle de PROK1 dans l'acquisition de la compétence ovocytaire, participent à l'amélioration de la compréhension de la complexité du dialogue follicule/ovocyte pour laquelle de nombreuses régulations encore inconnues restent à établir, et engagent à approfondir les recherches sur l'utilisation de PROK1 dans l'identification des embryons à fort potentiel implantatoire en FIV.

THESE SOUTENUE PAR : Sami BOULAHFA

TITRE :

PROKINETICINE 1 : NOUVEL ACTEUR DE LA PHYSIOLOGIE OVOCYTAIRE HUMAINE

CONCLUSION :

L'infertilité touche environ 15% des couples en âge de procréer, soit un couple sur six. Depuis 1978, la fécondation *in vitro* (FIV) a révolutionné la médecine reproductive en permettant la naissance de plus de 5 millions d'enfants à l'échelle mondiale. Malgré de nombreux progrès, l'enjeu actuel reste l'augmentation des taux de grossesse en FIV, puisque 3 cycles de FIV sur 4 sont soldés par un échec avec plus de 80% des embryons transférés qui ne s'implantent pas. Récemment, la prokinéticine 1 (PROK1) a été proposée comme nouveau biomarqueur prédictif de l'implantation embryonnaire, suggérant un rôle pour ce facteur dans la folliculogénèse, et plus particulièrement dans l'acquisition par l'ovocyte de la compétence à donner un embryon apte au développement et à l'implantation dans la cavité utérine. Mon projet de thèse a porté sur l'étude du rôle de PROK1 dans l'acquisition de la compétence ovocytaire, avec pour objectifs : (1) d'évaluer la concentration de PROK1 en fonction de la maturité ovocytaire dans le liquide de 351 follicules ovariens provenant de 34 couples pris en charge en FIV au CHU de Grenoble, ainsi que (2) de caractériser les régulations hormonales de l'expression de PROK1 et de ses récepteurs par les deux hormones clés de la folliculogénèse, la FSH et l'hCG, dans des cultures primaires de cellules folliculaires collectées dans le cadre de FIV-ICSI chez 13 couples pris en charge au CHU de Grenoble. Mes résultats ont démontré : (1) une augmentation significative de la concentration de PROK1 au cours de la croissance folliculaire (Test ELISA, Mann-Whitney, $n= 351$, $p<0,001$) ; (2) une augmentation significative de la sécrétion de PROK1 sous FSH (100 UI/ml, Test ELISA, $n= 4$, Mann-Whitney, $p= 0,02$), sous hCG (1 U.I./ml, Test ELISA, $n= 5$, Mann-Whitney, $p=0,002$), et sous forskolin, un activateur de la voie AMPc (10 μ M, Test ELISA, $n= 4$, Mann-Whitney, $p= 0,021$) dans de cultures primaires de cellules de cumulus traitées pendant 48h ; et (3) une augmentation significative de l'expression de l'ARNm de PROK1 sous FSH (100 UI/ml, qRT-PCR, $n= 4$, Mann-Whitney, $p=0,02$) dans de cultures primaires de cellules de cumulus traitées pendant 48h. Ainsi, mes résultats ont démontré l'augmentation significative de l'expression de PROK1 *in vivo* et *in vitro* au cours de la maturation folliculaire. Des expérimentations sont en cours pour déterminer le rôle de PROK1 dans l'acquisition de la compétence ovocytaire à l'implantation embryonnaire en FIV. Si ces résultats préliminaires se confirment, le dosage de PROK1 pourrait être considéré comme un nouveau biomarqueur de routine pour le choix de l'embryon à réimplanter, permettant ainsi d'envisager l'augmentation des taux de grossesse en FIV.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 20/7/2015

LE DOYEN ET PRESIDENT DE LA THESE

Pr. Christophe RIBUOT



Bibliographie

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*. déc 2008;14(6):605- 21.
2. Kamphuis EI, Bhattacharya S, van der Veen F, Mol BWJ, Templeton A. Are we overusing IVF? *The BMJ*. 28 janv 2014;348:g252.
3. Brouillet S, Hoffmann P, Thomas-Cadi C, Bergues U, Feige J-J, Alfaidy N, et al. PROK1, biomarqueur de l'implantation embryonnaire? *Gynécologie Obstétrique Fertil*. sept 2013;41(9):562- 5.
4. RITES & DIVINITÉS DE LA FERTILITÉ & FÉCONDITÉ [Internet]. Encyclopædia Universalis. [cité 14 juill 2015]. Disponible sur: <http://www.universalis.fr/encyclopedie/rites-et-divinites-de-la-fertilite-et-fecondite/>
5. Insee - Définitions et méthodes - Taux de fécondité [Internet]. [cité 14 juill 2015]. Disponible sur: <http://www.insee.fr/fr/methodes/default.asp?page=definitions/taux-fecondite.htm>
6. Insee - Population - Bilan démographique 2014 - Fécondité [Internet]. [cité 14 juill 2015]. Disponible sur: http://www.insee.fr/fr/themes/detail.asp?ref_id=bilan-demo&page=donnees-detaillees/bilan-demo/pop_age3c.htm
7. Leridon H, Spira A. Problems in measuring the effectiveness of infertility therapy. *Fertil Steril*. avr 1984;41(4):580- 6.
8. Navot D, Bergh RA, Williams MA, Garrisi GJ, Guzman I, Sandler B, et al. Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. *The Lancet*. juin 1991;337(8754):1375- 7.
9. Oogenèse [Internet]. [cité 14 juill 2015]. Disponible sur: <http://www.embryology.ch/francais/cgametogen/oogenese01.html>
10. Virant-Klun I. Postnatal oogenesis in humans: a review of recent findings. *Stem Cells Cloning Adv Appl*. 20 mars 2015;8:49- 60.
11. Chapitre 2: Ovogenèse, folliculogenèse, fécondation [Internet]. [cité 14 juill 2015]. Disponible sur: http://www.uvp5.univ-paris5.fr/wikinu/docvideos/Grenoble_1011/faure_anne_karen/faure_anne_karen_p02/
12. Goto T, Jones GM, Lolatgis N, Pera MF, Trounson AO, Monk M. Identification and characterisation of known and novel transcripts expressed during the final stages of human oocyte maturation. *Mol Reprod Dev*. mai 2002;62(1):13- 28.
13. Senbon S, Hirao Y, Miyano T. Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from in vitro culture. *J Reprod Dev*. août 2003;49(4):259- 69.
14. Robert B Gilchrist ML. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*. 2008;14(2):159- 77.
15. Russell DL, Robker RL. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update*. juin 2007;13(3):289- 312.
16. Royère D la communication de D. Maturation ovocytaire: peut-on définir la compétence d'un ovocyte? *Datarevues0368231500355-C28* [Internet]. 10 mars 2008 [cité 3 juin 2015]; Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/en/article/117943>
17. Encyclopédie Larousse en ligne - cycle menstruel [Internet]. [cité 19 juill 2015]. Disponible sur: http://www.larousse.fr/encyclopedie/divers/cycle_menstruel/69321
18. Fauser BCJM, van Heusden AM. Manipulation of Human Ovarian Function: Physiological Concepts and Clinical Consequences¹. *Endocr Rev*. févr 1997;18(1):71- 106.
19. Physiologie ovarienne [Internet]. EM-Consulte. [cité 4 août 2015]. Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/article/977524/physiologie-ovarienne>

20. Holstein A-F, Schulze W, Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 14 nov 2003;1:107.
21. Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. août 1998;9(4):411 - 6.
22. Ge R, Chen G, Hardy MP. The Role of the Leydig Cell in Spermatogenic Function. In: Cheng CY, éditeur. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis* [Internet]. Springer New York; 2009 [cité 14 juill 2015]. p. 255- 69. Disponible sur: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-09597-4_14
23. Dadoune JP. Modifications nucléaires des spermatides et des spermatozoïdes □: évaluation de la maturité nucléaire. *Contracept Fertil Sex*. 1991;19(10):833- 9.
24. A. JARDIN VI. Fécondance in vivo et in vitro de spermatozoïdes épидидymaires humains immatures. *Reprod Nutr Dév*. 1988;28(5).
25. Lambert H, Overstreet JW, Morales P, Hanson FW, Yanagimachi R. Sperm capacitation in the human female reproductive tract. *Fertil Steril*. 1985;43(2):325- 7.
26. Travert C, Carreau S, Galeraud-Denis I. La capacitation in vitro. *Gynécologie Obstétrique Fertil*. juin 2009;37(6):523- 8.
27. Chapitre 2 □: Ovogenèse, folliculogénèse, fécondation [Internet]. [cité 14 juill 2015]. Disponible sur: http://www.uvp5.univ-paris5.fr/wikinu/docvideos/Grenoble_1011/faure_anne_karen/faure_anne_karen_p02/
28. Larsen W. *Embryologie humaine*. De Boeck Supérieur; 2003. 572 p.
29. Aplin JD. The cell biological basis of human implantation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. oct 2000;14(5):757- 64.
30. Schild RL, Knobloch C, Dorn C, Fimmers R, van der Ven H, Hansmann M. Endometrial receptivity in an in vitro fertilization program as assessed by spiral artery blood flow, endometrial thickness, endometrial volume, and uterine artery blood flow. *Fertil Steril*. févr 2001;75(2):361- 6.
31. La fenêtre implantatoire. /data/revues/03682315/00310005/440/ [Internet]. 9 mars 2008 [cité 2 août 2015]; Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/en/article/114507>
32. Evain-Brion D. [The 2 differentiation pathways of the human trophoblast]. *Gynécologie Obstétrique Fertil*. août 2001;29(7-8):497- 502.
33. Kormi Nouri R, Kormi Nouri R. Psycho-Social aspects of infertility. *J Reprod Infertil*. :57- 68.
34. Agence de la biomédecine - rapport médical et scientifique [Internet]. [cité 22 juill 2015]. Disponible sur: <http://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2012/donnees/procreation/01-amp/synthese.htm>
35. Décision du 11 mars 2005 de l'Union nationale des caisses d'assurance maladie relative à la liste des actes et prestations pris en charge ou remboursés par l'assurance maladie.
36. de Kretser DM. Male infertility. *Lancet*. 15 mars 1997;349(9054):787- 90.
37. Hargreave T, Ghosh C. Male fertility disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am*. déc 1998;27(4):765- 82, vii - viii.
38. Code de la santé publique - Article L2141-2. Code de la santé publique.
39. Ibérico G, Vioque J, Ariza N, Lozano JM, Roca M, Llácer J, et al. Analysis of factors influencing pregnancy rates in homologous intrauterine insemination. *Fertil Steril*. mai 2004;81(5):1308- 13.
40. CNGOF [Internet]. [cité 21 juill 2015]. Disponible sur: <http://www.cngof.fr/>
41. Huirne JA, Homburg R, Lambalk CB. Are GnRH antagonists comparable to agonists for use in IVF? *Hum Reprod*. 11 janv 2007;22(11):2805- 13.
42. Husson M-C. Thériaque® : base de données indépendante sur le médicament, outil de bon usage pour les professionnels de santé. *Ann Pharm Fr*. nov 2008;66(5-6):268- 77.

43. Page CP. Pharmacologie intégrée. De Boeck Supérieur; 1999. 622 p.
44. Elnashar AM. Progesterone rise on the day of HCG administration (premature luteinization) in IVF: An overdue update. *J Assist Reprod Genet.* 23 févr 2010;27(4):149- 55.
45. Hanover JA, Elting J, Mintz GR, Lennarz WJ. Temporal aspects of the N- and O-glycosylation of human chorionic gonadotropin. *J Biol Chem.* 9 oct 1982;257(17):10172- 7.
46. Eppig JJ. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature.* 11 oct 1979;281(5731):483- 4.
47. Salle B, Bied-Damon V, Benchaib M, Desperes S, Gaucherand P, Rudigoz RC. Preliminary report of an ultrasonography and colour Doppler uterine score to predict uterine receptivity in an in-vitro fertilization programme. *Hum Reprod Oxf Engl.* juin 1998;13(6):1669- 73.
48. Chamayou S, Patrizio P, Storaci G, Tomaselli V, Alecci C, Ragolia C, et al. The use of morphokinetic parameters to select all embryos with full capacity to implant. *J Assist Reprod Genet.* 13 avr 2013;30(5):703- 10.
49. Zarei S, Arefi S, Zarnani AH, Mohammadzadeh A, Ghaffari M, Jeddi-Tehrani M, et al. Repeated Implantation Failures Following Embryo Transfer. *J Reprod Infertil.* :380- 96.
50. Lin DC-H, Bullock CM, Ehlert FJ, Chen J-L, Tian H, Zhou Q-Y. Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 31 mai 2002;277(22):19276- 80.
51. 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.* 30 août 2001;412(6850):877- 84.
52. Dodé C, Rondard P. PROK2/PROKR2 Signaling and Kallmann Syndrome. *Front Endocrinol [Internet].* 12 avr 2013 [cité 15 juin 2015];4. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624607/>
53. Maldonado-Pérez D, Evans J, Denison F, Millar RP, Jabbour HN. Potential roles of the prokineticins in reproduction. *Trends Endocrinol Metab.* mars 2007;18(2):66- 72.
54. Negri L, Lattanzi R, Giannini E, Colucci M, Margheriti F, Melchiorri P, et al. Impaired nociception and inflammatory pain sensation in mice lacking the prokineticin receptor PKR1: focus on interaction between PKR1 and the capsaicin receptor TRPV1 in pain behavior. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 21 juin 2006;26(25):6716- 27.
55. Monnier J, Samson M. Prokineticins in angiogenesis and cancer. *Cancer Lett.* 28 oct 2010;296(2):144- 9.
56. Kisliouk T, Friedman A, Klipper E, Zhou Q-Y, Schams D, Alfaidy N, et al. Expression pattern of prokineticin 1 and its receptors in bovine ovaries during the estrous cycle: involvement in corpus luteum regression and follicular atresia. *Biol Reprod.* mai 2007;76(5):749- 58.
57. 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.* juin 2003;162(6):1881- 93.
58. Kisliouk T, Podlovni H, Spanel-Borowski K, Ovadia O, Zhou Q-Y, Meidan R. Prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and BV8) in the bovine ovary: expression and role as mitogens and survival factors for corpus luteum-derived endothelial cells. *Endocrinology.* sept 2005;146(9):3950- 8.
59. 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 Anat Anz Off Organ Anat Ges.* nov 2005;187(5-6):529- 37.
60. Gao M-Z, Zhao X-M, Sun Z-G, Hong Y, Zhao L-W, Zhang H-Q. 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.* févr 2011;95(2):673- 8.
61. Battersby S, Critchley HOD, 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.* mai 2004;89(5):2463- 9.
 62. Brouillet S, Hoffmann P, Feige J-J, Alfaidy N. EG-VEGF: a key endocrine factor in placental development. *Trends Endocrinol Metab.* oct 2012;23(10):501- 8.
 63. Alfaidy N, Hoffmann P, Boufettal H, Samouh N, Aboussaouira T, Benharouga M, et al. The Multiple Roles of EG-VEGF/PROK1 in Normal and Pathological Placental Angiogenesis. *BioMed Res Int [Internet].* 2014 [cité 4 août 2015];2014. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4052057/>
 64. S Brouillet PM. EG-VEGF controls placental growth and survival in normal and pathological pregnancies: case of fetal growth restriction (FGR). *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2012;
 65. Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications - Hoffmann - 2008 - *Journal of Cellular and Molecular Medicine - Wiley Online Library [Internet].* [cité 4 août 2015]. Disponible sur: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1582-4934.2008.00554.x/full>
 66. Shaw JLV, 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.* oct 2010;94(5):1601- 8.e1.
 67. 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.
 68. Su M-T, Lin S-H, Lee I-W, Chen Y-C, Hsu C-C, Pan H-A, et al. Polymorphisms of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor gene and its receptor genes are associated with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod Oxf Engl.* nov 2010;25(11):2923- 30.
 69. O'Leary T, Heindryckx B, Lierman S, Van der Jeught M, Duggal G, De Sutter P, et al. Derivation of human embryonic stem cells using a post-inner cell mass intermediate. *Nat Protoc.* 10 janv 2013;8(2):254- 64.
 70. Bullock CM, Li J-D, Zhou Q-Y. Structural determinants required for the bioactivities of prokineticins and identification of prokineticin receptor antagonists. *Mol Pharmacol.* mars 2004;65(3):582- 8.
 71. Fatemi HM, Blockeel C, Devroey P. Ovarian stimulation: today and tomorrow. *Curr Pharm Biotechnol.* mars 2012;13(3):392- 7.
 72. 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.* 1 janv 2009;81(1):28- 37.
 73. 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 Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* sept 2007;21(11):2980- 93.

*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 ».