



Caractérisation de l'impact de la dose de stimulation ovarienne sur la sécrétion folliculaire de PROK1 chez des patientes prises en charge en fécondation in vitro

Carole Rosso

► To cite this version:

Carole Rosso. Caractérisation de l'impact de la dose de stimulation ovarienne sur la sécrétion folliculaire de PROK1 chez des patientes prises en charge en fécondation in vitro. Gynécologie et obstétrique. 2018. dumas-01908694

HAL Id: dumas-01908694

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01908694>

Submitted on 9 Jan 2019

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>

UNIVERSITE GRENOBLE-ALPES

U.F.R DE MEDECINE DE GRENOBLE

DEPARTEMENT DE MAÏEUTIQUE

**CARACTERISATION DE L'IMPACT DE LA DOSE DE
STIMULATION OVARIENNE SUR LA SECRETION
FOLLICULAIRE DE PROK1 CHEZ DES PATIENTES
PRISES EN CHARGE EN FECONDATION IN VITRO.**

Par : ROSSO – Carole

[Données à caractère personnel]

Soutenu le 18/06/2018

En vue de l'obtention du Diplôme d'Etat de Sage-femme

5^{ème} année d'étude en Maïeutique

Caractérisation de l'impact de la dose de stimulation ovarienne sur la sécrétion folliculaire de PROK1 chez des patientes prises en charge en fécondation in vitro.

Directrice de mémoire : Docteur Sophie BROUILLET

MCU-PH du CHU Grenoble-Alpes

ROSSO Carole

Etudiante en 5^{ème} année d'étude en maïeutique

Université Grenoble Alpes – UFR de Médecine – Département Maïeutique

Coordonnées :

[Données à caractère personnel]

Résumé et mots clés

La validation de nouveaux biomarqueurs prédictifs de l'implantation embryonnaire est une priorité en fécondation *in vitro* (FIV) afin d'améliorer les taux de grossesse. En 2016, le dosage folliculaire de la prokinéticine 1 (PROK1) a été décrit comme nouveau biomarqueur prédictif des chances de grossesse, mais sa régulation folliculaire reste largement méconnue. L'objectif de mon stage a été d'étudier l'impact de la dose de FSH de stimulation ovarienne sur la sécrétion folliculaire de PROK1 chez des patientes prises en charge en FIV au CHUGA. Nos résultats montrent une augmentation significative de la concentration folliculaire de PROK1 avec des doses de FSH ≥ 200 UI/jour ($n=30$, $p=0,016$). Ces premiers résultats suggèrent que la valeur prédictive du dosage folliculaire de PROK1 dans l'évaluation des chances de grossesse en FIV pourrait être dépendante des doses de stimulation, et soulève ainsi l'intérêt d'établir des sous-groupes et de nouvelles valeurs seuils en fonction des doses de stimulation reçues.

Mots clés : AMP - FIV – Biomarqueurs - PROK1 – FSH

The validation of new predictive biomarkers of embryo implantation in *in vitro* fertilization (IVF) is mandatory to improve pregnancy rates. In 2016, Prokineticin 1 (PROK1) quantification in follicular fluid has been reported as a new predictive biomarker of IVF success, however little is known about its follicular regulation. The objective of my study was to evaluate the impact of FSH stimulation dose in follicular PROK1 secretion in IVF patient in CHUGA. The results show a significant increase of follicular PROK1 concentration in patient receiving FSH stimulation dose $\geq 200\text{IU/day}$ ($n = 30$, $p = 0.016$). These preliminary results suggest that PROK1 predictive value in follicular fluid could be highly dependant of FSH treatment, and therefore point out the necessity to characterize sub-groups and new cut-offs according to FSH stimulation dose.

Key words: PMA – FIV – Biomarker – PROK1 – FSH

Remerciement

Je remercie les membres du Jury :

- Président du Jury : Mme SEGUIN Chantal, Directrice du Département de Maïeutique de l'UFR de Médecine, Université Grenoble-Alpes
- Co-Président du jury : Mme le Professeur HOFFMANN Pascale, PU-PH en Gynécologie Obstétrique à l'Hôpital Couple Enfant du CHU Grenoble-Alpes
- Sage-femme invitée : Mme MACK LAURENT Delphine, Sage-femme faisant fonction de cadre à l'HCE/CHU de Grenoble-Alpes
- Directrice de mémoire : Mme le Dr BROUILLET Sophie, MCU-PH du CHU Grenoble-Alpes
- Sage-femme co-directeur : Mme BAUDON Claire, Sage-femme enseignante du Département de Maïeutique de l'UFR de Médecine Université Grenoble Alpes.

Je remercie plus particulièrement :

Mme le Docteur Sophie BROUILLET, MCU-PH du CHU Grenoble-Alpes, Directrice de ce mémoire ;

Pour son soutien, sa patience, ses connaissances et ses immenses compétences pédagogiques. C'était une chance et un plaisir pour moi de travailler sur ce projet avec elle. J'ai découvert grâce à elle le domaine de la recherche et je garderai ses précieux conseils à l'esprit. Je tiens à lui exprimer ma sincère gratitude ;

Mme BAUDON Claire, Sage-femme enseignante du Département de Maïeutique de l'UFR de Médecine Université Grenoble Alpes, sage-femme guidante ;

Pour ses conseils dans la construction du mémoire de fin d'étude ;

Mesdames, Chloé BARON ainsi que Laura SAMMUT ;

Pour la collaboration et l'aide apporté, durant l'élaboration de ce mémoire ;

Mesdames, RAYNAUD Brigitte, KADERBAY Sunila ainsi que SPIZZI Manon ;

Pour leur soutien moral et leur aide durant ces 5 années d'étude.

Table des matières

Abréviation.....	1
Introduction	3
I. Les étapes de la FIV	3
a) Le cycle menstruel physiologique : ANNEXE 1	3
b) La stimulation.....	3
c) La ponction et la mise en fécondation.....	5
d) La culture embryonnaire et le choix des embryons.....	6
II. Les résultats limités de la FIV	7
III. La Prokinéticine 1 : nouveau biomarqueur en FIV	8
a) Découverte des prokinéticines.....	8
b) PROK1 : biomarqueur prédictif des chances d'implantation en FIV	9
c) Rôle de la FSH dans la sécrétion ovarienne de PROK1 ?.....	9
IV. Les objectifs de l'étude.....	9
Matériel et méthodes	10
V. Type d'étude, lieu et population.....	10
VI. Stimulation ovarienne	11
VII. Ponction.....	11
VIII. Collecte du liquide folliculaire	11
IX. Quantification de PROK1 par test ELISA	12
X. Statistiques	13

Résultats	14
I. Flow chart de l'étude.....	14
II. Les caractéristiques cliniques des patientes	15
III. Concentration de PROK1 dans le liquide folliculaire global en fonction de la dose de FSH administrée	16
Discussion	18
Conclusion.....	22
Bibliographie	23
ANNEXE 1 : le cycle menstruel physiologique.....	25
ANNEXE 2 : Les différents types de FSH commercialisées	26
ANNEXE 3 : Les scores morfo-cinetiques embryonnaires.....	28
Le résumé	29

Abréviation

ABM : Agence de la Biomédecine

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

AMP : Assistance Médicale à la Procréation

ARN : Acide Ribo Nucléique

ARNm : ARN messenger

CECOS : Centre d'étude et de conservation des œufs et du sperme humains

CCO : Complexe cumulo-ovocytaire

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CHUGA : Centre Hospitalier universitaire Grenoble Alpes

CRB : Centre de Ressources Biologiques

EG-VEGF : endocrine gland-derive vascular endothelial growth factor

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FIV : fécondation in vitro

FIV ICSI : fécondation in vitro et injection intra cytoplasmique de spermatozoïde

FSH : Follicle Stimulating Hormone

GnRH : Gonadotropin Releasing Hormon

LH : Luteinizing Hormone

PMA : Procréation médicalement assistée

PROK : Prokinéticine

PROKR : Récepteur des prokinétines

Introduction

L'infertilité se définit comme l'absence de grossesse après un an de rapports sexuels réguliers non protégés (Organisation Mondiale de la Santé (OMS)) (1). L'infertilité correspond donc à une aptitude diminuée à concevoir spontanément, et se distingue ainsi de la stérilité qui représente une incapacité définitive à procréer (1). L'infertilité est en augmentation et représente un problème de santé publique majeur. Elle touche actuellement plus de 80 millions de couples dans le monde (2). Les causes d'infertilité peuvent être d'origine féminine, masculine, mixte ou inexpliquée. Les patients confrontés à l'infertilité et désireux d'avoir un enfant peuvent recourir à plusieurs solutions, dont l'assistance médicale à la procréation (AMP). En France, les 3 principales techniques d'AMP sont l'insémination intra-utérine (IIU), la fécondation *in vitro* conventionnelle (FIVc), et la FIV assistée par micro-injection de spermatozoïde (FIV-ICSI, pour *intra cytoplasmic sperm injection*). La FIV est la technique d'AMP la plus utilisée (3).

I. Les étapes de la FIV

a) Le cycle menstruel physiologique : ANNEXE 1

b) La stimulation

L'objectif de la stimulation ovarienne est double : obtenir la croissance simultanée de plusieurs follicules tout en inhibant l'ovulation spontanée. Pour y parvenir, plusieurs protocoles de stimulation sont disponibles (protocole long, protocole court, protocole sur cycle naturel, etc.) permettant d'apporter un traitement « sur mesure », adapté à la situation de chaque couple. Chaque protocole est composé de 3 phases : une phase de blocage de l'ovulation, une phase de stimulation et une phase de déclenchement de l'ovulation.

- La phase de blocage

Le blocage de l'ovulation est assuré par l'administration répétée d'agoniste ou d'antagoniste de la GnRH, permettant la mise au repos de l'hypophyse et des ovaires en vue d'inhiber l'ovulation spontanée. Les protocoles agonistes sont basés sur l'administration initiale d'agonistes de la GnRH, ce qui occasionne premièrement une libération importante de FSH et de LH (c'est l'effet « flare-up ») puis secondairement une inhibition de la sécrétion gonadotrope. Par opposition, le protocole antagoniste est basé sur l'administration d'un antagoniste du récepteur à la GnRH qui entraîne une chute immédiate des taux circulants de LH et de FSH.

- La phase de croissance folliculaire

La stimulation de la croissance simultanée de plusieurs follicules est assurée par des injections quotidiennes de FSH (parfois en association avec la LH) (Liste des gonadotrophines utilisées dans le cadre de FIV : ANNEXE 2). La dose de stimulation est adaptée à chaque femme. Lors de la stimulation ovarienne, le développement des follicules est suivi par échographie endovaginale (compte du nombre et mesure du diamètre des follicules), et par dosages hormonaux des estradiols (E2) et de LH tous les 2-3 jours, afin de mesurer la réponse des ovaires au traitement.

- La phase de déclenchement des étapes finales de maturation ovocytaire

La maturation finale des follicules est déclenchée par une injection de choriogonadotrophine alfa (Ovitrelle®) ou d'agoniste de la GnRH (Décapeptyl®), en substitut du pic de LH endogène qui est réprimé par les traitements administrés. Le déclenchement est programmé lorsqu'il existe une majorité de follicules supérieurs à 15mm (les plus gros atteindront 19-20mm) et que le taux d'œstradiol 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 est crucial, les follicules étant ponctionnées juste avant l'ovulation, soit 36 heures après le déclenchement.

c) La ponction et la mise en fécondation

La ponction est réalisée au bloc opératoire (Figure 1). Le contenu de chaque follicule dont la taille est supérieure à 10mm est aspiré. Le liquide folliculaire contenant les complexes cumulo-ovocytaires (CCO) en suspension est collecté dans des tubes préchauffés. 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 ». Les CCO sont ensuite isolés du liquide folliculaire au microscope, puis mis en fécondation avec les spermatozoïdes capités (frais ou congelés, conjoint ou donneur) selon deux techniques :

- La FIV conventionnelle (Figure 2), qui consiste à mettre en contact les complexes cumulo-ovocytaires et des spermatozoïdes *in vitro*. La fécondation a lieu spontanément en quelques heures.
- La FIV-ICSI (Figure 2), qui consiste à choisir un spermatozoïde en fonction de critères morphologiques et à l'injecter dans le cytoplasme d'un ovocyte mature préalablement décoronisé.

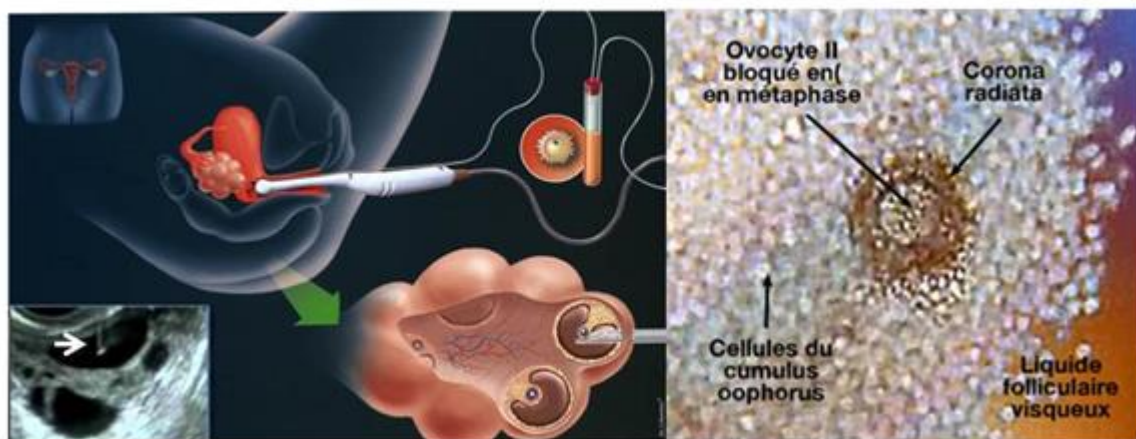


Figure 1 : Ponction ovarienne des follicules matures (à gauche) et recherche des CCO (à droite).
A gauche, on remarque l'aiguille (indiquée par la flèche blanche) aspirant le contenu d'un follicule de 20 mm.

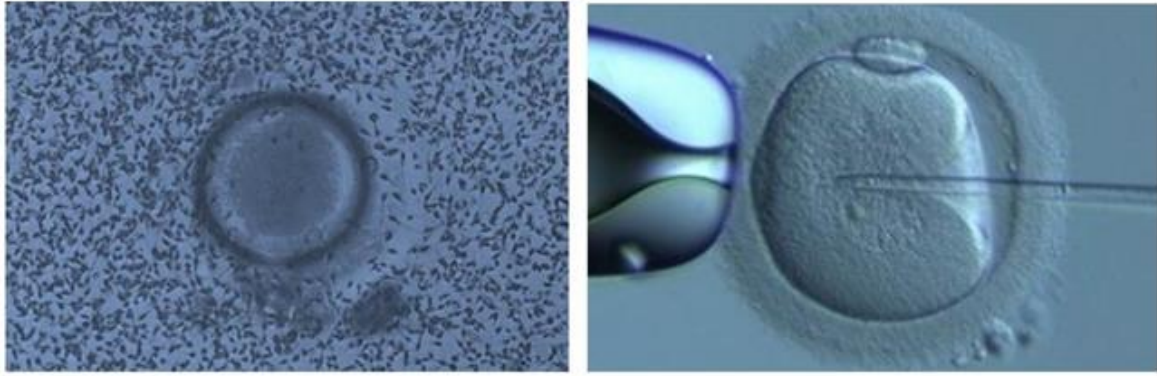


Figure 2 : La FIVc (à gauche) et la FIV-ICSI (à droite).

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

d) La culture embryonnaire et le choix des embryons

Les ovocytes fécondés sont ensuite mis en culture individuellement à 37°C. Le développement des embryons est évalué quotidiennement selon des critères morphologiques et cinétiques (Figures 3 et 4, et ANNEXE 3). L'établissement de ces critères permet d'estimer le potentiel implantatoire de chaque embryon, et par conséquent le choix de l'embryon ou des embryons à transférer dans la cavité utérine ou à congeler pour un transfert ultérieur.

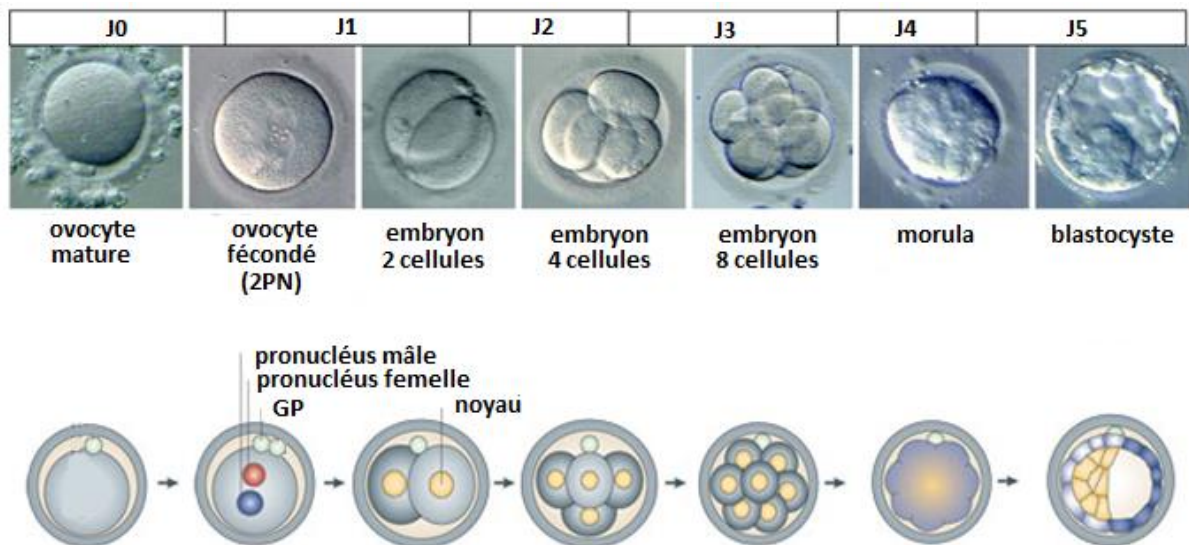


Figure 3 : Développement embryonnaire précoce.

J = Jour, PN = pronoyaux, GP = globules polaires.

Adapté de <http://www.nature.com/nrm/journal/v6/n12/images/nrm1782-i1.jpg>.



Figure 4 : Embryons à J2.

A gauche, embryon à haut potentiel implantatoire, ou « top-embryon », selon les critères morphocinétiques en vigueur dans notre centre d'AMP : présence de quatre blastomères symétriques non multinucléés avec absence de fragment.

A droite, embryon de potentiel implantatoire intermédiaire : présence de quatre blastomères symétriques non multinucléés avec présence de fragments (indiqués par les flèches blanches).

II. Les résultats limités de la FIV

Depuis 1978, la FIV a révolutionné la prise en charge des couples infertiles en contribuant à la naissance de plus de 5 millions d'enfants à l'échelle mondiale (4). Malgré de nombreux progrès techniques depuis les 30 dernières années, les résultats de la FIV restent limités avec moins d'un cycle de FIV sur cinq aboutissant à une naissance pour une moyenne de 2 embryons transférés dans la cavité utérine (5). En considérant l'ensemble des traitements de FIV réalisés, seul 48% des couples auront un enfant grâce à cette technique (32% après la première ou deuxième FIV), 11% des couples auront un enfant spontanément, 11% en adopteront un, et 30% resteront finalement sans enfant. Avec une moyenne de deux embryons remplacés par transfert embryonnaire, cela signifie que plus de 80% des embryons choisis selon les critères morphocinétiques actuels et remplacés dans la cavité utérine ne donnent pas lieu à une naissance (5–7). Paradoxalement, les techniques de FIV sont également à l'origine d'une augmentation du taux de grossesses multiples. Alors que leur taux avoisine 1,5% dans la population générale, celui observé en FIV atteignait encore 14,7% des accouchements en 2012 (7). La cause majeure de cette augmentation reste le transfert de plusieurs embryons dans la cavité utérine, stratégie mise en place initialement pour optimiser les taux de grossesse en FIV (3). Or, les grossesses multiples sont associées à une hausse de la morbi-mortalité maternelle et fœtale, ainsi qu'à une

augmentation du risque de complications périnatales (retard de croissance intra-utérin, hypertension artérielle gravidique, prééclampsie, diabète gestationnel, prématurité, hémorragie, césarienne). Elles engendrent aussi des conséquences économiques lourdes pour le couple et la société, avec un coût trois fois plus important pour une grossesse gémellaire et dix fois plus élevé pour une grossesse triple (7). En conséquence, les équipes médicales ont revu leur stratégie de transfert embryonnaire ces dernières années afin de réduire l'incidence des grossesses multiples, et tentent de promouvoir le transfert d'embryon unique (3). Pour cela, l'identification de nouveaux biomarqueurs utilisables en routine et directement corrélés au potentiel implantatoire embryonnaire est une nécessité. En 2016, un nouveau biomarqueur de l'implantation embryonnaire a été rapporté dans la littérature : la prokinéticine 1 (8–10).

III. La Prokinéticine 1 : nouveau biomarqueur en FIV

a) Découverte des prokinéticines

En 2001, une famille de protéines sécrétées spécifiques des glandes endocrines a été décrite : les prokinéticines, PROK1 (également appelé EG-VEGF) et PROK2, et leurs récepteurs associés : PROKR1 et PROKR2. Les prokinéticines se lient avec la même affinité à leurs deux récepteurs. Chez l'humain, PROK1 est exprimé majoritairement dans les ovaires et le placenta, tandis que PROK2 montre un site d'expression privilégiée dans les testicules et le système nerveux central. PROK1 est impliqué dans la fertilité féminine *via* une action pro-implantatoire sur la réceptivité endométriale et le développement placentaire (9,11). Sa dérégulation a été rapporté dans plusieurs pathologies de la fertilité féminine : ovaires polykystiques (12), hyperstimulation ovarienne (12), fausses couches à répétition (13,14), retard de croissance intra-utérin, prééclampsie (15,16), et grossesses ectopiques (17,18), cancer de l'ovaire (19).

b) PROK1 : biomarqueur prédictif des chances d'implantation en FIV

En 2016, une publication de l'équipe de recherche a rapporté la valeur prédictive du dosage de PROK1 dans le liquide folliculaire dans l'évaluation des chances de grossesse des patientes prises en charge en FIV (8,9,20). En effet, un taux folliculaire élevé de PROK1 serait en faveur d'un succès implantatoire suite au transfert embryonnaire, suggérant ainsi l'utilisation de PROK1 comme critère décisionnel supplémentaire dans les stratégies de transfert embryonnaire en FIV. Ainsi, un taux folliculaire élevé de PROK1 serait en faveur du transfert d'un unique embryon tandis qu'un taux faible soutiendrait le choix d'un transfert de deux embryons pour maximiser les taux de grossesse. Néanmoins, aucune donnée n'est actuellement disponible sur les facteurs de régulation influençant la sécrétion de PROK1 dans le liquide folliculaire chez la femme, ce qui questionne sur la présence de biais dans cette première étude et fragilise l'utilisation du dosage de PROK1 en routine hospitalière.

c) Rôle de la FSH dans la sécrétion ovarienne de PROK1 ?

Des résultats préliminaires de l'équipe de recherche ont démontré une augmentation significative de la concentration de PROK1 dans le liquide des follicules de grande taille, suggérant une régulation de sa sécrétion par les gonadotrophines (21). De plus, le promoteur du gène *PROK1* possédant des éléments de réponse à l'AMPc, l'ensemble de ces résultats sont en faveur d'une régulation de la sécrétion de PROK1 par la FSH et ainsi d'un biais potentiel de l'utilisation de PROK1 en tant que biomarqueur de l'implantation embryonnaire en fonction de la dose de stimulation des patientes de FIV.

IV. Les objectifs de l'étude

L'objectif principal est d'étudier la sécrétion de PROK1 dans le liquide folliculaire en fonction de la dose de FSH utilisée pour la stimulation ovarienne.

Matériel et méthodes

V. Type d'étude, lieu et population

Une étude rétrospective de cohorte a été réalisée de janvier 2016 à décembre 2016. Lors de leur prise en charge au sein du centre d'AMP-CECOS du CHU de Grenoble, les patientes sont informées de la mission de recherche existant dans le CHU et de la possibilité que la partie restante des échantillons réalisés dans le cadre du soin soit conservé dans le Centre de Ressources Biologiques (CRB) GERMETHEQUE. Conformément à l'article L1211-2 du code de la santé publique, les patientes ont eu alors la possibilité de consentir ou 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). Au total, 30 liquides folliculaires globaux issus de 30 patientes de FIV ont été inclus. Les critères d'inclusion associés aux patientes dont sont issus les liquides folliculaires ont été : âge inférieur à 37 ans, absence de chirurgie ovarienne, AMH > 1 ng/ml et FSH < 10 UI/ml au 3^{ème} jour du cycle, IMC compris entre 18,5 et 25 kg/m², prise en charge en FIV de rang 1 avec présence d'au moins trois CCO (complexe cumulo-ovocyttaire) suite à la recherche ovocyttaire afin de minimiser les risques de dysfonctionnement ovarien. Les critères d'exclusion associés aux patientes dont sont issus les liquides folliculaires ont été : échec de fécondation ou hypo-fécondation afin de minimiser les risques de dysfonctionnement ovarien, syndrome des ovaires polykystiques, syndrome d'hyperstimulation, fausses-couches à répétition, grossesses ectopiques, et intoxication tabagique pour la dérégulation de PROK1 dans ses pathologies (22). Les données clinico-biologiques ont été obtenues à partir du logiciel Médifirst. Deux groupes ont été établit afin d'évaluer l'impact de la dose de FSH reçue lors de la stimulation de FIV sur la concentration folliculaire de PROK1 : le Groupe 1 est constitué de liquides folliculaires issus de patientes ayant reçues une dose de FSH <200UI/jour (n=15), le Groupe 2 est constitué de liquides folliculaires issus de patientes ayant reçues une dose de FSH ≥200UI/jour (n=15) (Figure 5).

VI. Stimulation ovarienne

Toutes les patientes ont été inclus dans un protocole de stimulation agoniste ou antagoniste, elles ont reçu un traitement par FSH d'origine recombinante ou urinaire. Le développement folliculaire a été surveillé en échographie par voie vaginale ainsi que par le dosage œstradiol et de LH dans le sang de la patiente ; cette surveillance commence classiquement au 6^{ème} jour de stimulation par FSH jusqu'à la date du déclenchement de l'ovulation.

VII. Ponction

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'Ovitrelle® ou de Decapeptyl®. 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. Au laboratoire, chaque CCO est isolé pour la mise en fécondation conventionnelle ou par technique ICSI.

VIII. Collecte du liquide folliculaire

Immédiatement après la récolte des CCO, le liquide folliculaire est centrifugé à 1000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante. Cela permet l'isolation du liquide folliculaire des débris cellulaires (érythrocytes, cellules de la granulosa), le liquide folliculaire est alors immédiatement stocké et conservé dans des aliquots à -20°C en vue d'un futur dosage de PROK1 par test ELISA.

IX. Quantification 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. 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. 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 620 nm 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.

X. 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. L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel Graph Pad Prism4. Les valeurs ont été représentées en moyenne +/- SEM (erreur standard).

Résultats

I. Flow chart de l'étude

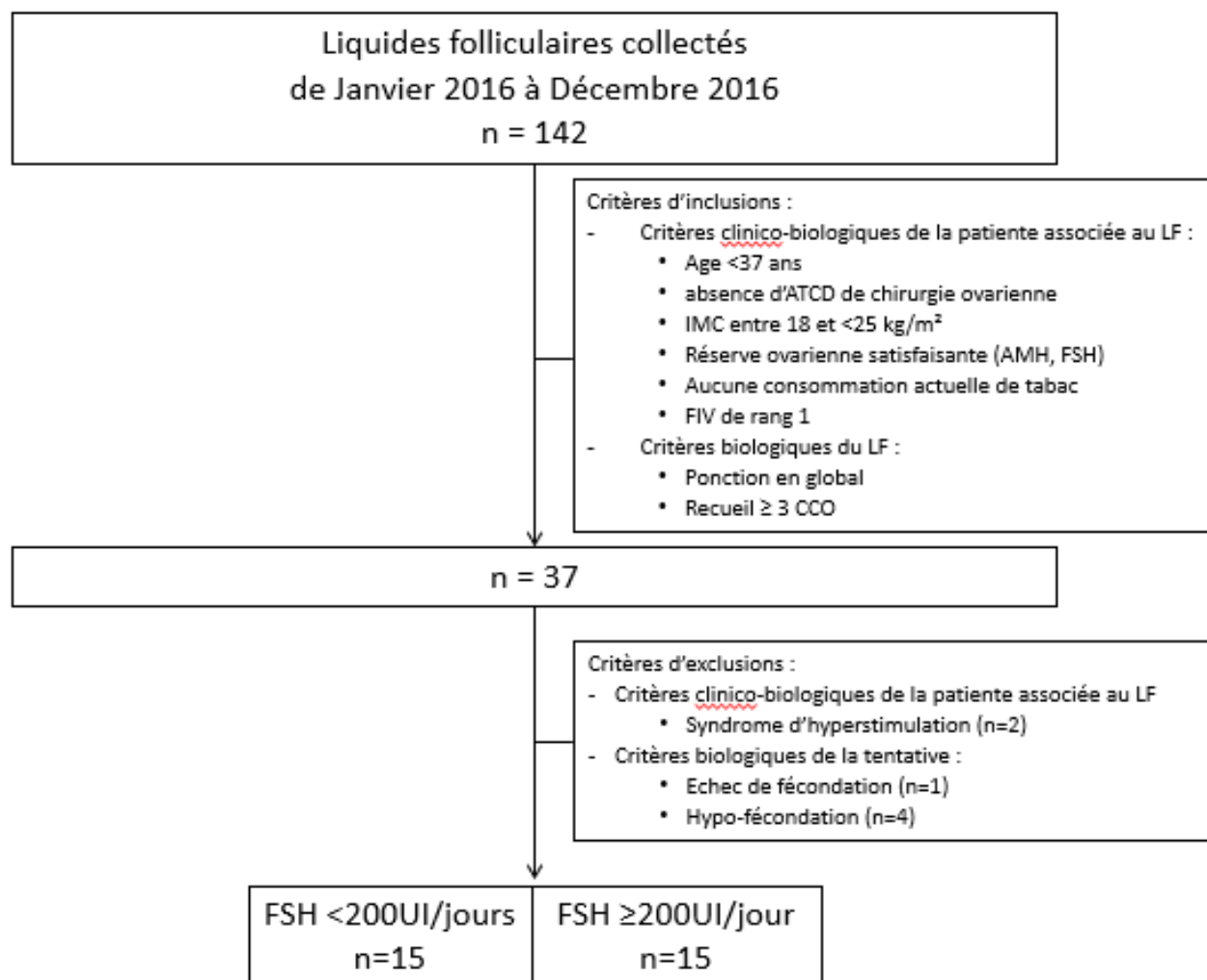


Figure 5 : Flow chart de l'étude

II. Les caractéristiques cliniques des patientes

Caractéristiques	Groupe 1 < 200 UI/jour de FSH n=15 Moyenne ± SEM	Groupe 2 ≥ 200 UI/jour de FSH n=15 Moyenne ± SEM	Statistiques
Âge Mme (années)	31,6 ± 0,7	32,9 ± 0,9	p=0,25
Durée d'infertilité (années)	5,7 ± 0,6	4,9 ± 0,6	p=0,41
IMC Mme (kg/m ²)	23,2 ± 1,1	23,5 ± 1,2	p=1
AMH (ng/ml)	2,4 ± 0,2	2,1 ± 0,2	p=0,28
Dose de FSH (UI/jour)	123,3 ± 7,3	247,5 ± 8,9	*** p=2,12.10 ⁻⁶
Estradiol (pg/ml)	1880,7 ± 166,7	1549,3 ± 168,3	p=0,14
Nombre de follicules	10,5 ± 0,7	9,9 ± 0,5	p=0,24
Taille des follicules (mm)	15,2 ± 0,5	15,3 ± 0,5	p=0,83
Nombre d'ovocytes isolés	6,9 ± 0,4	6,6 ± 0,8	p=0,38
Nombre d'ovocytes matures	5,1 ± 0,6	4,9 ± 0,8	p=0,67

Tableau 1 : Caractéristiques clinico-biologiques associées aux échantillons de liquides folliculaires analysés.

Les caractéristiques associées aux liquides folliculaires analysés sont détaillées dans le tableau ci-dessus. Les patientes ont un âge moyen de 31,6 ± 0,7 ans dans le groupe 1 et de 32,9 ± 0,9 ans dans le groupe 2 (p=0,25). La durée d'infertilité est de 5,7 ± 0,6 ans dans le groupe 1 et de 4,9 ± 0,6 ans dans le groupe 2 (p=0,41). L'IMC des patientes est de 23,2 ± 1,1 kg/m² dans le groupe 1 et de 23,5 ± 1,2 dans le groupe 2 (p=1). Le taux d'AMH est de 2,4 ± 0,2 ng/ml dans

le groupe 1 et de $2,1 \pm 0,2$ mg/ml dans le groupe 2 ($p=0,28$). La dose moyenne de FSH reçue par jour est de $123,3 \pm 7,3$ UI/jour dans le groupe 1 et de $247,5 \pm 8,9$ UI/jour dans le groupe 2 ($p=2,12 \times 10^{-6}$). Le taux d'œstradiol des femmes le jour de la ponction est de $1880,7 \pm 166,7$ pg/ml dans le groupe 1 et de $1549,3 \pm 168,3$ pg/ml dans le groupe 2 ($p=0,14$). Le nombre de follicules ponctionnés est de $10,5 \pm 0,7$ dans le groupe 1 et de $9,9 \pm 0,5$ dans le groupe 2 ($p=0,24$). La taille des follicules en moyenne est de $15,2 \pm 0,5$ mm dans le groupe 1 et de $15,3 \pm 0,5$ dans le groupe 2 ($p=0,83$). A la suite de la ponction, le nombre d'ovocytes isolés est de $6,9 \pm 0,4$ dans le groupe 1 et de $6,6 \pm 0,8$ dans le groupe 2 ($p=0,38$). Le nombre d'ovocytes matures est de $5,1 \pm 0,6$ dans le groupe 1 et de $4,9 \pm 0,8$ dans le groupe 2 ($p=0,67$).

III. Concentration de PROK1 dans le liquide folliculaire global en fonction de la dose de FSH administrée

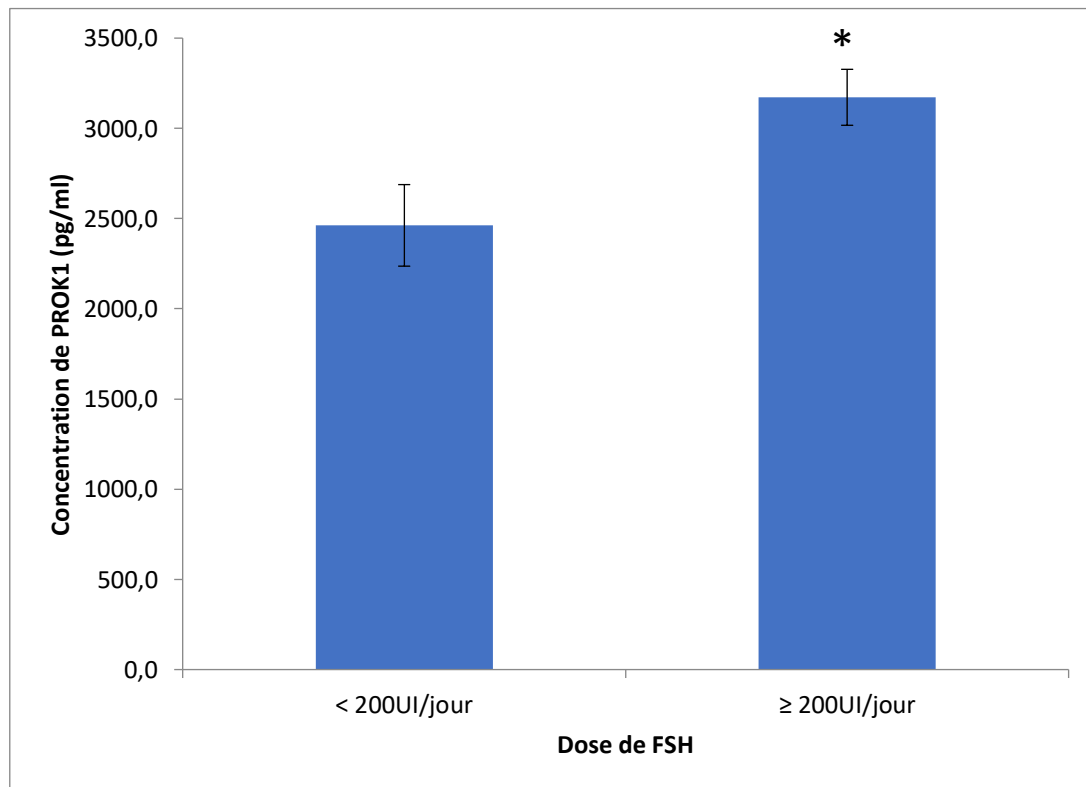


Figure 6 : Concentration de PROK1 (pg/ml) en fonction de la dose de FSH de la stimulation ovarienne.

La concentration de PROK1 dosé dans le liquide folliculaire global est de $2462,2 \pm 225,9$ pg/ml dans le groupe 1 et de $3172,1 \pm 155,0$ pg/ml dans le groupe 2 ($p=0,016$). Ainsi, nous observons que la concentration folliculaire de PROK1 est significativement augmentée chez les patientes ayant reçues des doses de stimulation ≥ 200 UI/jour.

Discussion

Pour cette étude, les liquides folliculaires analysés ont été spécifiquement sélectionnés afin de minimiser les risques de biais. En effet, nous souhaitons évaluer l'effet de la FSH sur la sécrétion folliculaire de PROK1. Pour cela, les liquides folliculaires devaient être issus de follicules ovariens sensibles à la FSH, provenant donc de patientes présentant des caractéristiques clinico-biologiques compatibles avec une bonne réponse à la stimulation, c'est à dire des patientes jeunes (<37 ans), avec une réserve ovarienne suffisante et un IMC compatible avec une normo-réponse à la stimulation (AMH > 1 ng/ml et FSH < 10 UI/ml au 3^{ème} jour du cycle ; IMC compris entre 18,5 et 25 kg.m²), une durée d'infertilité inférieure à 10 ans et une prise en charge en FIV de rang 1 avec présence d'au moins trois CCO suite à la recherche ovocytaire afin de minimiser les risques de dysfonctionnement ovarien et donc d'hypo-réponse à la FSH. Nous avons exclu les liquides folliculaires associés à des tentatives présentant des échecs de fécondation ou d'hypo-fécondation car ces tentatives peuvent être associées à un dysfonctionnement ovarien (immaturité folliculaire ou hypo-sensibilité à la FSH). De plus, nous avons exclus les patientes présentant un syndrome des ovaires polykystiques, un syndrome d'hyperstimulation, des antécédents de fausses-couches à répétition, de grossesses ectopiques, et/ou une intoxication tabagique car des dérégulations de la sécrétion folliculaire de PROK1 ont été rapportées dans ces pathologies (12–18). Concernant les autres caractéristiques clinico-biologiques associées aux liquides folliculaires, nous observons dans notre étude que le taux d'œstradiol le jour de la ponction et la taille des follicules sont similaires dans nos deux groupes. Cela est rassurant car ce sont deux facteurs décrits pour influencer significativement la concentration folliculaire de PROK1. En effet, des taux élevés en estradiol sont corrélés avec une baisse de la concentration folliculaire de PROK1 (9) tandis que celle-ci est significativement augmentée avec la taille folliculaire (*données du laboratoire en cours de publication*) (21). Enfin, nous observons que le nombre d'ovocytes isolés ainsi que

le nombre d'ovocytes matures dans nos deux groupes sont en cohérence avec une réponse à la stimulation jugée satisfaisante au sein du centre d'AMP CHUGA, ce qui est en faveur de la présence de normo-répondeuses à la stimulation dans notre population. Pour finir, nos deux groupes sont comparables pour l'ensemble des caractéristiques clinico-biologiques mentionnées précédemment ce qui nous permet de conclure à un risque minimal concernant la présence de biais dans l'évaluation de l'effet de la FSH sur la sécrétion folliculaire de PROK1.

À ce jour, aucune donnée n'était disponible dans la littérature sur la régulation folliculaire de PROK1 par la FSH chez la femme. Dans cette étude, nous avons démontré l'augmentation significative de la concentration folliculaire de PROK1 par la FSH chez les patientes prises en charge en FIV. Ces résultats sont en accord avec les données récentes du laboratoire montrant une corrélation positive entre la dose de départ de FSH et la concentration de PROK1 dans le liquide folliculaire, la différence est statistiquement significative entre le taux de PROK1 chez les femmes recevant une dose de FSH faible ou élevée. En effet, les femmes qui reçoivent une dose élevée de FSH ont une concentration de PROK1 dans le liquide folliculaire plus importante. D'autres résultats montrent l'augmentation de la concentration folliculaire de PROK1 en fonction de la taille des follicules (*données du laboratoire en cours de publication*), cela est en faveur d'un effet direct de la FSH sur la sécrétion folliculaire de PROK1, les follicules de grandes tailles étant associés à une plus grande sensibilité à la FSH. De plus, des données *in vitro* récentes du laboratoire confirme également cette régulation. En effet, des expériences ont démontré que le traitement par FSH de cultures primaires humaines de cellules folliculaires (cellules du cumulus et de la granulosa provenant de patientes de FIV) entraînait une augmentation significative de la sécrétion de PROK1 dans les surnageants de ce modèle cellulaire. Or, la source folliculaire de PROK1 est attribuée à ce jour à une sécrétion locale par les cellules folliculaires, en particulier les cellules de la granulosa qui sont

majoritaires au sein du follicule ovarien. De plus, l'augmentation de la sécrétion de PROK1 par la gonadotrophine hCG dans le placenta a également été rapportée en 2012 (15). Dans cette publication, les auteurs ont disséqué la mécanistique de l'action de cette gonadotrophine sur PROK1 en démontrant l'activation d'éléments de réponse à l'AMPc dans le promoteur de PROK1 lors des cascades de signalisation intracellulaire déclenchées par l'hCG. Or, la FSH et l'hCG partagent les mêmes voies de signalisation (PKA-Adénylate cyclase-AMPc). L'ensemble de ces résultats est donc en faveur d'un effet des injections de gonadotrophines FSH et hCG sur la sécrétion de PROK1 par les cellules folliculaires pendant la stimulation par FIV. Cela pourrait avoir des conséquences sur l'utilisation en routine du dosage de PROK1 dans le liquide folliculaire en tant que biomarqueur prédictif des chances d'implantation en FIV rapporté en 2016 (9). En effet, les doses de FSH administrées dans les protocoles de stimulation ovarienne varient en fonction des caractéristiques des patientes et de leur réponse antérieure aux protocoles de FIV. Les doses peuvent varier de 100 UI/jour jusqu'à 450 UI/jour de FSH. Nos résultats invitent donc à la précaution car la dose de stimulation administrée pourrait donc constituer un facteur confondant dans l'utilisation de ce biomarqueur en FIV. Notre étude soulève ainsi un questionnement sur la nécessité de constituer des sous-groupes de patientes de FIV en fonction de leur protocole de stimulation et de redéfinir la valeur seuil de PROK1 pour chaque sous-groupe dans le but de prédire les chances de grossesse avec ce biomarqueur. Des études supplémentaires doivent être menées sur les interactions entre PROK1 et les traitements en FIV avant de pouvoir valider définitivement son utilisation en routine.

Enfin, notre étude ouvre également des perspectives sur l'utilisation de PROK1 comme biomarqueur de la réponse de chaque patiente à la stimulation ovarienne et ainsi participer à l'amélioration de la stratégie de médecine personnalisée en FIV. En effet, on peut supposer que la sécrétion de PROK1 soit le reflet direct de la fonction endocrine des cellules folliculaires

des patientes, et ainsi que sa quantification soit informative de la réponse hormonale de chaque patiente à son protocole de stimulation. La quantification de PROK1 pourrait ainsi représenter un critère supplémentaire pour évaluer la sensibilité de chaque patiente à chaque protocole de FIV et aider les médecins à identifier le meilleur protocole de FIV pour la prochaine tentative et ainsi participer à l'amélioration des taux de grossesse en FIV. La quantification de la concentration de PROK1 pourrait facilement être applicable en routine. En effet, le résultat peut être obtenu dans les 5 heures suivant la récupération du liquide folliculaire, et coûte moins d'un euro par échantillon dosé avec le kit commercial utilisé dans notre étude. Par conséquent, la quantification de PROK1 pourrait être facilement compatible avec la stratégie de FIV personnalisée.

Conclusion

Face à l'augmentation de l'infertilité à l'échelle mondiale, la validation de nouveaux biomarqueurs non invasifs de l'implantation embryonnaire constitue un défi majeur pour augmenter les taux de grossesse en FIV. Notre travail démontre l'augmentation significative de la sécrétion folliculaire de PROK1 avec la dose de FSH administrée lors de la stimulation, et invite donc à évaluer la nécessité de constituer des sous-groupes de patientes pour son utilisation en tant que biomarqueur. Le dosage de PROK1 pourrait représenter un outil innovant en routine hospitalière pour évaluer les chances de grossesse en FIV, et peut être à l'avenir améliorer le choix du protocole de stimulation le plus adapté à chaque patiente.

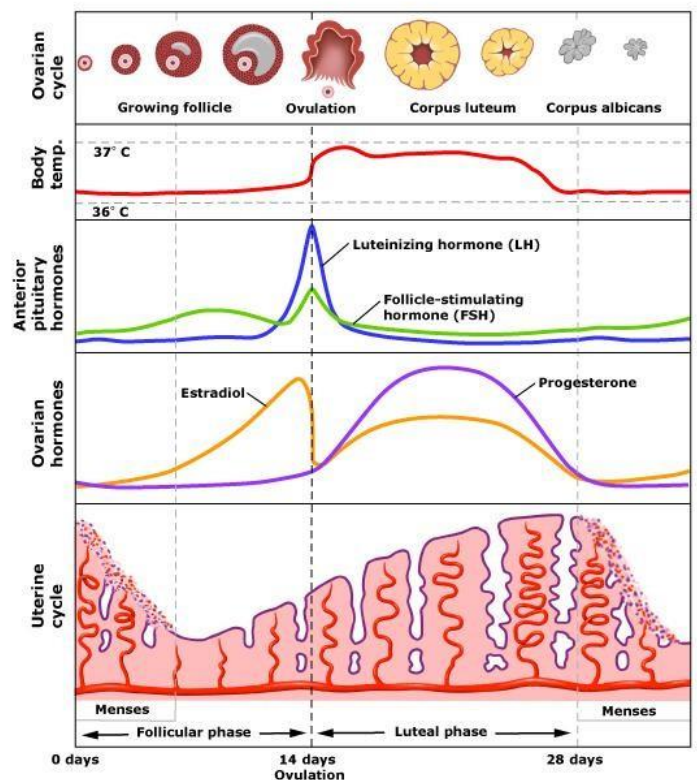
Bibliographie

1. Stérilité du couple : conduite de la première consultation [Internet]. [cited 2018 Apr 12]. Available from: <http://www.cngof.net/E-book/GO-2016/CH-13.html>
2. Ombelet W, Cooke I, Dyer S, Serour G, Devroey P. Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Hum Reprod Update*. 2008 Dec;14(6):605–21.
3. <https://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2013/donnees/procreation/01-amp/synthese.htm>.
4. Kamphuis EI, Bhattacharya S, Veen F van der, Mol BWJ, Templeton A. Are we overusing IVF? *BMJ*. 2014 Jan 28;348:g252.
5. Pandian Z, Marjoribanks J, Ozturk O, Serour G, Bhattacharya S. Number of embryos for transfer following in vitro fertilisation or intra-cytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 Jul 29;(7):CD003416.
6. La stabilité des résultats en fécondation in vitro est-elle possible ? [Internet]. *dokumen.tips*. [cited 2018 May 10]. Available from: <https://dokumen.tips/documents/la-stabilite-des-resultats-en-fecondation-in-vitro-est-elle-possible.html>
7. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Multiple gestation associated with infertility therapy: an American Society for Reproductive Medicine Practice Committee opinion. *Fertil Steril*. 2012 Apr;97(4):825–34.
8. Brouillet S, Hoffmann P, Thomas-Cadi C, Bergues U, Feige J-J, Alfaidy N, et al. [PROK1, prognostic marker of embryo implantation?]. *Gynecol Obstet Fertil*. 2013 Sep;41(9):562–5.
9. Alfaidy N, Hoffmann P, Gillois P, Gueniffey A, Lebayle C, Garçin H, et al. PROK1 Level in the Follicular Microenvironment: A New Noninvasive Predictive Biomarker of Embryo Implantation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 Feb;101(2):435–44.
10. Brouillet S, Hoffmann P, Alfaidy N, Feige J-J. [Prokineticins: new regulatory peptides in human reproduction]. *Med Sci MS*. 2014 Mar;30(3):274–9.
11. LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, et al. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature*. 2001 Aug 30;412(6850):877–84.
12. 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*. 2011 Feb;95(2):673–8.
13. Gene-gene interactions and gene polymorphisms of VEGFA and EG-VEGF gene systems in recurrent pregnancy loss [Internet]. [cited 2018 May 11]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4048388/>

14. 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 Apr 21;5(4):e10287.
15. Brouillet S, Hoffmann P, Feige J-J, Alfaidy N. EG-VEGF: a key endocrine factor in placental development. *Trends Endocrinol Metab*. 2012 Oct;23(10):501–8.
16. Hoffmann P, Saoudi Y, Benharouga M, Graham CH, Schaal J-P, Mazouni C, et al. Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications. *J Cell Mol Med*. 2009 Aug;13(8B):2224–35.
17. 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*. 2010 Oct;94(5):1601–1608.e1.
18. Shaw JLV, Wills GS, Lee K-F, Horner PJ, McClure MO, Abrahams VM, et al. Chlamydia trachomatis infection increases fallopian tube PROKR2 via TLR2 and NFκB activation resulting in a microenvironment predisposed to ectopic pregnancy. *Am J Pathol*. 2011 Jan;178(1):253–60.
19. Zhang L, Yang N, Conejo-Garcia J-R, Katsaros D, Mohamed-Hadley A, Fracchioli S, et al. Expression of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2003 Jan;9(1):264–72.
20. Gao M, Zhao X, Lin Y, Sun Z, Zhang H. Effects of EG-VEGF, VEGF and TGF-β1 on pregnancy outcome in patients undergoing IVF-ET treatment. *J Assist Reprod Genet*. 2012 Oct;29(10):1091–6.
21. Boulahfa, Sami (1990-....) [Internet]. [cited 2018 May 12]. Available from: <https://www.idref.fr/188395148>
22. Shaw JLV, Oliver E, Lee K-F, Entrican G, Jabbour HN, Critchley HOD, et al. Cotinine exposure increases Fallopian tube PROKR1 expression via nicotinic AChRα-7: a potential mechanism explaining the link between smoking and tubal ectopic pregnancy. *Am J Pathol*. 2010 Nov;177(5):2509–15.

ANNEXE 1 : le cycle menstruel physiologique

L'hormone FSH est sécrétée par les cellules gonadotropes de l'antéhypophyse tout au long du cycle menstruel. Elle atteint par voie sanguine ses récepteurs spécifiques à la surface des cellules de la granulosa des follicules ovariens, dont elle induit la croissance et le développement. Elle est ensuite dégradée au niveau hépatique, puis éliminée de la circulation par voie rénale. Le taux plasmatique de FSH varie au cours du cycle menstruel, déterminant la croissance des follicules ovariens : il s'élève en fin de phase lutéale du cycle précédent et en début de phase folliculaire (recrutement), puis commence à décliner en milieu de phase folliculaire (sélection et dominance) sous l'effet du feed-back négatif de taux croissants d'inhibine B et d'œstradiol. Il existe une décharge pré-ovulatoire de FSH, synchrone du pic de LH mais de plus faible amplitude, puis le taux de FSH décline pour s'élever à nouveau en fin de phase lutéale. La FSH exerce son action physiologique exclusivement au niveau des cellules de la granulosa, dont elle assure la multiplication et le développement, contrôlant la croissance folliculaire. Elle induit également à leur niveau la sécrétion d'inhibine B, ainsi que l'apparition et la multiplication des récepteurs à la LH, en synergie avec l'œstradiol. Les rôles physiologique du pic pré-ovulatoire de FSH, ainsi que de sa sécrétion au cours de la phase lutéale précoce sont encore mal connus.



ANNEXE 2 : Les différents types de FSH commercialisées

Voici la liste des gonadotrophines utilisées pour la stimulation hormonale.

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)

On différencie les gonadotrophines recombinantes (ou de synthèse) des gonadotrophines humaines purifiées à partir d'urine de femmes ménopausées (qui sont plus fortement concentrées en gonadotrophines par rapport à l'urine de femmes en âge de procréer).

Il existe 4 préparations de FSH qui diffèrent entre elles par leur profil d'isohormones, lui-même fonction de leur origine mais aussi de leur processus de purification. On peut distinguer deux préparations d'origine urinaire humaine et deux préparations de synthèse.

- FSH d'origine urinaire humaine :
 - Les HMG (Human Menopausal Gonadotropins) sont caractérisées par un effet LH concomitant. Actuellement nous utilisons la 2^{ème} génération de gonadotrophines extractives hautement purifiées (Menopur®), la différence avec la 1^{ère} génération vient

de l'amélioration de la pureté. L'effet LH est en partie lié à la présence d'HCG pour compenser l'insuffisance de LH dans les urines de femme post-ménopausée.

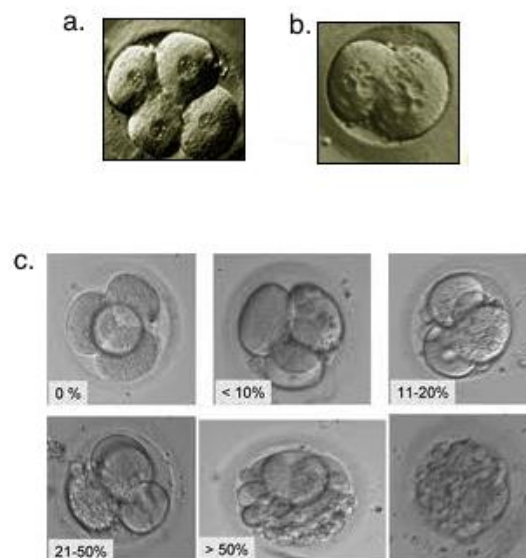
- Les FSH urinaires sont apparues ensuite, dans le but de se débarrasser de la LH que l'on pensait responsable des phénomènes de recrutement excessif et des risques d'hyperstimulation. Il s'agissait en réalité d'une erreur d'hypothèse, l'hyperstimulation n'est pas liée au degré de pureté de la FSH mais du protocole d'administration et de la dose de FSH reçu par la patiente. Les préparations extractives de FSH (actuellement Fostimon®) sont celles qui contiennent la plus grande proportion d'isoformes acides.
- FSH de synthèse :

Les FSH de synthèse sont produites par génie génétique à partir de cellule d'ovaire de hamster (CHO). Elles permettent de s'affranchir des collectes urinaires et d'obtenir des solutions stables. Les gonadotrophines recombinantes commercialisées contiennent moins d'isoformes acides que les préparations extractives.

- Gonal F® et Puregon® ont un profil d'isoforme distinct par leur processus de glycosylation et les procédés de purification différents. Puregon® étant globalement moins acide. Ce sont donc 2 types de FSH de synthèses différentes.
- Le Pergoveris® est une simple association de Gonal F et de Luveris (LH recombinante), ce produit ne constitue pas un 5^{ème} type de FSH, il est apparenté au Gonal F®.

ANNEXE 3 : Les scores morpho-cinétiques embryonnaires

Les scores morpho-cinétiques des embryons sont établis en fonction du nombre, de la taille, de la nucléation des blastomères, ainsi que sur la fragmentation cellulaire de l'embryon. Un embryon est considéré avec un « haut degré d'implantation » au jour 2 s'il contient 4 à 5 blastomères, une fragmentation embryonnaire <25% et s'il n'est pas multinucléé ; dans ces conditions le « Top embryo » est transféré à 2 jours de développement in vitro. Concernant les embryons de moins bonne qualité, la culture in vitro est prolongée jusqu'à 5 ou 6 jour de développement, il est alors décidé selon les critères morpho-cinétique s'il y a transfère embryonnaire, congélation ou destruction des embryons.



Embryons de potentiel implantatoire différents (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

Le résumé

La validation de nouveaux biomarqueurs prédictifs de l'implantation embryonnaire est une priorité en fécondation *in vitro* (FIV) afin d'améliorer les taux de grossesse. En 2016, le dosage folliculaire de la prokinéticine 1 (PROK1) a été décrit comme nouveau biomarqueur prédictif des chances de grossesse, mais sa régulation folliculaire reste largement méconnue. L'objectif de mon stage a été d'étudier l'impact de la dose de FSH de stimulation ovarienne sur la sécrétion folliculaire de PROK1 chez des patientes prises en charge en FIV au CHUGA. Nos résultats montrent une augmentation significative de la concentration folliculaire de PROK1 avec des doses de FSH ≥ 200 UI/jour ($n=30$, $p=0,016$). Ces premiers résultats suggèrent que la valeur prédictive du dosage folliculaire de PROK1 dans l'évaluation des chances de grossesse en FIV pourrait être dépendante des doses de stimulation, et soulève ainsi l'intérêt d'établir des sous-groupes et de nouvelles valeurs seuils en fonction des doses de stimulation reçues.

Mots clés : AMP - FIV – Biomarqueurs - PROK1 – FSH