



Laboratoire d'Immunoendocrinologie et Embryologie – GIGA Research I³

L'implantation embryonnaire : étude des récepteurs
endométrieux à l'hCG/LH blastocytaire et intérêt de la
mesure du G-CSF folliculaire.

Virginie Gridelet

Thèse
présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Promoteur :
Prof. Sophie Perrier d'Hauterive

Co-promoteur :
Prof. Jean-Michel Foidart

Année académique 2014-2015

Remerciements

Je voudrais, au terme de ce travail, remercier celles et ceux qui, de près ou de loin, m'ont aidé à réaliser ce projet :

Je commencerai par remercier le Professeur Vincent Geenen pour m'avoir accueillie dans son laboratoire mais également pour l'attention qu'il m'a témoigné tout au long de ce travail et pour son soutien pour terminer ma thèse.

Je remercie particulièrement mon promoteur, le Professeur Sophie Perrier d'Hauterive, pour sa gentillesse, son encadrement de qualité, sa motivation professionnelle, sa passion de la recherche et l'amitié qu'elle m'a offerte. Puisse cette amitié durer encore de longues et belles années. Malgré les épreuves qu'elle a traversées durant mon travail, elle a toujours été présente pour moi. Merci pour tout Sophie.

J'adresse mes plus vifs remerciements à mon co-promoteur, le Professeur Jean-Michel Foidart, pour avoir cru en moi et m'avoir donné l'opportunité de réaliser une thèse avec le Professeur Perrier d'Hauterive. Je le remercie également pour ses corrections et pour le temps qu'il a consacré à la relecture de mon manuscrit.

Je remercie sincèrement les membres de mon comité de thèse, respectivement les Professeurs A. Noël, et J-P Schaaps, pour leurs conseils et le temps qu'ils ont consacré pour la lecture et l'évaluation de ce manuscrit. Je remercie également les membres de mon jury, le Professeur G. Chaouat, le Docteur H. Van de Helde et le Docteur C. Jouan pour le temps qu'ils ont pris pour évaluer l'ensemble de mon travail.

Pour réaliser de la recherche, il faut apprendre les techniques de laboratoire et les analyses statistiques nécessaires ; je remercie Chantal Renard, Marie-Thérèse Hagelstein, Marie Tsampalas et Henri Martens pour le temps qu'ils m'ont consacré pour l'apprentissage de ces techniques.

Une thèse, c'est aussi des relations que l'on noue avec les personnes qui travaillent autour de soi. Je tiens à remercier mes co-doctorantes Lindsay, Marie, Gwenaëlle, Alisson et Barbara pour le soutien indéfectible et pour leur amitié. Dans ce groupe de filles a réussi à s'intégrer un homme, Philippe, que je remercie pour sa bonne humeur et son ouverture d'esprit. Grâce à vous, j'ai passé de merveilleux moments et apprécié nos discussions dans et hors du laboratoire. Les années passées au laboratoire m'auraient semblé bien longues sans votre présence.

Je tiens également à exprimer toute ma sympathie à l'équipe du CPMA de Liège, dirigée par le Professeur Michel Dubois, grâce à qui j'ai pu avoir des fluides folliculaires en quantité pour réaliser mon travail. Merci aux médecins et aux infirmières pour la récolte follicule par follicule qui nécessitait une grande

patience et aux biologistes pour le travail de labo supplémentaire que cela engendrait. Merci Caroline, Olivier, Frédéric et Fabienne pour les nombreuses heures d'ICSI à féconder les ovocytes un par un pour permettre leur identification. Je tiens particulièrement à remercier Stéphanie Ravet pour l'organisation de la récolte des fluides et son investissement dans ce travail.

A diverses occasions, j'ai pu apprécier la gentillesse et la compétence de différents membres du LBTD. Je remercie plus particulièrement Carine Munaut pour ses précieux conseils et Marie-Rose Pignon pour ses connaissances techniques. Merci également à Sarah Berndt pour l'apprentissage du western blot et pour les échanges sur le LHCGR.

Merci également à Nathalie Lédée pour la collaboration sur le G-CSF. Merci pour ton dynamisme et ta passion de la recherche qui est si motivante.

Cela fait plus de dix ans que nous avons commencé nos études ensemble, merci au groupe de la SBIM team pour ces beaux moments durant nos études et après. Merci à Rosalie que j'ai rencontré le premier jour et qui est encore au CHU aujourd'hui, merci Ludi, Alex, Sandrine, Emilie, Anne et Kévin. Ces années d'étude et de thèse n'auraient pas été pareilles sans vous.

Ma reconnaissance est grande envers ma famille et mes amis pour leur amour et leur présence. Merci à mon père, d'abord pour son initiation à la Science dès mon plus jeune âge et ensuite pour sa passion pour la recherche et la connaissance. Merci aussi, papa, pour tes relectures de mon travail. Merci à ma mère pour son soutien et sa confiance absolue en mes capacités. Merci maman de t'être battue pour me donner la chance de faire mes études primaires en immersion et d'avoir toujours voulu le meilleur pour nous. Merci enfin à ma sœur, Evelyne, pour sa présence à mes côtés et ses nombreux conseils sur comment mener une thèse à son terme.

Merci enfin à Cédric, mon compagnon et meilleur ami, présent depuis le début de ce travail. Merci d'avoir toujours cru en moi et merci pour ta patience face à l'investissement que représente une thèse. Je te suis vivement reconnaissante pour tes relectures et corrections orthographiques de ce document. Merci enfin à mon petit bonhomme, Achille, et à ses futurs frères et sœurs pour m'avoir permis de découvrir in vivo la joie de vivre une implantation embryonnaire de qualité.

Ces travaux ont été réalisés grâce au soutien financier du fonds Léon Frédéricq (via un subside de fonctionnement) ainsi que de mes institutions d'accueil, l'ULg et le CHU de Liège.

Table des matières

ABRÉVIATIONS.....	1
INTRODUCTION	- 1 -
1.1 ORGANOGÈNE DES APPAREILS GÉNITAUX MURIN ET FÉMININ.....	- 4 -
1.1.1 <i>La formation d'une gonade indifférenciée.....</i>	- 4 -
1.1.2 <i>La formation d'une gonade femelle.....</i>	- 5 -
1.1.3 <i>L'acquisition du sexe phénotypique</i>	- 6 -
1.2 STRUCTURE ET MORPHOLOGIE DE L'APPAREIL GÉNITAL MURIN ET FÉMININ.....	- 7 -
1.2.1 <i>Souris</i>	- 7 -
1.2.2 <i>Femme.....</i>	- 7 -
1.3 HORMONES IMPLIQUÉES DANS LE CYCLE MENSTRUEL ET LA GROSSESSE	- 9 -
1.4 MODIFICATIONS CYCLIQUES DU TRACTUS GÉNITAL	- 12 -
1.4.1 <i>Souris</i>	- 13 -
1.4.2 <i>Femme.....</i>	- 15 -
1.5 L'OVOGÈNE ET L'OVOCYTE	- 20 -
1.5.1 <i>L'ovogène</i>	- 20 -
1.5.2 <i>La folliculogène</i>	- 22 -
1.5.3 <i>Le fluide folliculaire.....</i>	- 24 -
1.5.4 <i>L'ovulation.....</i>	- 25 -
1.5.5 <i>La qualité ovocytaire.....</i>	- 27 -
1.5.6 <i>Influence de l'ovocyte sur le développement embryonnaire....</i>	- 28 -
1.6 DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE PRÉCOCE	- 30 -
1.6.1 <i>La fécondation.....</i>	- 30 -
1.6.2 <i>Les premières divisions cellulaires.....</i>	- 30 -
1.6.3 <i>Le blastocyste</i>	- 31 -
1.6.4 <i>La sélection embryonnaire en FIV.....</i>	- 32 -
1.7 IMPLANTATION EMBRYONNAIRE ET DIALOGUE MATERNO-FCETAL	- 36 -
1.7.1 <i>Les étapes de l'implantation : apposition-adhésion-invasion.....</i>	- 36 -
1.7.2 <i>Molécules et cellules importantes dans le dialogue materno-foetal.-</i>	<i>38 -</i>
1.7.3 <i>L'hCG.....</i>	- 42 -
1.7.4 <i>La LH</i>	- 47 -
1.7.5 <i>Récepteur de la LH et de l'hCG</i>	- 49 -

OBJECTIFS	- 51 -
DIALOGUE ENTRE LA LH BLASTOCYTAIRE ET LE RÉCEPTEUR DE LA LH AU MOMENT DE L'IMPLANTATION CHEZ LA SOURIS.....	- 53 -
3.1 LA DÉTECTION D'UN SIGNAL LH AU NIVEAU DE L'EXPRESSION EN ARNm ET EN PROTÉINES PAR DES EMBRYONS DE SOURIS.	- 53 -
3.2 LA BIOACTIVITÉ DE CE SIGNAL LH.	- 54 -
3.3 LA QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DES ARNm DU LHCGR DANS LES CELLULES DE L'ENDOMÈTRE AU COURS DU CYCLE ŒSTRAL DE LA SOURIS.	- 55 -
3.4 LA DÉTECTION DE LA PROTÉINE DE LA LH AU COURS DU CYCLE ŒSTRAL DE LA SOURIS.	- 55 -
3.5 DISCUSSION DES RÉSULTATS	- 56 -
IMPACT DE LA QUANTIFICATION DU G-CSF FOLLICULAIRE SUR LES DÉCISIONS DES EMBRYONS À TRANSFÉRER : UNE ÉTUDE PROUVANT LE CONCEPT	- 71 -
4.1 ETUDES ANTÉRIEURES SUR LE G-CSF COMME BIOMARQUEUR DE LA QUALITÉ OVOCYTAIRE.	- 71 -
4.2 LE G-CSF	- 72 -
4.3 RÉSUMÉ DE L'ARTICLE	- 73 -
DISCUSSION GÉNÉRALE	- 87 -
5.1 LA SÉLECTION DES EMBRYONS À TRANSFÉRER	- 88 -
5.2 L'INTÉRÊT DE LA MESURE DU G-CSF FOLLICULAIRE.....	- 89 -
5.3 LE DIALOGUE ENTRE LA LH BLASTOCYTAIRE ET LE LHR ENDOMÉTRIAL MURIN	- 90 -
PERSPECTIVES.....	- 93 -
6.1 L'INTÉRÊT DE LA MESURE DU G-CSF FOLLICULAIRE.....	- 93 -
6.2 LE DIALOGUE ENTRE LA LH BLASTOCYTAIRE ET LE LHR ENDOMÉTRIAL MURIN	- 94 -
CONCLUSION GÉNÉRALE	- 97 -
BIBLIOGRAPHIE	- 99 -
ANNEXES.....	- 117 -

Abréviations

aCGH : array Comparative Genomic Hybridization
ADN : Acide Désoxyribo Nucléique
AMH : Hormone antimüllérienne
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ARN : Acide Ribo Nucléique
ARNm : ARN messenger
AVPV : Noyau Paraventriculaire Ventral
CCL5 : Chemokine (motif C-C) Ligand 5
CPMA : Centre de Procréation Médicalement Assistée de Liège
E1 : Œstrone
E2 : 17 β -œstradiol
E3 : Œstriol
Era et Er β : Récepteurs aux œstrogènes
ERA : Endometrial Receptive Assay
ESHRE : European Society of Human Reproduction and Embryology
FF : Fluide folliculaire
FGF : Fibroblast Growth Factor
FIV : Fécondation *in vitro*
FIVETE : Fécondation *In Vitro* avec Transfert d'Embryon
FSH : Hormone Folliculo-Stimulante
G-CSF ou CSF-3: Granulocyte Colony Stimulating Factor
GH : Growth Hormone ou hormone de croissance
GM-CSF ou CSF-2: Granulocytes Macrophages Colony Stimulating Factor
GnSAF : Gonadotrophin Surge-Attenuating Factor
GnRH : Gonadolibérine
GPER1 : Récepteur aux œstrogènes couplé à une protéine G 1
ICSI : Injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde
IFN- α : Interferon alpha
IMSI : Intra-cytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection
IL : Interleukine
IP-10 : Interferon gamma – Induced Protein 10
hCG : hormone Chorionique Gonadotrope
H-hCG : hormone Chorionique Gonadotrope Hyperglycosylée
HLA-G : Human Leukocyte Antigen de type G
KO : Knock Out
LIF : Leukemia Inhibitory Factor
LH : Hormone Lutéinisante
LHCGR : Récepteur à la LH et à l'hCG
MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein 1

M-CSF ou CSF-1: Macrophages Colony stimulating Factor

MIP: Macrophage Inflammatory Protein

MMP : Métallo-protéases matricielles

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PMA : Procréation Médicalement Assistée

PR : Progesterone Receptor

TGF- β : Transforming Growth Factor Beta

TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha

uNK : Cellules utérines Natural Killers

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

WT : Wild Type

Introduction

Dans l'espèce humaine, l'établissement de la grossesse normale requiert un endomètre utérin réceptif, un blastocyste compétent ainsi qu'un dialogue complexe et synchronisé, à l'interface materno-embryonnaire, induisant la tolérance immunitaire à l'allogreffe fœtale et le remodelage vasculaire primordial pour la formation du placenta. En routine de Procréation Médicalement Assistée (PMA), moins de 5% des ovocytes collectés donnent lieu à une naissance. Par ailleurs, seuls 18 % des embryons transférés après un traitement de Fécondation in vitro (FIV) permettront la naissance d'un enfant. Ces échecs fréquents sont source de frustration pour le couple et conduisent à une multiplication des tentatives, physiquement et psychologiquement éprouvantes. Ces faibles performances sont obtenues malgré une tentative standardisée et précise de sélection des embryons ayant le meilleur potentiel implantatoire. Cependant, l'échec d'implantation embryonnaire reste, en 2015, l'obstacle principal au succès des traitements de FIV.

Différentes étapes cruciales surviennent lors de la grossesse: la fécondation, la fenêtre implantatoire, l'implantation (apposition, adhésion et invasion), la différenciation trophoblastique, son invasion et sa transformation en chorion lisse et villosité (1).

Durant ces différentes étapes, plusieurs acteurs interagissent, que ce soit au niveau cellulaire ou moléculaire. Une bonne implantation nécessite d'avoir un **embryon compétent** et un **endomètre réceptif** à cet embryon. Il a été montré que la compétence de l'embryon dépend à la fois du matériel génétique et protéique fourni par un **ovocyte fonctionnel** mais également d'un **spermatozoïde apte** à féconder l'ovocyte et à fournir un matériel génétique de qualité suffisante.

- Embryon compétent

L'embryon émet une série de molécules pour participer activement à son implantation dont la plus spécifique est l'hormone chorionique gonadotrope (hCG) qui module la tolérance immunitaire, l'angiogenèse et le processus invasif trophoblastique.

- Endomètre réceptif

L'endomètre est un tissu qui a la particularité de se développer et d'involver à chaque cycle menstruel. Alors que l'implantation peut se produire dans n'importe quel tissu du corps humain, l'endomètre est le seul dans lequel l'embryon ne peut pas s'implanter, excepté pendant une brève période appelée fenêtre implantatoire. Durant cette période, l'endomètre est hautement réceptif aux différents signaux et molécules émis par l'embryon lors des différentes étapes d'implantation. Beaucoup de molécules cibles ont été identifiées comme potentiels marqueurs de la réceptivité utérine, tels que des cytokines spécifiques, des facteurs de croissance, des facteurs d'angiogenèse ou des cellules immunologiques particulières. Récemment, l'équipe de Diaz-Gimeno a identifié par microarray un profil génomique qui pourrait être utilisé comme marqueur de la réceptivité utérine (2). Malgré tout, la définition des caractéristiques physiologiques d'un endomètre réceptif demeurent pour beaucoup de chercheurs une des grandes inconnues de l'implantation embryonnaire (3–5).

- Ovocyte fonctionnel

Du côté de l'ovocyte, les profils génomiques et protéomiques d'ovocytes compétents sont en cours d'étude. L'identification des marqueurs permettant de distinguer des ovocytes donnant des embryons capables de s'implanter des autres ovocytes est un des grands buts de la recherche actuelle. Par exemple, le granulocyte colony stimulating factor (G-CSF ou CSF-3) dans les fluides folliculaires individuels (FF) apparaît comme étant un bon discriminant de l'embryon correspondant à l'ovocyte ponctionné dans ce fluide (6, 7).

- Spermatozoïde apte

Pour réaliser une fécondation concluante, un bon ovocyte doit rencontrer un spermatozoïde normal, avec un ADN de bonne qualité qui n'a pas été endommagé, permettant le développement d'un blastocyste fonctionnel capable de dialoguer avec l'endomètre. Les lésions de l'ADN spermatique incluent notamment une fragmentation de cet ADN, des troubles de la condensation et des modifications épigénétiques pouvant conduire à une implantation défectueuse (8, 9).

La question la plus difficile à résoudre dans le processus d'implantation demeure le dialogue à l'interface materno-fœtale. L'embryon est capable d'interagir avec l'endomètre à l'aide de différentes molécules, cytokines et hormones. Il a l'aptitude de participer activement à sa propre implantation et d'influencer l'expression génique endométriale (10). A l'inverse, l'endomètre est capable de répondre à l'embryon d'une manière différentielle pour permettre ou empêcher l'implantation d'avoir lieu (11). En outre, au niveau du tractus génital féminin à proximité du site d'implantation, un réseau de cytokines intègre

les informations locales pour programmer l'embryon, adapter la réponse immunitaire maternelle et le remodelage tissulaire endométrial nécessaire au processus d'implantation (12).

Pour plus d'informations sur ces différents acteurs de l'implantation embryonnaire, un chapitre de livre écrit par mes soins est disponible en annexe 1.

Améliorer la connaissance de l'implantation embryonnaire humaine et donc le succès des programmes de PMA, implique dès lors que ces différents acteurs et leurs interactions soient pris en considération. Il est donc important de s'intéresser aux recherches fondamentales en étudiant des modèles animaux intéressants pour l'implantation embryonnaire mais également de réaliser de la recherche clinique - diagnostique et thérapeutique. Durant ma thèse, j'ai eu l'occasion de m'intéresser à ces deux facettes de la recherche (clinique et fondamentale) et cette introduction parlera donc à certains moments plus en profondeur de la souris et à d'autres moments s'intéressera plus aux résultats obtenus chez l'humain.

Cette introduction de thèse portera sur le tractus génital féminin humain et murin, l'ovocyte, l'embryon et leur rôle dans l'implantation embryonnaire.

1.1 Organogenèse des appareils génitaux murin et féminin

La différenciation morphologique de l'appareil génital peut être divisée en 3 étapes, la formation d'une gonade indifférenciée, la formation d'une gonade femelle et l'acquisition du phénotype morphologique.

1.1.1 La formation d'une gonade indifférenciée

Entre 4 et 6 semaines de développement embryonnaire chez l'homme et 10 à 11 jours après le coït chez la souris, les cellules germinales primordiales se déplacent depuis la vésicule vitelline jusqu'à la paroi du tube digestif, puis traversent le mésentère jusqu'à la paroi dorsale du corps. A ce niveau, elles se disposent de part et d'autre de la ligne médiane. Ces cellules se multiplient par mitose tout au long de leur migration. Lorsque les cellules germinales arrivent à destination au niveau de la 10^{ème} vertèbre thoracique chez l'homme, elles stimulent la prolifération de l'épithélium cœlomique adjacent et du mésonéphros (rein embryonnaire), ainsi que la formation d'une paire de crêtes génitales qui représentent les **gonades primordiales** (Figure 1). Ensuite, les cellules du mésonéphros et de l'épithélium cœlomique envahissent le mésenchyme de la région des gonades présomptives pour former des agrégats de cellules de soutien, les cordons sexuels primitifs, qui entourent complètement les cellules germinales. Ces cordons sexuels donnent naissance aux tissus qui nourriront et contrôleront le développement des cellules sexuelles : les cellules de la granulosa chez la femme et les cellules de Sertoli chez l'homme. A la même période, une nouvelle paire de conduits, les conduits paramésonephrotiques commencent à se mettre en place juste au côté latéral des conduits mésonéphriques. Ces conduits se forment par l'invagination, progressant dans le sens crânio-caudal, d'un ruban d'épithélium cœlomique. Sur la plus grande partie de leur longueur, ces conduits sont inclus dans la membrane basale des conduits mésonéphriques adjacents. Leur extrémité caudale grandit alors pour se connecter avec l'urètre pelvien, au côté médial des ostiums des conduits mésonéphriques droit et gauche. Les extrémités des deux conduits paramésonephrotiques adhèrent l'un à l'autre, à l'endroit où elles rejoignent l'urètre pelvien.

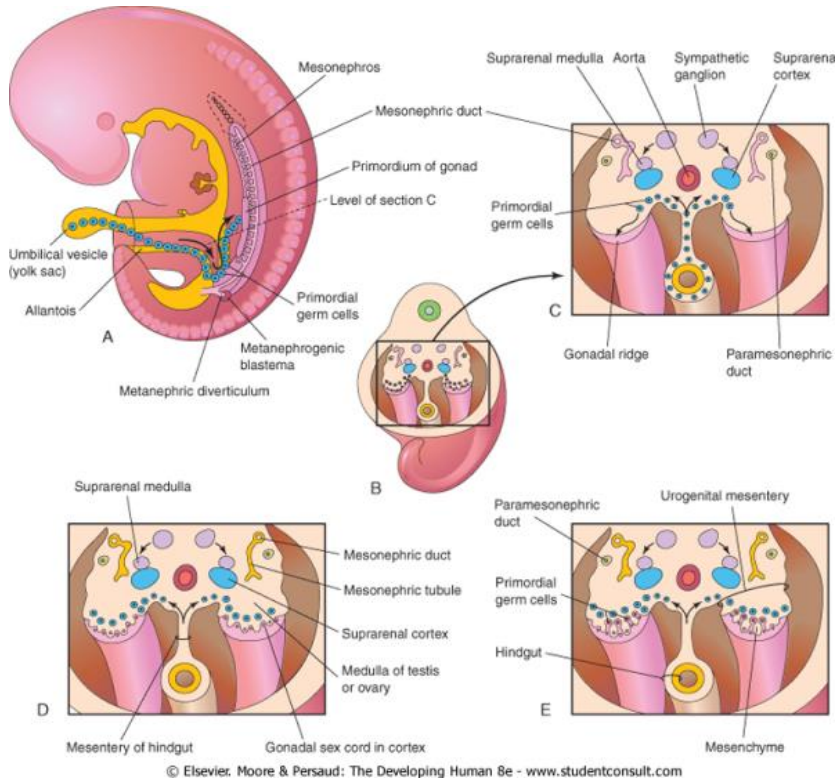


Figure 1 : développement des gonades indifférenciées

Figure extraite du livre de Moore & Persaud : *The Developing Human 7^{ème} édition*

1.1.2 La formation d'une gonade femelle

Chez les sujets génétiquement femelles, les cordons sexuels primitifs dégénèrent et le mésothélium de la crête génitale forme la corticale des cordons sexuels secondaires. Ces cordons secondaires envahissent les cellules germinales primordiales et donnent naissance aux cellules folliculaires de l'ovaire. Les cellules germinales femelles entrent en méiose mais le développement nucléaire ultérieur est inhibé par les cellules folliculaires. En conséquence, la maturation ovocytaire qui accompagne l'ovulation à l'âge adulte s'établit donc à partir d'une cellule bloquée au stade diplotène de la première division méiotique pendant une latence prolongée (entre la période embryonnaire et le moment de l'ovulation). Ceci explique que la sénescence des ovocytes chez la femme de plus de 35 ans s'accompagne d'un nombre accru d'anomalies génétiques. (La suite du développement des cellules germinales sera abordée dans le chapitre concernant l'ovocyte et son développement).

1.1.3 L'acquisition du sexe phénotypique

Les gonades en développement sécrètent des hormones qui permettent le développement de l'ensemble de l'appareil génital, soit mâle, soit femelle.

Chez le **mâle**, le gène SRY, présent sur le chromosome Y code pour un facteur de transcription activé pendant une courte période dans les cellules somatiques des cordons germinaux indifférenciés. Il initie le développement en cascade aboutissant notamment à la formation des testicules. Le gène SRY est exprimé dans les cordons sexuels et entraîne la production de la protéine SRY qui agit sur les cellules des cordons sexuels médullaires. Ces derniers, sous influence de la protéine SRY se différencient en cellules de Sertoli formant le testicule et sécrètent une hormone antimüllérienne (AMH). La protéine SRY déclenche aussi un signal induisant la différenciation des cellules de la crête génitale en cellules de Leydig produisant la testostérone. L'AMH diffuse localement dans le corps mésonéphrotique voisin et entraîne la dégénérescence du canal de Müller. La testostérone transforme le canal de Wolff en épидидyme et induit les organes sexuels mâles.

Chez la **femelle**, en l'absence de testostérone et d'AMH, les conduits mésonéphriques dégènèrent et les conduits paramésonéphrotiques de Müller se développent par invagination de l'épithélium au niveau du mésonéphros et forment le tractus génital de la femelle. Les parties distales des conduits paramésonéphrotiques adhèrent l'une à l'autre et s'unissent au tubercule sinusal. Les conduits fusionnent à partir de leur extrémité caudale en direction crâniale, formant un tube à lumière unique. Ce tube, appelé canal génital ou canal utéro-vaginal, devient la partie supérieure du vagin et l'utérus. Les portions supérieures, non fusionnées, des conduits paramésonéphrotiques deviennent les trompes utérines et les ouvertures supérieures de ces mêmes conduits donnent l'infundibulum (13–16).

1.2 Structure et morphologie de l'appareil génital murin et féminin

1.2.1 Souris

Le tractus reproducteur de la souris est composé de deux ovaires, de deux oviductes (équivalents aux trompes de Fallope) et d'un utérus constitué de deux cornes. Ces cornes lient les oviductes à une poche centrale débouchant dans le vagin (Figure 2).

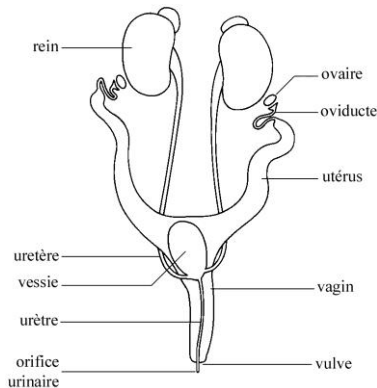


Figure 2 : tractus génital de la souris femelle

Figure extraite d'un cours de sciences de la vie de l'académie de Caen
(www.discip.crdp.ac-caen.fr)

La poche centrale de l'utérus est constituée de deux couches anatomiquement proches du corps utérin chez la femme.

1.2.2 Femme

L'appareil génital féminin interne est composé des ovaires, des trompes de Fallope, de l'utérus et du vagin.

L'**utérus** est un organe creux, musculaire et piriforme. Il est composé de 3 parties : le fond utérin, le corps utérin et le col utérin (Figure 3). Il est destiné à accueillir, héberger et pourvoir aux besoins de l'embryon et puis du fœtus durant son développement.

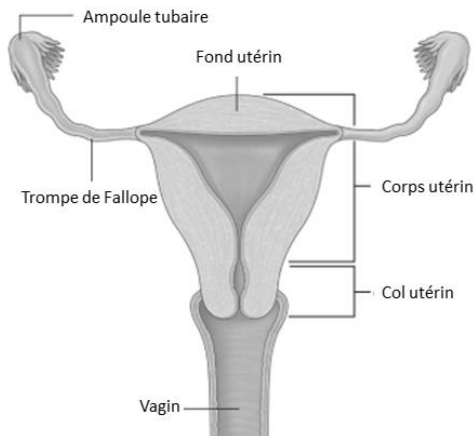


Figure 3 : tractus génital féminin

Figure extraite du livre de Drake et al., *Gray's anatomy for Students* 2^{ème} édition

La cavité de l'utérus est tapissée par la muqueuse endométriale. L'**endomètre** est une muqueuse de revêtement hautement vascularisée. Il est composé d'un épithélium prismatique simple reposant sur un épais tissu de soutien appelé stroma. L'endomètre présente deux couches. La couche en surface est la couche fonctionnelle ou *functionalis* ; c'est cette couche qui desquame lors des menstruations et qui subit des transformations lors du cycle menstruel féminin en fonction des variations de concentration des hormones sanguines. Elle est irriguée par les artères spiralées. La couche plus profonde et plus mince est la couche basale ou *basalis* ; elle assure la régénération d'une nouvelle couche fonctionnelle à la fin des règles.

Les **glandes endométriales** sont situées dans la partie stromale de l'endomètre et sont responsables de la sécrétion de facteurs de croissance nécessaires pour la grossesse et les fonctions utérines (revue dans (17)). Ces glandes sont non seulement responsables de la sécrétion de LIF (18), mais sont également indispensables à la décidualisation (19). L'importance de ces glandes pour l'implantation embryonnaire a été montrée par leur ablation par modifications transgéniques ou hormonale dans des modèles bovins et murins. Une stérilité due à une incapacité d'implantation de l'embryon est alors observée (20–22).

Les **ovaires** jouent un rôle exocrine en produisant des cellules germinales et un rôle endocrine via la sécrétion d'hormones telles que les œstrogènes et la progestérone.

1.3 Hormones impliquées dans le cycle menstruel et la grossesse

Les hormones déterminent et conditionnent non seulement les différences sexuelles du comportement mais également une structuration cérébrale différenciée selon le sexe (23). Elles ont un rôle déterminant dans le dimorphisme des organes génitaux mâle et femelle. Le rôle de ces hormones dans le cycle menstruel et dans la folliculogénèse sera décrit dans les parties relatives à ces sujets.

- Les **gonadotrophines** : l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH) sont des hormones glycoprotéiques sécrétées par l'adénohypophyse et communément appelées gonadotrophines. Elles tirent ce nom de leur implication dans l'augmentation des activités gonadiques mâles et femelles, autrement dit des testicules et des ovaires. L'human Chorionic Gonadotrophin (hCG) est également une gonadotrophine ayant une grande similitude avec la LH, ces deux hormones partagent d'ailleurs le même récepteur (LHCGR). Elle est sécrétée par l'embryon humain et sera détaillée plus loin.

- La **gonadolibérine** (GnRH) : elle est aussi appelée Gonadotropin-releasing Hormone et elle est synthétisée par des neurones de l'hypothalamus qui la sécrètent d'une manière pulsatile. C'est une hormone protéique responsable de la synthèse et de la sécrétion de la FSH et de la LH par l'adénohypophyse, processus qui est contrôlé par la fréquence et l'amplitude des oscillations de GnRH, elles-mêmes contrôlées par la quantité d'hormones stéroïdes dans le sang (24). Des agonistes et des antagonistes de cette hormone sont utilisés lors des traitements de procréation médicalement assistée (25).

- Les **œstrogènes** : ils font parties des stéroïdes sexuels. Ils sont essentiellement sécrétés au sein de l'ovaire par les follicules en développement et par le corps jaune. Cette sécrétion est sous le contrôle de la LH et de la FSH. Ils comprennent 3 formes distinctes : l'œstrone (E1), le 17 β -œstradiol (E2) et l'oestriol (E3). Les œstrogènes agissent via 3 types de récepteurs, les récepteurs aux œstrogènes (ER) Era et Er β , et un récepteur aux œstrogènes couplé à une protéine G 1 (GPER1). Era et Er β sont majoritairement associés avec des effets directs et indirects sur l'expression de gènes d'une manière ciblée. GPER1 pour sa part, lorsqu'il est lié à une membrane cellulaire, est responsable pour les actions œstrogéniques rapides non liées à l'expression des gènes car il active des cascades variées de protéines kinases. Les effets des œstrogènes sont également liés à des mécanismes épigénétiques. Des modifications au niveau des histones, des microARNs et au niveau de la méthylation de l'ADN ont été montrés comme influençant l'expression génique des ERs et régulés par la signalisation des œstrogènes (26). Les ERs sont notamment exprimés par les cellules épithéliales, stromales et endothéliales de l'endomètre.

Les œstrogènes jouent un rôle dans l'activation de l'ovogenèse ainsi que dans l'ovulation puisqu'ils stimulent l'élaboration des récepteurs de la FSH au niveau des cellules folliculaires et favorisent le pic ovulatoire de LH. Au niveau utérin, ils stimulent la prolifération et la préparation de l'endomètre à l'implantation. Enfin, ils modulent la sécrétion de la FSH et de la LH via un rétrocontrôle hypothalamo-hypophysaire.

- **La progestérone** : C'est une hormone de type lipidique. Elle est produite principalement par le corps jaune qui se développe dans l'ovaire après l'ovulation et c'est la LH qui stimule sa sécrétion. La progestérone est essentielle pour coordonner la physiologie de la reproduction chez le mammifère femelle. Les actions physiologiques de la progestérone sont réalisées par son interaction avec son récepteur, PR, qui est un membre de la famille des récepteurs nucléaires hormonaux activant des facteurs de transcriptions (27, 28). Lorsque PR est lié à la progestérone, il se lie à l'ADN (29) et recrute des protéines co-régulatrices qui activent ou répriment la transcription via des interactions avec les mécanismes de transcription généraux (30–32). La spécificité transcriptionnelle de PR dépend de la présence des différentes isoformes de PR et des protéines co-régulatrices dans les cellules cibles (33). PR peut interagir avec d'autres facteurs de transcription, comme SP1, AP1, FOX10, et la sous unité p65 de NfκB (34–36) pour moduler les activités transcriptionnelles. PR peut aussi interagir avec la kinase Src pour activer la voie de signalisation MAPkinase (37, 38) et il peut entrer en compétition en se liant à des sites de transcriptions entrant dans les mécanismes généraux pour empêcher l'accès à ces sites à d'autres facteurs de transcription activateurs, phénomène appelé « squelching » (39, 40). Il existe deux isoformes prédominantes de PR, PR-A et PR-B, qui sont transcrites à partir du même gène par deux promoteurs distincts, avec comme seule différence chez l'être humain que PR-B est plus grand que PR-A avec 164 acides aminés supplémentaires (41, 42). Cette différence engendre que PR-A et PR-B ont des activités transcriptionnelles différentes (43–45). La présence de multiples isoformes de PR augmente potentiellement la spécificité et la variété des actions de la progestérone dans des tissus particuliers. Son action touche de multiples organes incluant le cerveau, les seins, l'utérus, l'ovaire et le cervix (46). Elle a une action en synergie avec les œstrogènes pour favoriser et préparer l'utérus à l'implantation d'un éventuel embryon (47). La progestérone influence également le système immunitaire et permet l'établissement d'un équilibre immunologique nécessaire à l'implantation via son récepteur exprimé par les cellules T et les cellules utérine natural killers (uNK) (48). Elle permet d'établir une perméabilité vasculaire pré-implantatoire dans les veines endométriales (49). Il a été démontré que la progestérone avait un rôle critique pour l'initiation et l'évolution de la grossesse. S'il y a implantation, le placenta prendra le relais du corps jaune à la fin du premier trimestre pour le maintien d'un taux élevé de progestérone durant toute la grossesse.

- Les **inhibines** : En dehors des hormones stéroïdes, les ovaires sécrètent également les inhibines A et B. Par définition, l'inhibine est une substance sécrétée par l'ovaire qui inhibe la sécrétion de la FSH par la glande pituitaire (Franchimont et al. 1975). L'inhibine B est sécrétée par les follicules antraux en cours de croissance durant la phase folliculaire précoce alors que l'inhibine A est sécrétée par le corps jaune (de Kretser et al. 2002).

- La **prolactine** : La prolactine est une hormone protéique présentant une grande similitude avec l'hormone de croissance. Elle fait plus précisément partie des polypeptides somatomammotropes. Chez certains animaux, elle stimule les ovaires et certains la considèrent dès lors comme une gonadotrophine. Sa libération est inhibée par des hormones de l'hypothalamus ainsi que par les œstrogènes présents dans le sang chez la femme. Son rôle primordial est, comme son nom l'indique, le contrôle de la lactation. Elle joue aussi un rôle d'adjuvant pour les autres hormones. Ainsi durant la phase lutéale chez la rate, elle stimule l'accroissement du taux de récepteurs à l'œstradiol dans le corps jaune. De plus, elle est capable de moduler le nombre de récepteurs ovariens de la LH et d'affecter indirectement la stéroïdogénèse.

- La **leptine** : c'est une hormone participant au contrôle de la croissance fœtale et du développement embryonnaire. Elle module le caractère invasif du cytotrophoblaste (52) et favorise l'invasion trophoblastique par l'intermédiaire en partie des métallo-protéases matricielles (MMPs) (53, 54). En outre, l'injection intra-utérine d'un antagoniste de la leptine empêche l'implantation (55). Une autre étude par contre, montre qu'un abaissement du taux de leptine circulante augmente le taux d'implantation chez les souris (56). La leptine constitue un candidat intéressant dans le dialogue paracrine entre l'embryon et l'endomètre maternel. Au niveau ovarien, la leptine est retrouvée dans les fluides folliculaires (57, 58) et les résultats sur une action possible de la leptine sur la maturation de l'ovocyte ou le développement embryonnaire sont controversés (59).

1.4 Modifications cycliques du tractus génital

Les modifications cycliques du système reproducteur sont orchestrées par la sécrétion d'hormones libérées par l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique, elles-mêmes régulées par des rétrocontrôles négatifs. Un petit peptide, la GnRH est sécrété par l'hypothalamus et elle stimule la sécrétion de deux gonadotrophines par l'antéhypophyse : la LH et la FSH. La variation cyclique de la concentration de ces deux gonadotrophines module la production cyclique des hormones sexuelles par les ovaires. Ces hormones induisent à leur tour la périodicité du cycle œstral ou menstruel selon l'espèce étudiée. Les hormones ovariennes (stéroïdes et non stéroïdes) sont les médiateurs principaux des effets ovariens sur le système hypothalamo-hypophysaires. Les substances ovariennes non stéroïdes comprennent notamment les inhibines A et B ainsi qu'un facteur appelé GnSAF (gonadotrophin surge-attenuating factor). Les deux stéroïdes principaux sécrétés par l'ovaire sont l'œstrogène, principalement durant la phase proliférative, et la progestérone, principalement durant la phase sécrétoire. Cependant, le rôle de chacun n'est pas limité à certaines périodes du cycle menstruel et ce sont d'importants régulateurs de la sécrétion des gonadotrophines à travers tout le cycle (60).

Les hormones jouent également un rôle important dans le contrôle du cycle menstruel en modifiant cycliquement l'endomètre. Les stéroïdes sexuels produits par l'ovaire sont essentiels pour la prolifération et la décidualisation de l'endomètre, le préparant ainsi à l'implantation embryonnaire (61). Les œstrogènes stimulent la prolifération de l'épithélium endométrial contrairement à la progestérone qui l'inhibe. Cette inhibition est essentielle pour l'établissement de la grossesse lors de la phase d'implantation embryonnaire et est sous la dépendance de Hand2 (62). Dans les cellules qui expriment à la fois les récepteurs aux œstrogènes et ceux à la progestérone, les hormones se lient à leur récepteur et peuvent réguler directement la physiologie de l'endomètre. Des études ont mis en évidence que des interactions paracrines entre les cellules épithéliales et stromales de l'endomètre peuvent réguler leur réaction aux hormones. L'absence de prolifération des cellules épithéliales endométriales mises en culture sous l'action des œstrogènes supporte cette théorie (63). Des études récentes utilisant des souris KO conditionnelles pour ERα au niveau de l'épithélium endométrial et des systèmes de co-cultures de cellules épithéliales et stromales utérines confirment cette hypothèse (64, 65).

Une étude en PMA réalisée chez des patientes ayant recours à des dons d'ovocytes montre qu'en dépit des diverses hormones produites par l'ovaire durant le cycle menstruel, les œstrogènes et la progestérone seuls seraient suffisants pour préparer un endomètre hautement réceptif chez l'être humain. Sans ces stéroïdes, l'endomètre ne présente que peu de modifications morphologiques et la différenciation biochimique requise pour l'établissement et le maintien d'une grossesse fait défaut (66).

1.4.1 Souris

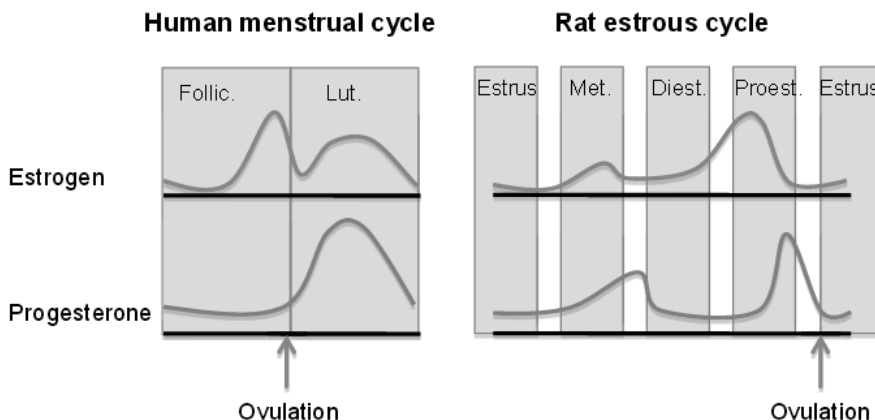


Figure 4 : cycle menstruel et cycle œstral

Comparaison au niveau des phases de cycle et au niveau hormonal entre le cycle menstruel féminin et le cycle œstral du rat semblable à celui de la souris.

Figure extraite de l'article de Lebron-Milad et al., *Sex differences, gonadal hormones and the fear extinction network: Implications for anxiety disorders*, 2012

Le cycle nommé œstral est l'intervalle entre deux ovulations successives et comprend la phase folliculaire, appelée proœstrus, l'ovulation, correspondant à l'œstrus et la phase lutéale, divisée en metoœstrus et dioœstrus (Figure 4). Le cycle œstral dure généralement 5 jours en l'absence de fécondation. S'il y a fécondation et implantation d'un embryon, la grossesse dure entre 18 et 21 jours. Le cycle est dit de type polyœstrus autrement dit, la souris a plusieurs petits par portée (entre 4 et 12). Le nombre de portées varie entre 3 et 4 par an. Comme chez la femme, un nouveau cycle commence lors du premier jour des menstruations (invisibles chez la souris) et il est largement sous contrôle photopériodique.

Le cycle œstral chez la souris comprend donc 4 grandes périodes. Ces 4 périodes sont différenciables par leur climat hormonal, leur croissance et leurs différences cellulaires. En laboratoire, ces périodes sont identifiables par une méthode de lavement vaginal puis une coloration hématoxyline-éosine. En effet, au niveau cellulaire, de grandes différences de populations permettent la différenciation des différentes phases à l'aide d'un microscope optique (Figure 5) (67–69).

Le proœstrus

Cette phase correspond à la maturation des follicules qui peuvent suivre 2 voies : soit ils mûrissent et libèrent un ovocyte, soit ils participent à la sécrétion des œstrogènes. Au niveau de l'endomètre, cette phase est caractérisée par une grande prolifération des cellules basales pour la constitution d'un endomètre

fonctionnel. Au microscope, ce stade est caractérisé par la présence de cellules épithéliales rondes et nucléées (les noyaux sont particulièrement visibles) ainsi que par l'absence de leucocytes.

L'œstrus

Il s'agit d'une phase très courte menant à l'ovulation. Elle est caractérisée par l'apparition d'un pic ovulatoire de LH qui entraîne la rupture du follicule et la formation du corps jaune. Ce pic ovulatoire apparaît consécutivement à l'augmentation de la production d'œstrogènes par le follicule. Cette augmentation entraîne un accroissement de la kératinisation des cellules épithéliales du vagin. L'ovulation n'a lieu que pour les follicules ovariens matures ayant acquis une concentration adéquate au niveau des récepteurs à la LH (LHCGR). Chez la souris, c'est uniquement durant cette phase que la femelle accepte le coït. Sur le frottis vaginal, l'œstrus est caractérisé par des cellules épithéliales cornifiées. Ces cellules sont préférentiellement agglomérées et sans noyau visible. A ce stade, l'absence complète de leucocytes et de cellules nucléées constitue un critère de distinction.

Le metoestrus

Cette phase correspond à une phase d'organisation fonctionnelle du corps jaune, à la production de progestérone ainsi qu'à la transformation lutéale de l'endomètre. La production de progestérone et d'œstrogènes entraîne plusieurs remaniements des muqueuses utérine et vaginale. Une invasion leucocytaire de l'épithélium vaginal et de l'endomètre succède à cet état au moment du metoestrus. Le metoestrus est une phase pouvant être subdivisée en 2 : le metoestrus I et le metoestrus II, définis suivant la proportion de cellules leucocytaires par rapport aux cellules épithéliales cornifiées visibles sur le frottis vaginal.

Le dioestrus

Lors de cette phase, les corps jaunes sont présents dans l'ovaire et sécrètent de la progestérone (favorisant ainsi l'implantation et le maintien éventuel d'une grossesse). En l'absence de grossesse, le corps jaune involue et l'endomètre disparaît. Chez la souris, il n'y a pas de menstruations visibles car la muqueuse utérine est résorbée et non expulsée après sa prolifération.

Le dioestrus est identifiable par la présence quasi exclusive de leucocytes sur frottis vaginal ainsi que par la réapparition discrète de cellules épithéliales nucléées. Il peut parfois persister quelques cellules cornifiées généralement peu nombreuses.

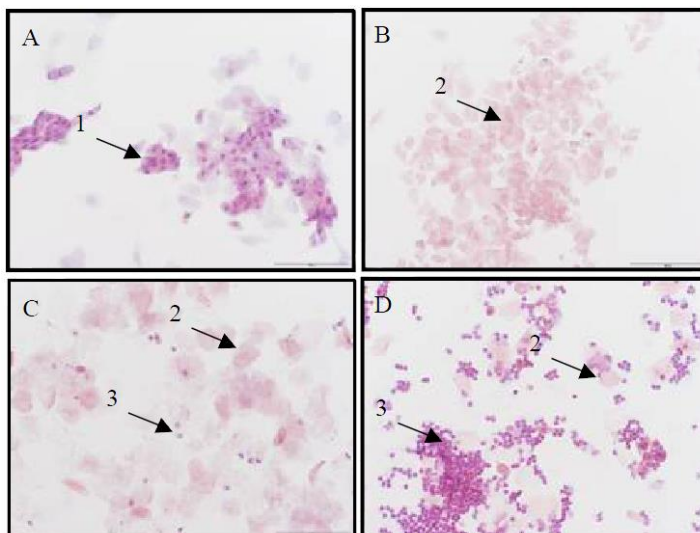


Figure 5 : frottis vaginaux de souris Balb/c à différents moments du cycle oestral
(Marquage hématoxyline éosine). (A) Proestrus, (B) Oestrus, (C) Metoestrus et (D) Dioestrus.

1 : Cellules rondes épithéliales avec des noyaux bien individualisés, 2 : Cellules épithéliales kératinisés, 3 : Leucocytes. Grossissement original : *200.

Figure réalisée au laboratoire d'Immunoendocrinologie et Embryologie de V. Geenen

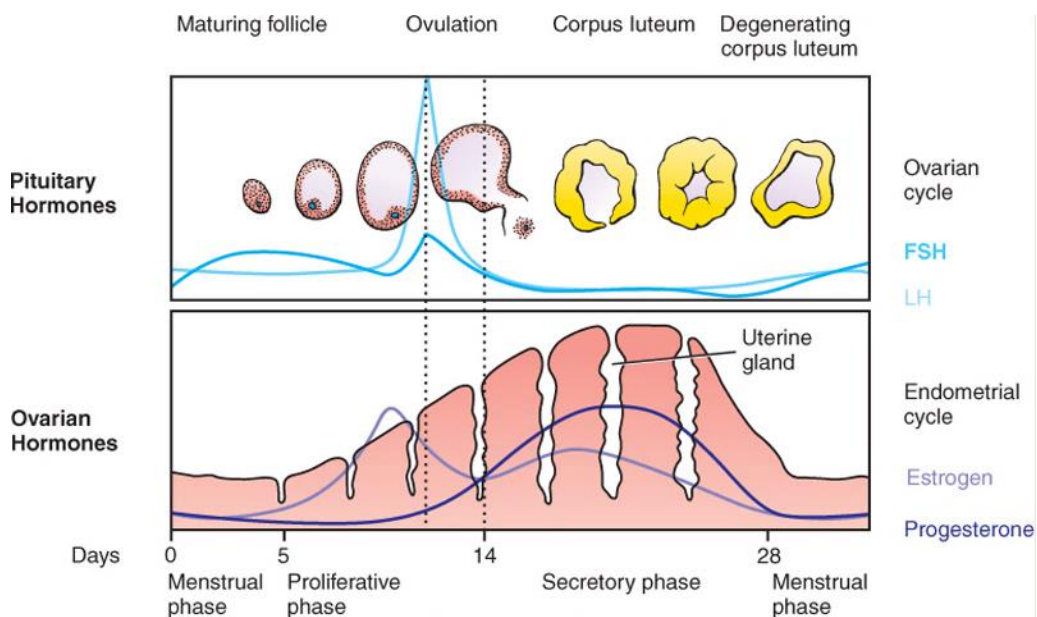
1.4.2 Femme

Le cycle menstruel chez la femme correspond à la période séparant 2 menstruations. Il reprend l'ensemble des phénomènes physiologiques, survenant de façon périodique, préparant le corps de la femme à une éventuelle grossesse. Ce cycle est sous contrôle endocrinien (Figure 6). La durée d'un cycle menstruel normal est classiquement de 28 jours mais il y a des femmes avec des cycles plus courts ou plus longs, allant de 25 à 35 jours.

Phase proliférative ou folliculaire

Elle commence après la période de menstruations et s'étend dans un cycle classique entre le 5^{ème} et le 14^{ème} jour, jour de l'ovulation. Elle est caractérisée par une épithélialisation et une prolifération des compartiments épithélial, stromal et vasculaire entraînant un épaissement rapide de l'endomètre sous l'effet des œstrogènes sécrétés par les ovaires. Les follicules ovariens grandissent jusqu'au moment de l'ovulation sous l'effet de la FSH.

Durant la phase folliculaire précoce, les deux acteurs principaux du rétrocontrôle négatif ovarien sur la sécrétion de la FSH et de la LH sont l'œstradiol et l'inhibine B alors que durant le reste de la phase folliculaire tardive, l'effet de la progestérone est ajouté à l'effet œstrogénique (60).



Schoenwolf et al: Larsen's Human Embryology, 4th Edition.

Figure 6 : cycle menstruel féminin

Figure extraite du livre de Larsen, Human Embryology 4^{ème} édition

Milieu du cycle

Au 14^{ème} jour du cycle, de grosses modifications au niveau de la sécrétion des hormones de la reproduction ont lieu avec l'augmentation massive de gonadotrophines, aussi appelée le pic de LH. Cette augmentation est le résultat d'une activation d'un mécanisme de rétrocontrôle positif par le follicule mature via la sécrétion de hauts taux d'œstradiol. Ce phénomène sera expliqué plus en détail plus loin dans ce travail.

La fin du pic LH est également contrôlé par des facteurs ovariens et plus particulièrement la progestérone (70), résultat confirmé par des expériences réalisées chez des femmes ovariectomisées (71).

Phase sécrétoire ou lutéale

Lors de cette phase, en plus des œstrogènes, l'endomètre est sous l'influence de la progestérone. Cette dernière est sécrétée par le follicule ovarien transformé en corps jaune. Le corps jaune a une durée de vie limitée à 14 jours s'il n'est pas soutenu par l'hCG, autrement dit s'il n'y a pas de fécondation de l'ovule et puis implantation de l'embryon, la phase sécrétoire s'arrête avec l'apparition des menstruations. S'il y a implantation embryonnaire, l'endomètre subit une transformation appelée **déцидualisation**. Cette déцидualisation est caractérisée

par une transformation des cellules stromales endométriales, une reconstruction vasculaire, un recrutement des cellules immunologiques, un remodelage de la matrice extracellulaire et une grande production de molécules. Les cellules stromales déцидualisées sont décrites comme pseudo-épithéliales, elles produisent des protéines de la lame basale, ont une plus grande activité métabolique et ont un cytosquelette plus léger que les cellules stromales classiques. Cette différenciation cellulaire est sous dépendance des œstrogènes et de la progestérone (72). Cette transformation tissulaire est nécessaire pour l'implantation embryonnaire.

Durant la phase lutéale, ce sont les actions combinées de la progestérone, des œstrogènes et de l'inhibine A qui exercent le rétrocontrôle négatif ovarien sur la sécrétion des gonadotrophines (60).

C'est durant cette phase sécrétoire qu'a lieu la fenêtre implantatoire décrite ci-dessous.

La fenêtre implantatoire

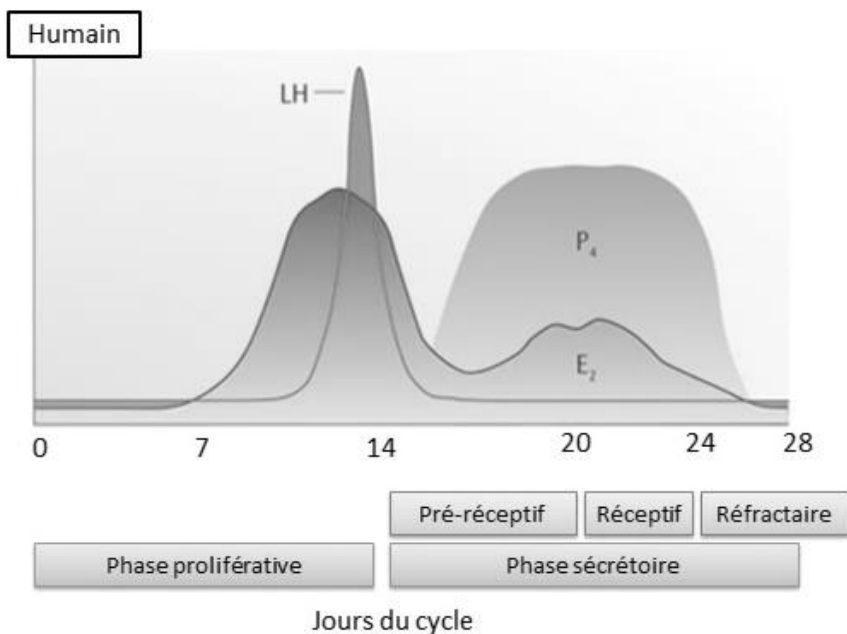


Figure 7 : la fenêtre implantatoire

Figure extraite de l'article de Wang and Dey, *Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models*, 2006 (73)

La **fenêtre implantatoire** se définit comme une période de temps déterminée durant laquelle l'endomètre est capable d'accueillir l'embryon et de permettre son invasion (74). Dans un cycle régulier classique de 28 jours où le jour 1 est défini comme le premier jour des menstruations, elle a lieu normalement entre le jour 20

et le jour 24. L'ovulation se déroulant au jour 14 de ce cycle, l'embryon est lui-même apte à s'implanter lors de son 6^{ème} jour de développement (autrement dit aux alentours du 20^{ème} jour du cycle menstruel). En dehors de cette fenêtre implantatoire, un embryon n'arrivera pas à s'implanter dans l'endomètre (Figure 7) (75).

Les modifications anatomiques à la surface de l'épithélium de l'endomètre correspondent à l'apparition de microprotrusions à la surface apicale de cet épithélium appelées pinopodes. Elles apparaissent 6 jours après l'ovulation et restent présentes pendant 24h (76). Cette apparition facilite le contact entre l'embryon et l'endomètre.

Le terme « **réceptivité utérine** » réfère à la capacité de l'endomètre d'accepter et d'accueillir un embryon en cours de développement permettant à une femme de mener une grossesse à terme. Le développement endométrial permettant cette réceptivité utérine durant la fenêtre implantatoire nécessite une collaboration étroite d'un grand nombre de facteurs (77). Ce développement est coordonné en un premier temps par des hormones ovariennes, les œstrogènes et la progestérone (78). La réceptivité endométriale dépend d'un contrôle moléculaire et d'évènements cellulaires précis et dynamiques qui permettent l'implantation embryonnaire et le maintien de la grossesse. Ce processus dynamique implique des acteurs paracrines, autocrines et endocrines coordonnés. Chez la majorité des mammifères, les hormones stéroïdes ovariennes jouent des rôles importants dans la réceptivité endométriale, l'implantation du blastocyste et le maintien de la grossesse. La progestérone est essentielle pour l'implantation embryonnaire, cela été prouvé par (1) la neutralisation de la progestérone circulante par l'injection d'anticorps spécifiques (79) et par (2) le blocage de son récepteur au niveau des organes cibles (80).

Il est nécessaire actuellement de déterminer une évaluation fonctionnelle permettant de diagnostiquer un endomètre comme réceptif. Il n'existe que peu de méthodes diagnostiques permettant de déterminer si un endomètre est « réceptif » ou non. La méthode la plus utilisée pour déterminer les phases du cycle menstruel est une méthode d'analyse immunohistochimique selon les critères de Noyes (81). Cependant, la précision et la pertinence de cette méthode pour le transfert embryonnaire lors de traitements FIV ont été remises en question suite à des études randomisées à ce sujet (82, 83).

Une large gamme de médiateurs moléculaires a été identifiée qui pourrait permettre de déterminer cette réceptivité, incluant des molécules d'adhésion, des cytokines, des facteurs de croissances et des lipides (84, 85).

Une méthode diagnostique récente permettant de déterminer si un endomètre est « réceptif » ou non a été conceptualisée et testée par l'équipe de Diaz-Gimeno, appelée le ERA pour « endometrial receptive assay » (86). Cette méthode consiste en un array personnalisé comprenant 238 gènes qui sont

exprimés différemment en fonction de la réceptivité de l'endomètre. L'analyse de l'expression de ces 238 gènes est réalisée par un prédicteur informatique qui est capable de déterminer si l'endomètre est en période de fenêtre d'implantation en fonction de l'expression de ces gènes. La signature génique utilisée par le prédicteur a été obtenue en sélectionnant les gènes dont l'expression était cohérente dans 3 modèles différents de réceptivité utérine : (1) un cycle naturel de femmes fertiles comme modèle optimal, (2) un cycle sous hyperstimulation ovarienne contrôle comme moins optimal et (3) un endomètre en période réfractaire comme contrôle négatif (87, 88). Selon les résultats obtenus par cette équipe, une femme présenterait sa fenêtre implantatoire à chaque même période du cycle durant les cycles qui suivent leur analyse. Cela permettrait de déterminer le meilleur moment durant lequel transférer l'embryon lors de traitement FIV avec de plus grandes chances de succès qu'avec des analyses histologiques classiques (86).

D'autres études se sont intéressées à des analyses de sécrétions utérines qui seraient moins invasives qu'une biopsie de l'endomètre et qui pourraient se faire lors d'un cycle de conception (89). Les prostaglandines E₂ et F_{2α} ont été étudiées dans le cadre d'une étude de la lipidomique de l'endomètre et se sont révélées comme des marqueurs potentiels de la réceptivité utérine (90).

Des modèles d'implantation fonctionnels *in vitro* pour étudier le dialogue materno-fœtal permettraient une meilleure compréhension des interactions entre les différentes molécules impliquées. Malheureusement, de tels modèles n'ont pas encore été développés.

Chez des femmes présentant des désordres gynécologiques (tels que de l'endométriose, des maladies tubaires, un endomètre trop fin, un syndrome d'Asherman, des polypes, des problèmes endométriaux ou des syndromes d'ovaires polykystiques), la réceptivité utérine semble être compromise, menant à une infertilité (84, 91, 92). Des modifications persistantes ou temporaires dans l'organisation et la fonctionnalité de l'endomètre peuvent grandement affecter l'embryon pré-implantatoire avec des conséquences pouvant aller jusqu'en fin de grossesse (91).

Menstruations

En cas d'absence de fécondation puis d'implantation, le corps jaune involue et la production d'œstrogènes et de progestérone diminue. Cette chute hormonale entraîne d'importantes modifications telles que des réactions au niveau des artères spiralées induisant une nécrose de la muqueuse par déficit d'oxygénation tissulaire (93), des phénomènes d'apoptose (94), une perte tissulaire et la desquamation de l'endomètre correspondant aux menstruations. L'hypoxie nécessaire à la réalisation des menstruations est actuellement sujet de controverse (95).

1.5 L'ovogenèse et l'ovocyte

L'ovocyte est la cellule germinale féminine impliquée dans la reproduction. C'est une des plus grandes cellules du corps féminin, contrairement au spermatozoïde qui est une des plus petites cellules du corps masculin, et il se développe dans un follicule. Le follicule est une unité de l'ovaire qui permet le développement de l'ovocyte durant les phases d'ovogenèse et de folliculogenèse au sein du cortex ovarien (96). Les facteurs maternels jouent un rôle prédominant durant le développement embryonnaire précoce. En effet, l'ovocyte supporte exclusivement le clivage précoce de l'embryon jusqu'au stade de 4 à 8 cellules.

1.5.1 L'ovogenèse

La lignée cellulaire germinale est établie très tôt durant le développement embryonnaire. Les cellules germinales primordiales sont identifiables dans l'endoderme du sac vitellin à partir de la fin de la 3^{ème} semaine de gestation (97, 98). Ces cellules, appelées ovogonies, prolifèrent, et ensuite migrent pour finalement atteindre la crête génitale 6 semaines après la fécondation. Vers la 8^{ème} semaine, le nombre d'ovogonies atteint approximativement 600000 cellules par division mitotique. A partir de ce moment, le nombre de cellules est influencé par 3 processus concurrents : mitoses, méioses et atrésies cellulaires. Comme résultat d'un effet combiné de ces 3 processus, le nombre de cellules germinales atteint un pic de 6 à 7 millions de cellules à 20 semaines de gestation.

Entre le 8^{ème} et la 13^{ème} semaine de vie fœtale, certaines des ovogonies entrent en prophase de la première division méiotique. Cette transformation marque la conversion des ovogonies en ovocytes primaires, bien avant la formation du follicule. Les ovogonies persistantes à 7 mois de gestation sans entrer en méiose subissent un processus de mort cellulaire par apoptose ; par conséquent les ovogonies ne sont généralement plus présentes à la naissance. Le nombre d'ovocytes diminue également à la moitié de la gestation, pour atteindre approximativement 700000 follicules primordiaux dans les ovaires au terme de la grossesse. Ce nombre diminue encore aux alentours de 300000 au moment de la puberté, et de ces follicules, seulement 400 à 500 deviendront des follicules mûrs donnant lieu à une ovulation au cours de la période de vie reproductive de la femme. L'ovocyte primaire ne termine donc pas la méiose 1 et reste à l'étape de prophase I. Le noyau de cet ovocyte primaire est appelé vésicule germinative et ses chromosomes continuent de synthétiser des ARNm nécessaires à la fabrication d'une grande quantité de protéines. Ces protéines sont essentielles pour la maturation de l'ovocyte et le développement potentiel d'un embryon en cas de fécondation (96).

En dépit du dogme généralement accepté que le nombre de follicules et d'ovocytes est établi dans l'ovaire à la naissance durant la période fœtale plutôt que dans la vie adulte, de nouvelles études mettent cette théorie en péril (99). En 2005, Bukovsky et son équipe ont montré que des cellules ressemblant à des ovocytes pouvaient se développer *in vitro* dans des cultures de cellules épithéliales de l'ovaire (100). Ces résultats ont été confirmés avec des cellules provenant de femmes ménopausées et chez des femmes en insuffisance ovarienne prématurée caractérisées par des ovaires non fonctionnels et n'ayant pas de follicules ou d'ovocytes naturellement présents (101).

L'ovocyte persiste en prophase de la première division méiotique jusqu'au moment précédant l'ovulation, lorsque la méiose reprend. L'ovocyte primaire se divise en 2 donnant 2 cellules haploïdes, l'ovocyte secondaire et le globule polaire non fonctionnel. Pour expliquer cet arrêt de processus méiotique, il a été proposé qu'un inhibiteur de la maturation de l'ovocyte produit par les cellules de la granulosa soit responsable de ce maintien en prophase I. En effet, l'enlèvement de l'ovocyte de son environnement intrafolliculaire aboutit à une reprise de division méiotique de l'ovocyte. Donc, l'inhibition de la méiose nécessite la présence des cellules de la granulosa entourant l'ovocyte. L'AMPC est également reconnu comme facteur nécessaire au contrôle (et à l'arrêt) de la maturation de l'ovocyte (102, 103).

L'ovocyte en croissance est une cellule métaboliquement active, synthétisant des ARNm et des protéines qui supporteront la croissance et le développement de l'embryon pré-implantatoire (104). Le développement de l'ovocyte est supporté par un transport bidirectionnel de nutriments, de facteurs de croissance et d'autres molécules à travers les jonctions GAP qui le relie aux cellules de la granulosa autour de lui. La quantité des organites cytoplasmiques augmente, particulièrement les mitochondries qui sont estimées à un nombre approximatif de 500000 dans un ovocyte humain mature (105). La distribution spatiale des ovocytes change, avec un regroupement des mitochondries, du réticulum endoplasmique et des appareils de Golgi dans la région entourant directement la vésicule germinale (106). L'ovocyte devient alors hautement asymétrique.

La croissance de l'ovocyte est accompagnée par la formation de la **zone pellucide**, une matrice extracellulaire entourant l'ovocyte (107). Cette zone pellucide protège le développement de la cellule germinale dans le follicule, l'œuf fécondé dans la trompe de Fallope et l'embryon lors de ses premières divisions mitotiques.

A la fin du développement de l'ovocyte, la transcription est activement mise en pause et la traduction des ARNm en protéines est fortement ralentie. La mise en pause de la transcription requiert une communication aisée par les jonctions GAP avec les cellules du cumulus et est accompagnée par des modifications importantes dans la structure de la chromatine (108, 109).

1.5.2 La folliculogénèse

Les follicules primordiaux dans l'ovaire humain (30 à 60 µm de diamètre) sont composés d'un ovocyte primaire (9 à 25 µm de diamètre) entouré d'une couche monocellulaire de cellules de la granulosa aplaties. Les follicules primaires (>60 µm de diamètre) sont caractérisés par un ovocyte primaire entouré par une couche monocellulaire de cellules de la granulosa de forme cuboïde. Les follicules secondaires (>120 µm) consistent en un ovocyte primaire entouré par plusieurs couches cellulaires de cellules de la granulosa de forme cuboïde (<600 cellules). Le milieu dans lequel l'ovocyte se développe au sein des cellules de la granulosa s'appelle le fluide folliculaire (FF). La maturation d'un follicule primordial en follicule dominant prend approximativement une année (Figure 8). Durant la majorité de cette période (aux alentours de 300 jours), le follicule grandit indépendamment des gonadotrophines ; cette croissance est dépendante des cytokines et de facteurs paracrines ovariens. Les gonadotrophines n'influencent le développement folliculaire et la maturation ovocytaire que durant les dernières semaines précédant l'ovulation (110).

L'initiation du développement folliculaire est caractérisée par des modifications morphologiques, incluant un changement dans la forme des cellules de la granulosa, une prolifération de ces cellules, une croissance de l'ovocyte et la formation de la membrane pellucide.

Entre 5 et 6 jours avant l'ovulation, le follicule entreprend une expansion rapide – résultat d'une prolifération des cellules de la granulosa et d'une accumulation du fluide folliculaire – et migre vers la surface ovarienne. Le follicule porte maintenant le nom de Follicule de Graaf et est prêt pour l'ovulation.

Parmi tous les follicules qui auront commencé leur maturation durant un cycle, en général, un seul de ces follicules atteindra le stade de l'ovulation, il est appelé le **follicule dominant**. Les autres subiront une atrophie cellulaire durant leur développement. Durant la phase folliculaire précoce, il n'y a pas de différence morphologique entre le follicule dominant et les autres follicules de sa cohorte. Malgré tout, ce follicule peut être distingué des autres par sa taille et le haut index mitotique de ses cellules de la granulosa. C'est également le seul qui a un taux élevé de FSH détectable dans son fluide folliculaire. Il a un niveau significativement plus élevé d'œstradiol. La FSH stimule la croissance folliculaire, l'activité aromatasase des cellules de la granulosa et induit l'expression des récepteurs à la LH sur la membrane des cellules de la granulosa ainsi que la sécrétion d'œstradiol (111).

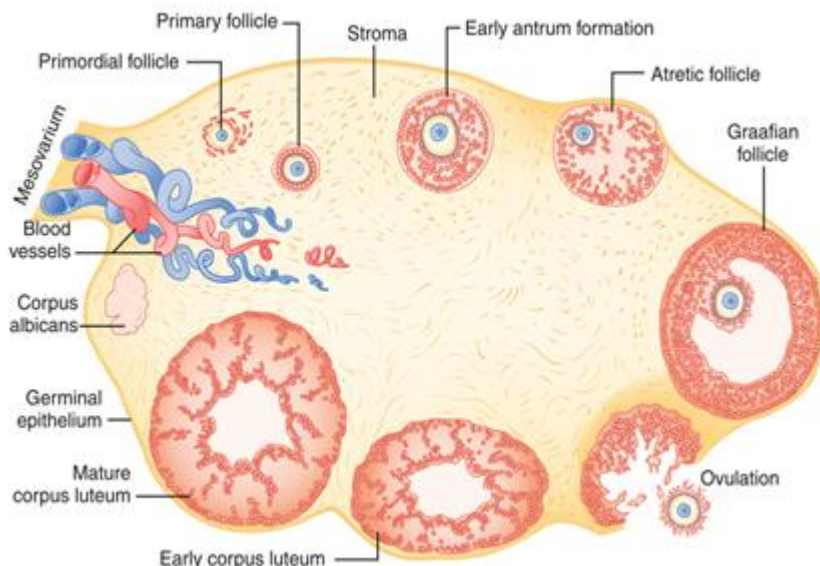


Figure 8 : le développement folliculaire

Figure extraite du livre de Strauss and Lessey, *The ovarian life cycle*, 2009

La vascularisation du follicule est également un élément central pour son développement. Une inhibition du vascular endothelial growth factor (VEGF) bloque la maturation du follicule secondairement à une atténuation de la densité vasculaire du follicule ou d'une réduction de la perméabilité vasculaire, ce qui peut limiter l'accès de facteurs de croissance ou d'hormones nécessaires au développement du follicule (112).

L'atrésie peut arriver à n'importe quel stade du développement folliculaire, spontanément ou en réponse à des facteurs environnementaux ou à des drogues. Une atrésie spontanée est le résultat d'une absence de facteurs de croissance essentiels à différents moments critiques du développement folliculaire (113, 114). La mort par apoptose est largement responsable de l'élimination des ovocytes ainsi que des cellules de la granulosa. Le système Fas-Fas ligand a été décrit comme médiateur principal de ces événements (115–117).

La maturation de l'ovocyte en un ovocyte fonctionnel dépend du microenvironnement qui l'entoure, à savoir l'antra du follicule. Cet antra est composé de cellules (la thèque, la granulosa et le cumulus), de la lamina basalis, séparant la thèque interne vascularisée et les cellules de la granulosa du fluide folliculaire (Figure 9). Chacune de ces parties a un rôle dans le développement ovocytaire (118). L'ovocyte est donc en contact direct avec les cellules de la granulosa. La lamina basalis forme une barrière sang/follicule qui restreint l'entrée de leucocytes.

Dans cette introduction, nous allons plus particulièrement nous intéresser au fluide folliculaire, élément important de notre recherche.

1.5.3 Le fluide folliculaire

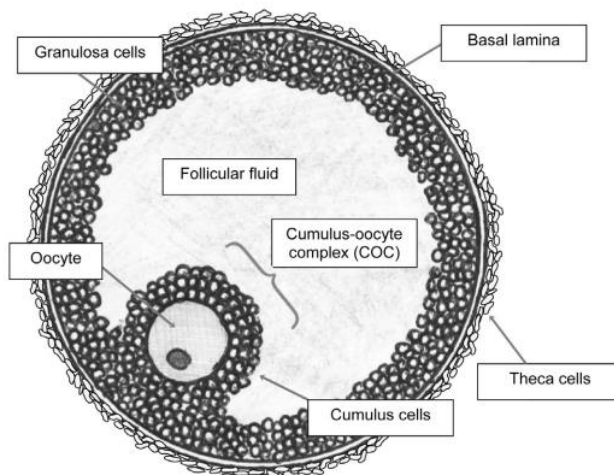


Figure 9 : représentation schématique d'un follicule

Figure extraite de l'article de Hennet and Combelles, *The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation*. 2012(118)

Le fluide qui se trouve dans l'antra folliculaire s'accumule à partir du stade précoce du développement folliculaire. Il est dérivé du sang et des composants sécrétés par les cellules somatiques se trouvant dans le follicule. Il contient une grande variété de molécules incluant des hormones stéroïdes et protéiques, des anticoagulants, des enzymes, des cytokines et des électrolytes. Sa composition est distincte de celle du sérum, suggérant qu'elle est programmée pour correspondre aux besoins de l'ovocyte. L'équilibre entre les molécules réactives à l'oxygène et les antioxydants dans les FF semble important pour un développement harmonieux de l'ovocyte (119–121). Les hormones se trouvant dans les FF incluent la FSH, la LH, l'hormone de croissance (GH), l'hCG, la progestérone et l'œstradiol. Généralement, un taux élevé dans les FF de FSH, hCG et LH semble promouvoir la maturation ovocytaire et est corrélé avec une haute probabilité de fécondation. Un haut taux d'œstradiol est aussi associé avec une bonne qualité ovocytaire et folliculaire (119). En réponse à la présence de ces hormones, les cellules formant le follicule sécrètent une grande quantité de facteurs qui influencent la maturation ovocytaire. Les FF contiennent des métabolites qui s'accumulent dans les ovocytes pour leur fournir le matériel intracellulaire nécessaire pour leur différenciation. Ces métabolites incluent les acides aminés, les lipides, les nucléotides et d'autres molécules de petites tailles. Au niveau clinique, le FF est facilement accessible lors de la ponction ovocytaire pour les études qui contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes

liés au développement des follicules, de la qualité ovocytaire et sur les causes des hyperstimulations ovariennes (122, 123).

1.5.4 L'ovulation

Les œstrogènes sécrétés par l'ovaire exercent la majorité du temps un rétrocontrôle négatif sur la glande pituitaire pour réguler la production de la LH et de la FSH sauf justement au moment de l'ovulation où ce feedback devient positif et engendre donc le pic de LH caractéristique de l'ovulation. Différents mécanismes ont été étudiés pour comprendre ce rétrocontrôle positif. Citons notamment que l'œstradiol augmente la sensibilité de la glande pituitaire à la GnRH via une augmentation d'expression du récepteur de la GnRH sur la glande pituitaire (124) et qu'il augmente également la quantité de GnRH disponible en inhibant sa métabolisation (125). Le phénomène de rétrocontrôle positif des œstrogènes sur la sécrétion des gonadotrophines est actuellement expliqué via des rétrocontrôles impliquant les kisspeptines.

Les peptides kiss ou kisspeptines sont un groupe d'hormones peptidiques encodées par le gène *KISS1* qui sont sécrétées par certaines populations neuronales. Il existe différentes isoformes de ces peptides kiss qui sont toutes capables d'activer le récepteur aux kisspeptines (aussi connu comme le récepteur GPR54 (126, 127). L'activation de ce récepteur résulte en la sécrétion de GnRH qui à son tour stimule la sécrétion de la LH et de la FSH par la glande pituitaire. Les neurones exprimant les kisspeptines sont régulés par les hormones stéroïdes. Le feedback positif des œstrogènes serait réalisé via l'isoforme α du récepteur aux œstrogènes qui est exprimé par les neurones kisspeptines et pas par les neurones à la GnRH (128). Outre le récepteur α , ces neurones expriment des récepteurs à la progestérone et des récepteurs aux androgènes. Par contre, ils n'expriment pas le récepteur β aux œstrogènes (129). Des populations neuronales importantes pour la reproduction exprimant le gène *KISS1* ont été identifiées dans deux régions de l'hypothalamus chez la souris, au niveau du noyau arqué et au niveau du noyau paraventriculaire ventral (AVPV) (130, 131). Les neurones exprimant des kisspeptines situés au niveau du noyau arqué agissent comme rétrocontrôle négatif pour la sécrétion de la GnRH suite à une augmentation de la concentration en œstrogènes (rétrocontrôle négatif classique) (132). A l'inverse, lorsque la concentration en œstrogènes atteint un certain pallier, les neurones exprimant les kisspeptines situés au niveau du noyau paraventriculaire ventral agissent comme rétrocontrôle positif (Figure 10) (133).

Des neurones sécrétant les kisspeptines sont également exprimés au niveau de l'amygdale, une structure limbique importante avec des projections inhibitrices vers le centre hypothalamique responsable de la sécrétion des gonadotrophines (134).

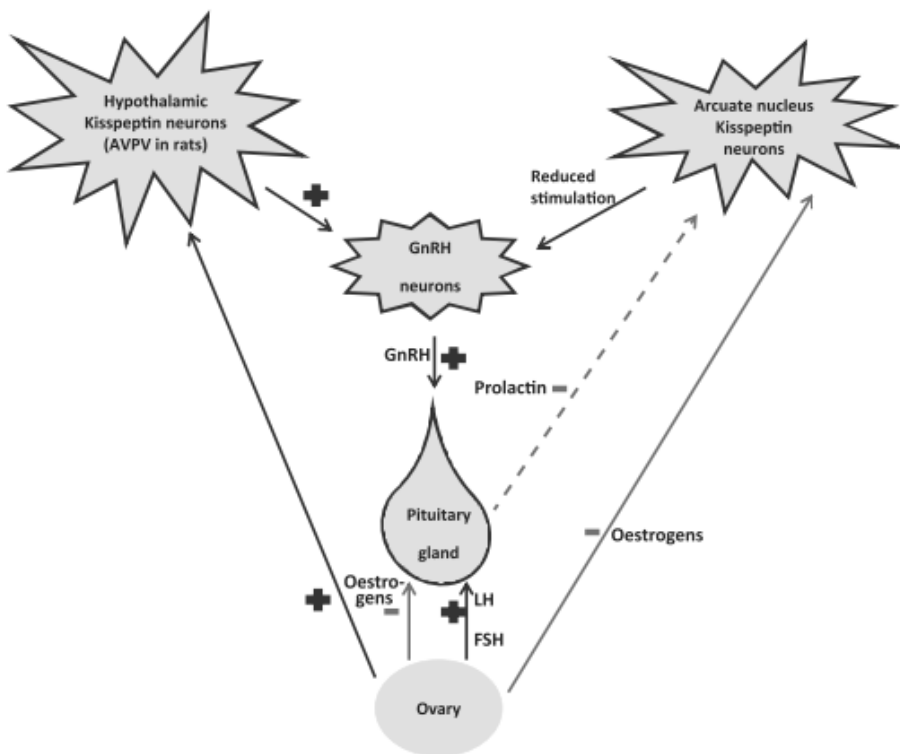


Figure 10 : contrôle de l'ovulation par les neurones kisspeptin

Figure extraite de l'article de Izz-Enbeaya et al, *Kisspeptin is providing new insights into the control of reproduction*, 2013 (135)

Le pic de LH et la montée de FSH déclenche la reprise de la méiose, l'ovulation et la lutéinisation (136). La montée de LH précède la rupture folliculaire de 36 heures. Juste avant cette rupture, une série de modifications a lieu dans les cellules de la granulosa et l'ovocyte, incluant la suppression de gènes de transcription contrôlant la prolifération des cellules de la granulosa, la perte des jonctions Gap entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa et l'induction de gènes essentiels pour l'ovulation dans les cellules de la granulosa. Un stigmatte conique apparaît sur la surface du follicule saillant en préparation de la rupture du follicule. Cette rupture de stigmatte est accompagnée par une douce expulsion de l'ovocyte et du fluide folliculaire, suggérant que le fluide n'est pas sous haute pression (137, 138). Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer la rupture folliculaire. Notamment une augmentation de la pression osmotique dans la substance colloïdale, en partie due aux protéoglycans dérivés des cellules de la granulosa. Cependant, une relation cause-à-effet entre la composition modifiée du fluide folliculaire et l'élargissement et la rupture du follicule reste à établir. Une autre hypothèse serait que l'ovulation soit une réaction inflammatoire avec une réaction immunitaire qui permettrait la

libération de l'ovocyte par le relargage de protéases par des leucocytes recrutés pour déclencher la rupture du follicule (139).

Une action précoce de la LH lors de l'ovulation est l'induction de récepteurs de la progestérone sur les cellules de la granulosa. Il a été démontré l'importance de l'expression de ces récepteurs lors de l'ovulation via l'utilisation d'antagonistes de la progestérone et de délétions partielles du gène de son récepteur chez la souris (140). Le pic de LH stimule également la biosynthèse de prostaglandines par les follicules via l'induction de l'enzyme cyclo oxygénase 2 (COX-2) dans les cellules de la granulosa.

Après l'ovulation, le follicule rompu se réorganise pour former le corpus luteum, aussi appelé corps jaune. Une des grandes caractéristiques de cette réorganisation est l'établissement d'un grand réseau vasculaire nécessaire à la production de la progestérone par le corps jaune pour le bon déroulement de la grossesse.

A travers les processus de folliculogenèse, d'ovogenèse et d'ovulation, la maturation de l'ovocyte inclut une séquence complexe de modifications nucléaires et cytoplasmiques qui prépare l'ovocyte à la fécondation et à l'initiation du développement embryonnaire. Durant toute leur maturation, les ovocytes grandissent et se développent en coordination étroite et de manière dépendante avec les cellules du cumulus qui les entourent.

1.5.5 La qualité ovocytaire

Un ovocyte compétent est un ovocyte capable de réaliser une maturation correcte, d'être fécondé, de réaliser une bonne implantation et finalement de donner naissance à un enfant en bonne santé.

Un ovocyte de mauvaise qualité est caractérisé par une série d'anomalies morphologiques, même si, à ce jour, il n'y a pas de quantification précise de l'importance relative de chaque anomalie par rapport aux autres. Il n'y a toujours pas de consensus sur une description morphologique précise permettant l'optimisation du choix des ovocytes normaux pour réaliser les fécondations en FIV ou pour la cryopréservation ovocytaire (141, 142).

Les critères généralement utilisés pour déterminer le grade de qualité morphologique de l'ovocyte incluent l'évaluation de la structure de l'ovocyte : le cumulus, le cytoplasme de l'ovocyte, le globule polaire, l'espace périvitellin, la zone pellucide et le fuseau mitotique (143). Un ovocyte décrit comme un ovocyte avec un grand potentiel de donner un embryon compétent est décrit avec différentes caractéristiques (144):

- L'ovocyte est entouré par un cumulus compact (au moins 5 couches de cellules).

- Le cytoplasme est quasi transparent et homogène ou un anneau noir peut être observé autour du cytoplasme. Il n'est pas granuleux.
- Il n'y a pas d'anomalies extracytoplasmiques (comme une zone pellucide noirâtre, des granulosités, des vacuoles ou des fragments cytoplasmiques).
- L'espace périvitellin n'est pas trop large et sans granulosité.
- Des ovocytes montrant un fuseau mitotique biréfringent auraient un meilleur potentiel de développement après la fécondation que des ovocytes avec des fuseaux ne montrant pas cette biréfringence.

La morphologie du premier globule polaire expulsé après l'ovulation peut également être étudiée pour déterminer la qualité ovocytaire. Des critères ont été établis tels que la forme, la taille, la surface et l'intégrité du cytoplasme de ce globule polaire même si l'utilité de cette étude morphologique est controversée (145, 146).

Différents biomarqueurs retrouvés dans les FF ont été proposés comme biomarqueurs de la capacité de l'ovocyte à être fécondé ou à donner des embryons de bonne qualité à J2 ou J3, tels que la lactoferrin (147), la leptine (148), l'hormone anti-Mullérienne (149), l'IGF-2, l'IGFBP-3, l'IGFBP-4 (150). Un haut taux de ghrélin serait le reflet d'une mauvaise qualité ovocytaire (151).

Un autre marqueur mesurable dans les FF a été proposé par notre équipe pour sélectionner un embryon avec un haut potentiel d'implantation : le granulocyte colony stimulation factor (G-CSF) (6). Les caractéristiques de ce biomarqueur seront expliquées en introduction de l'article sur le G-CSF.

1.5.6 Influence de l'ovocyte sur le développement embryonnaire

Les premiers jours du développement embryonnaire sont caractérisés par une série de divisions de l'ovocyte fécondé en des cellules de plus en plus petites. Les premières divisions mitotiques sont liées à une simple duplication de l'ADN zygotique sans synthèse des protéines et organites cytoplasmiques hérités de l'ovocyte. Les premières cytokinèses sont donc une simple répartition des mitochondries, du reticulum endoplasmique, des appareils de Golgi et du cytoplasme provenant de l'ovocyte. Un ovocyte immature peut donc être fécondé mais l'insuffisance d'organites et de composants cytoplasmiques à répartir entre les cellules-filles peut rapidement devenir limitant. Ceci pourrait expliquer la disparition précoce de nombreux embryons. La taille de l'embryon ne varie donc pas jusqu'à sa transformation en blastocyste au 5^{ème} jour de développement, il est encapsulé dans la zone pellucide. L'embryon pré-implantatoire est capable de réaliser une forme de développement autonome approvisionné par les éléments fournis par l'ovocyte et ensuite par les produits provenant de l'activation de son génome (152). Au début de sa vie, juste après la fécondation, le programme de développement de l'embryon est initialement

dirigé par les protéines et transcrits maternels. Les cellules embryonnaires sont totipotentes. Cette totipotence est acquise lors de la reconfiguration de l'état épigénétique de l'ADN des cellules germinales (autrement dit, du spermatozoïde et de l'ovocyte) et puis par l'activation du génome de l'embryon et de ses propres arrangements épigénétiques. Cette activation influence l'expression génétique qui permet la transformation de ces cellules totipotentes en deux types cellulaires spécifiques pour la survie de l'embryon : les cellules trophoblastiques et la masse cellulaire interne. Les modifications épigénétiques permettent aux transformations spatiotemporelles de l'embryon de se réaliser suivant une séquence correcte (153). L'étape suivante est le remplacement progressif des transcrits maternels conservés dans le cytoplasme par les nouveaux transcrits spécifiques de l'embryon (154). Un grand nombre de mécanismes épigénétiques interviennent à chaque étape du développement pour permettre une identité spécifique de chaque type cellulaire. Ces mécanismes épigénétiques peuvent changer en fonction des conditions environnementales et temporelles du développement embryonnaire (153). La culture embryonnaire *in vitro* ainsi que la cryopréservation embryonnaire altèrent les profils épigénétiques des embryons et peuvent donc influencer négativement l'embryon, son développement à long terme et éventuellement sa descendance (155, 156).

Concernant l'embryon, l'organisation et l'introduction de différentes marques épigénétiques sont réalisées durant le développement et sont essentielles pour l'évolution du nouvel organisme. Ces marques épigénétiques, la méthylation de l'ADN et les modifications des histones et du RNA non codés, ont des rôles critiques dans la mémoire cellulaire du développement. Durant la gamétogenèse, le spermatozoïde et l'ovocyte sont produits avec une chromatine organisée différemment, résultant d'une reprogrammation épigénétique des cellules originelles (157).

1.6 Développement embryonnaire précoce

1.6.1 La fécondation

La rencontre entre le spermatozoïde et l'ovocyte est une des étapes essentielles de la reproduction. Elle nécessite un ovocyte et un spermatozoïde tous deux compétents. Elle se déroule généralement au tiers moyen supérieur de la trompe de Fallope. Lors de la fécondation, le spermatozoïde entre en contact avec la zone pellucide entourant l'ovocyte, cette zone pellucide sert de barrière empêchant la polyspermie. La première division a lieu très rapidement (durant les 24 premières heures) et se déroule toujours dans la trompe. L'embryon n'atteint l'utérus que durant le 5^{ème} jour de son développement (Figure 11). Il reste entouré des cellules de la corona radiata jusqu'au stade blastocyste.

1.6.2 Les premières divisions cellulaires

Les facteurs maternels précoces jouent un rôle primordial durant le début du développement embryonnaire. L'ovocyte supporte les premières divisions du zygote et fournit le matériel protéique et transcriptionnel nécessaire jusqu'au stade 4-8 cellules. Il apporte la grande majorité du cytoplasme et des composants nucléaires de l'embryon. Les cellules embryonnaires, aussi appelées blastomères, sont flexibles et totipotentes, autrement dit, elles sont capables en se développant et en se multipliant de donner tous les types cellulaires du corps humain (158). Il est possible au tout début du développement embryonnaire, au stade 4 cellules, de scinder les embryons et chaque blastomère individualisé est capable de donner un blastocyste *in vitro* (Van de Velde et al. 2008).

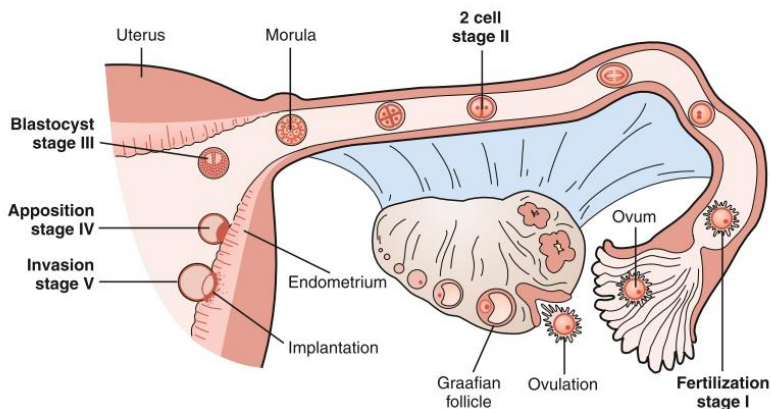


Figure 11 : les premières divisions embryonnaires

Figure extraite du livre de Strauss and Lessey, *The ovarian life cycle*, 2009

1.6.3 Le blastocyste

Au stade blastocyste, l'embryon sort de la zone pellucide qui l'entoure et ses cellules s'organisent, pour la première fois, en deux types cellulaires différenciés, le premier, appelé trophoblaste, qui forme une couche unicellulaire et forme le pourtour du blastocyste, le second type forme la masse cellulaire interne, cellules qui donnent le futur fœtus (Figure 12). Le trophoblaste est à l'origine du chorion qui forme le placenta et la séparation entre l'embryon et les cellules maternelles. Le sang maternel et le sang fœtal ne sont jamais en contact au cours de la grossesse. Les cellules maternelles sont uniquement en contact avec le chorion permettant ainsi une plus grande tolérance de l'allogreffe fœtale. Contrairement à ce qui a toujours été pensé, les cellules du trophoblaste pourraient être capables de se retransformer en cellules de la masse cellulaire interne (160). Ces résultats sont intéressants pour la recherche sur les cellules souches parce que les cellules trophoblastiques ont plus de capacité de développement que ce qui était pensé précédemment.

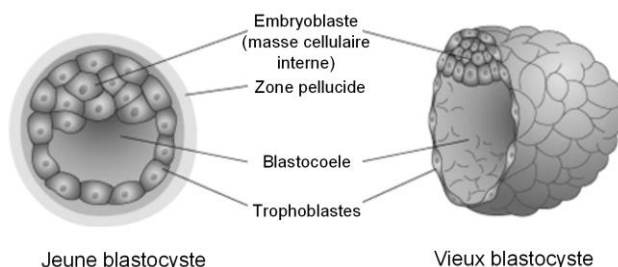


Figure 12 : le blastocyste est composé d'une masse cellulaire interne et d'une couche de cellules trophoblastiques extérieures

Figure extraite du livre de Moore & Persaud : *The Developing Human 7^{ème} édition*

Les cellules du cytotrophoblaste expriment exclusivement des molécules Leukocyte Antigen Type G (HLA-G) qui sont des molécules du complexe majeur d'immunohistocompatibilité de type I non classiques. Cette expression d'HLA-G facilite la tolérance du conceptus (161, 162).

Le trophoblaste émet lors de ses premiers jours de développement une hormone importante : l'hormone chorionique gonadotrope (hCG). Celle-ci a de multiples fonctions qui conditionnent la survie de l'embryon dont la plus connue est le maintien de la sécrétion de la progestérone par le corps jaune (163).

1.6.4 La sélection embryonnaire en FIV

1.6.4.1 Critères morphologiques

En fécondation *in vitro*, les biologistes (aussi appelés embryologistes) observent les embryons durant leur développement ainsi que juste avant le transfert *in utero* pour déterminer quels embryons ont le plus de chance de s'implanter et de mener à la naissance d'un enfant.

La sélection se fait donc généralement sur la base d'une observation morphologique de la cohorte des embryons au jour 2 ou 3. Actuellement, dans certains cas, les embryons restent *in vitro* pour leur développement jusqu'au stade blastocyste (jour 5) afin d'améliorer la sélection des embryons à transférer. Une revue de 2012 apporte des preuves indiquant qu'il existe une petite différence significative en termes de taux de naissances vivantes en faveur du transfert de blastocystes (du 5ème au 6ème jour) comparé au transfert au stade du clivage (du 2ème au 3ème jour) (164), mais la culture d'embryons jusqu'au stade blastocyste expose au risque de ne pas obtenir de blastocyste à transférer (165).

Les embryons sont évalués au microscope selon 5 critères au troisième jour de leur développement qui ont été utilisés par Holte et al., dans une étude prospective de 2266 cycles de FIV/ICSI (166):

- 1) Le **nombre** de blastomères : De nombreuses études ont montré un lien direct entre le nombre de cellules (jusqu'à 8 cellules) au jour 3 et le taux d'implantation (167). Le nombre de cellules est généralement considéré comme l'indicateur le plus important pour la viabilité de l'embryon. Ce nombre a également été mis en lien avec le potentiel de développement des embryons en blastocystes (168).

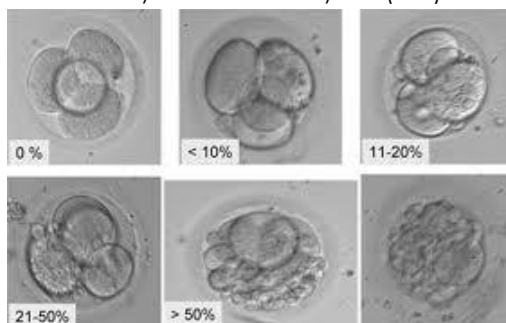


Figure 13 : fragmentation des membranes cellulaires des embryons

Figure extraite du site internet <http://www.inviafertility.com>

- 2) La **fragmentation** des membranes cellulaires : un fragment est défini comme une structure cytoplasmique extracellulaire anucléée liée à la membrane (Figure 16) (169). La présence de fragments a été trouvée comme liée à des anomalies de métabolisme cellulaire ou de division, signes d'apoptose (170–172), ou à des anomalies de ségrégation des chromosomes (173). Des données récentes suggèrent que cette fragmentation résulterait d'anomalies dans la membrane des ovocytes (174). Il y a différents systèmes utilisés pour grader la fragmentation des embryons. La méthode la plus facile et la plus utilisée décrit le pourcentage du volume de l'embryon occupé par des fragments (généralement score 0 = 0%, score 1 = <10%, score 2 = 10-25%, score 3 > 25%), plus le score est élevé, moins l'embryon aurait de chance de s'implanter (169, 175).
- 3) La **régularité de la taille** des différentes cellules (aussi appelée symétrie) : les cellules peuvent être asynchrones lorsqu'il y a des anomalies lors des divisions cellulaires ou si les organites sont mal distribués entre deux cellules sœurs (176). En comparaison avec le nombre de cellules ou à la fragmentation, peu d'études ont été réalisées sur la corrélation entre le taux d'implantation et la symétrie des blastomères. Malgré tout, les embryons avec une asymétrie importante ont un taux d'implantation moins important (177, 178).
- 4) L'**apparence** du cytoplasme : la granulation du cytoplasme, la présence ou non de vacuoles.
- 5) La **multinucléation** des blastomères : la présence de plus d'un noyau par blastomère est considérée comme anormale. Des études ont montré une association entre la multinucléation et une diminution du taux d'implantation/taux de grossesse (179, 180). Cette association a été liée à une augmentation du nombre d'aberrations chromosomiques (181).

Ces critères ont été retenus par l'European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) pour classer les embryons selon leur qualité morphologique (182).

La disposition des cellules au stade 4 cellules n'a pas d'importance pour la réussite d'un traitement FIV. En effet, les embryons ayant 4 cellules mises en tétraèdre n'ont pas plus de chance de donner une grossesse que les embryons dont les cellules ne forment pas un tétraèdre (183).

Les embryons considérés comme les meilleurs sont ceux qui, au troisième jour de développement, ont plus de 6 cellules, une fragmentation inférieure à 10% de leur taille totale, un cytoplasme homogène et clair, des tailles de blastomères similaires et un seul noyau par cellule. L'utilisation de l'observation du premier

clivage cellulaire 25 heures après la fécondation pour déterminer la qualité embryonnaire est un sujet de controverse actuellement (184, 185).

A titre d'exemple, le tableau ci-dessous illustre la classification morphologique des embryons réalisée au CPMA de Liège lors du troisième jour de développement (Figure 17), il se base sur les critères suivants :

- le **nombre** de cellules (plus de 6 cellules à jour 3 ou non) ;
- leur **fragmentation** (0 = pas de fragmentation, f1 = 1-10%, F1 = 10-30%, F2 = 30-50%, F3 plus de 50%) ;
- la régularité de **taille** de leur cellules (0 = pas de différence de taille, B1 = différence de taille inférieure à un facteur 2, B2 = différence de taille entre un facteur 2 et 3, B3 = différence de taille supérieure à un facteur 3) ;
- l'**aspect** du cytoplasme (0 = clair et homogène, C1 = 1 anomalie de vacuole, d'inclusion, de granulation ou de coloration, C2 = 2 anomalies, C3 = 3 anomalies combinées).

A = Excellent	B = Intermédiaire	C = Pauvre	D = Détruit
> 6 cellules	> 6 cellules	Tous les autres	<6 cellules
E (score de 0 pour F, B et C)	F1B1	embryons qui n'ont pas été détruits	Absence de division dans les 24heures
f1	F1C1		>2PN
F1	B1C1		F2 et plus
B1	F2		B3 si il y a seulement un grande cellule dominante
C1	B2		
f1B1	C2		
f1C1			
début de la compaction			

Figure 14 : classification morphologique des embryons à jour 3 selon les critères du CPMA

Figure traduite de l'article écrit par Lédée et al, Impact of follicular G-CSF quantification on subsequent embryo transfer decisions: a proof of concept study, 2013 (186)

L'observation morphologique est utile pour la prédiction de l'implantation des embryons et continue de s'améliorer à travers le développement de techniques non invasives. Actuellement, l'utilisation d'une technique d'observation des embryons en temps réel, appelée time-lapse, est de plus en plus utilisée par des centres réalisant de la FIV. (187, 188). Les images des embryons sont prises directement dans les incubateurs, ce qui évite de devoir sortir les embryons des incubateurs pour réaliser leur évaluation morphologique et donc stabilise les conditions de culture des embryons. Le système permet de déterminer précisément à quels moments les clivages des cellules ont lieu, tout en observant la morphologie des embryons (189). En 2011, Meseguer et al., ont publié un rapport sur le développement d'un modèle multivarié dans lequel, à travers un arbre décisionnel, les embryons sont classés selon leur probabilité d'implantation (187). Ils présentent un algorithme qui permettrait d'exclure les embryons qui ont

une bonne morphologie mais une cinétique de division aberrante. Malgré cela, la morphologie des embryons ne discrimine pas d'une manière suffisante la potentialité des embryons à mener une grossesse à terme (190, 191).

1.6.4.2 Approche fonctionnelle

De nombreux travaux se basent sur une approche plus fonctionnelle pour déterminer la viabilité de l'embryon et ses chances de donner un enfant vivant en bonne santé. L'embryon peut être étudié au niveau de son métabolisme (métabolomique), de ses ARN messagers transcrits à partir de son ADN (transcriptomique) et des protéines issues de ces ARN (protéomique) (192). Ces études sont non invasives puisqu'elles étudient le surnageant de culture des embryons.

La **protéomique** part du principe qu'un embryon sécrète des protéines selon un profil d'expression de certains gènes et ce profil serait le reflet de l'embryon en devenir. Ces protéines sont susceptibles d'influencer le développement de l'embryon et de lui permettre d'évoluer en un blastocyste fonctionnel. Katze-Jaffe et son équipe ont mené différentes études et ont montré l'expression de protéines différentes au cours du développement de l'embryon ; des profils de sécrétions ont pu être associés à la capacité de l'embryon d'atteindre le stade blastocyste. Une protéine en particulier, l'ubiquitine, s'est révélée être un marqueur corrélé au développement embryonnaire (193).

La **métabolomique** s'intéresse au métabolisme global de l'embryon en lien avec son développement et sa viabilité. Certaines approches sont plus précises et observent plus particulièrement le métabolisme énergétique, la consommation en acides aminés, en glucose ou la consommation en oxygène de l'embryon (194–196).

1.7 Implantation embryonnaire et dialogue materno-fœtal

L'être humain présente une grande proportion de fausses couches ou d'avortements spontanés (taux d'échecs de 17%) ainsi que de grossesses biochimiques (taux d'échecs de 25%). Autrement dit, le taux d'échecs de grossesses spontanées chez l'être humain est de 42% (17% + 25%) (197, 198). Par comparaison, les primates simiens ne présentent que 8% d'échecs de grossesse (199). Il a été montré que la plupart des grossesses biochimiques et les fausses couches spontanées, approximativement deux tiers, sont dues à une implantation incomplète de l'embryon (200, 201).

Le succès de l'implantation embryonnaire n'est pas uniquement une préparation hormonale adéquate de l'endomètre mais nécessite une interaction étroite, synchronisée et réciproque entre les différentes cellules de l'endomètre et l'embryon. C'est ce qui est appelé dialogue materno-fœtal durant la phase d'implantation. Ce dialogue s'établit grâce à de nombreuses cytokines, facteurs de croissance, chimiokines, récepteurs et molécules d'adhésion produits et sécrétés par l'endomètre et par l'embryon (202).

1.7.1 Les étapes de l'implantation : apposition-adhésion-invasion

L'éclosion embryonnaire permet un contact direct avec les cellules épithéliales de l'endomètre. Ce contact, appelé phase d'**apposition**, se fait d'une manière orientée, c'est-à-dire que la masse cellulaire interne du blastocyste est la plus proche possible de la muqueuse utérine. Durant cette phase, de véritables contacts dynamiques ont lieu entre le blastocyste et l'endomètre via des molécules d'adhésion et des récepteurs. Par exemple, l'IL-1 sécrété par le blastocyste augmente l'expression d'intégrines à la surface de l'endomètre lui permettant d'interagir avec l'embryon. Un autre exemple est le rôle de la mucine MUC-1. L'épithélium est recouvert sur toute sa surface épithéliale de glycocalyx, expliquant en partie sa nature non adhésive. Au niveau du site d'implantation, une diminution de l'expression des mucines (principalement de MUC-1) à la surface des cellules épithéliales endométriales est observée et serait impliquée dans le positionnement du blastocyste. Apparemment, ce serait le blastocyste lui-même qui régulerait l'expression de MUC-1 (203). Enfin, des études ont montré l'expression de sélectines à la surface du blastocyste ainsi que celles de sélectines complémentaires à la surface de l'épithélium endométrial durant la phase réceptive (204).

Après la phase d'apposition vient la phase d'**adhésion**, durant laquelle l'embryon et l'endomètre ont des contacts plus précis via des molécules d'adhésion (et principalement des intégrines). Le trophoblaste se sépare en deux types cellulaires distincts : le syncytiotrophoblaste et le cytotrophoblaste. Le

syncytiotrophoblaste forme la couche extérieure des futures annexes embryonnaires qui est en contact avec les cellules épithéliales de l'endomètre et la lumière de la cavité utérine. Il provient de la fusion de cellules du cytotrophoblaste mononucléées. Le cytotrophoblaste forme une couche interne qui est en contact avec la masse cellulaire interne et le blastocœle. Le syncytiotrophoblaste sécrète des enzymes lytiques et des facteurs déclenchant l'apoptose des cellules épithéliales de l'endomètre pour permettre l'invasion de l'embryon au sein de l'endomètre qui correspond à la dernière phase de l'implantation.

L'**invasion** du blastocyste dans l'endomètre commence par la liaison des cellules du syncytiotrophoblaste aux constituants de la membrane basale et de la matrice extracellulaire de l'endomètre via les intégrines (Figure 18). Le trophoblaste envahit ensuite le stroma conjonctif sous-épithélial suite à une décomposition des composants de la membrane basale et de la matrice extracellulaire, décomposition liée à l'activation de métalloprotéases. L'endomètre joue donc un rôle important par l'expression de protéines d'ancrage et par sa modification en décidue lors de l'implantation. La placentation débute après l'enfouissement total de l'embryon au sein de l'endomètre et le placenta se forme suite à l'apparition de villosités dans le trophoblaste.

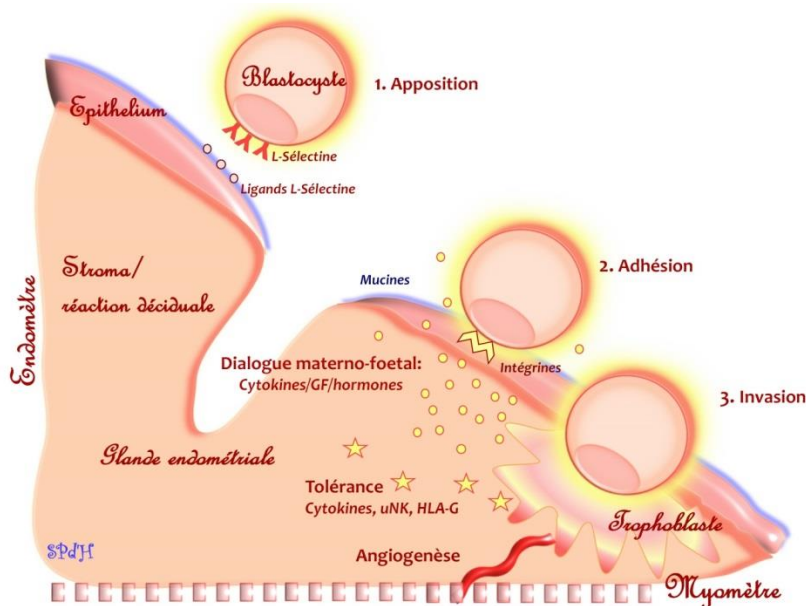


Figure 15 : les étapes de l'implantation : apposition, adhésion et invasion.

Figure extraite du Cours de Biologie de la Reproduction 2009-2010, Pr S. Perrier d'Hauterive

L'implantation humaine est unique pour plusieurs raisons. La première est que les transformations de l'endomètre menant à une réceptivité maximale sont indépendantes de l'embryon, contrairement à la plupart des modèles animaux (rongeurs inclus) (205). La seconde caractéristique de l'implantation humaine est la profondeur de l'invasion trophoblastique. Le type de placentation est défini en fonction du degré de pénétration du trophoblaste dans le stroma. Dans l'espèce humaine, la placentation est de type hémochoriale. Elle est caractérisée par un degré maximal de pénétration avec une érosion de l'épithélium vasculaire. Les cellules trophoblastiques pénètrent dans les artères spiralées utérines et sont en contact direct avec les hématies maternelles. Le même type de placentation est retrouvé chez la souris qui est donc logiquement utilisée comme modèle d'implantation. Cependant, l'implantation embryonnaire humaine diffère de l'implantation murine au niveau du mécanisme d'invasion proprement dit et de certains mécanismes moléculaires (206). En effet, chez l'homme, le syncytiotrophoblaste agit par intrusion, c'est-à-dire qu'il s'insinue d'abord entre les cellules épithéliales avant de les éliminer par phagocytose. Chez la souris, des prolongements cytoplasmiques du trophoblaste facilitent le décollement des cellules épithéliales, ce qui provoque leur apoptose précédant leur phagocytose (207). L'utilisation d'un modèle murin pour l'étude de l'implantation humaine est un vaste débat, même s'il reste souvent la variante la plus facile d'accès et d'utilisation (208).

1.7.2 Molécules et cellules importantes dans le dialogue materno-fœtal

A côté des molécules d'adhésion qui représentent la « partie visible » du dialogue existant entre le blastocyste et l'épithélium endométrial, toute une série de molécules et de cellules sont impliquées dans la régulation de l'implantation. Ces molécules définissent un environnement local qui influence les cellules endométriales et immunitaires et donc aussi le devenir du trophoblaste. Ainsi, un équilibre précis, complexe et évolutif de cytokines, chémokines et facteurs de croissance assure la régulation de la réceptivité utérine. Dans ce travail, différentes molécules importantes présentes à l'interface materno-fœtale sont présentées mais cette présentation n'est en aucun cas une liste exhaustive des molécules impliquées. L'hCG, étant une molécule importante pour l'implantation embryonnaire et un des deux sujets de recherche présentés dans ce travail, a un chapitre qui lui est consacré plus en profondeur.

1.7.2.1 Les cytokines

Les cytokines sont des petites protéines pléiotropiques solubles agissant seules ou de concert pour réguler différentes fonctions cellulaires comme la prolifération ou la différenciation.

Parmi les cytokines nécessaires à l'établissement d'une grossesse, beaucoup se retrouvent dans le paradigme Th1/Th2. Les lymphocytes Th (T helper) sont des régulateurs centraux des réponses immunitaires. Ils sont divisés en deux catégories :

- Les **Th1** qui promeuvent l'immunité cellulaire et sécrètent majoritairement de l'IFN- γ (interféron gamma) et l'IL-2 qui sont donc dites cytokines de type Th1 ;

- Les **Th2** qui stimulent l'immunitaire humorale et sécrètent des cytokines dites Th2 comme l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6 et l'IL-10. L'**IL-10** est une cytokine pouvant exercer chez l'humain deux activités antagonistes : l'immunostimulation ou l'immunosuppression. Elle est produite par le trophoblaste et le tissu décidual. Son rôle clé est de réguler l'équilibre pro- et anti-inflammatoire nécessaire au bon déroulement de la grossesse (209).

Durant longtemps, le paradigme Th1/Th2 a été utilisé pour expliquer les échecs d'implantation embryonnaire pour raisons immunologiques en disant que la grossesse était un phénomène Th2 où la réponse Th1 était inhibée pour éviter une attaque de l'embryon par le système immunitaire maternel. Chez l'humain, un excès de cytokines Th1 est retrouvé chez les patientes à fausses couches à répétition (210). Cependant l'inflammation n'est pas forcément délétère pour la grossesse. Au contraire, un état inflammatoire transitoire est observé et semble nécessaire en tout début de grossesse. En outre, un excès de cytokines Th2 comme l'IL-6 semble délétère pour l'établissement d'une grossesse (3). Actuellement, le paradigme Th1/Th2 est considéré comme incomplet (211). Les cellules Treg et Th17 ont été ajoutées au duo Th1/Th2 pour expliquer la réaction immunitaire maternelle dirigée contre l'embryon (210).

D'autres cytokines ont été montrées comme importantes lors de l'implantation embryonnaire :

- **Leukemia inhibitory factor (LIF)** : le rôle du LIF a été découvert lors de l'étude des souris *Lif*^{-/-}. En effet, il a été montré que des souris femelles KO pour le gène *Lif* étaient fertiles mais que leurs embryons étaient incapables de s'implanter dans l'endomètre. En outre, une perfusion intrapéritonéale du LIF restaurait l'implantation (18). C'est une cytokine pro-inflammatoire de la famille de l'IL-6. LIF est nécessaire pour l'expression de la cyclo oxygénase 2 (COX-2) et le facteur de croissance Heparin-binding EGF like (HB-EGF) dans l'utérus. LIF prépare donc l'endomètre à être réceptif et il est exprimé à proximité du blastocyste au moment de son adhésion aux cellules épithéliales. Il agit également comme promoteur de l'expression de HLA-G par les cellules du cytotrophoblaste (212). Malheureusement, les tentatives d'utilisation du LIF, soit en tant que marqueur de réceptivité utérine, soit en tant que principe thérapeutique, ont échoué. Une des raisons possibles est qu'il existe chez l'homme 3 transcrits différents : Le LIF membranaire, le LIF diffusible et le LIF tronqué. Chaque transcrit a une fonction et

une activité distincte indissociable sur le plan clinique, orchestrée, spécifique et difficilement modélisable (213).

- **Interleukine 11** (IL-11) : IL-11 serait impliqué dans la décidualisation et dans la placentation. Les souris *Il11^{-/-}* ont une décidualisation anormale menant à un échec d'implantation. L'IL-11 et son récepteur sont retrouvés au niveau de l'endomètre humain et l'expression d'IL-11 varie au cours du cycle menstruel. La connaissance du rôle d'IL-11 dans l'implantation reste limitée (213).

- **Interleukine 1** (IL-1) : la famille de l'IL-1 comprend différentes cytokines clés pour l'inflammation et la réponse immunitaire. Le rôle d'IL-1 dans l'implantation a été mis en évidence chez la souris. Même si les souris *Il1^{-/-}* sont fertiles, lorsque des antagonistes du récepteur d'IL-1, l'implantation est empêchée (214).

- **Interleukines 15 et 18** (IL-15 e IL-18) : ce sont deux cytokines impliquées dans la régulation, le recrutement et l'activation des cellules uNK, cellules importantes pour le remodelage vasculaire endométrial. Leur expression est corrélée (215). Une expression anormale d'IL-15 (excès ou déplétion) est observée chez les patientes présentant des échecs d'implantation en FIV.

1.7.2.2 Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des molécules sécrétées capables d'induire la prolifération et la différenciation cellulaire. Ils sont importants pour l'implantation.

- **Le Vascular Endothelial Growth Factor** ou VEGF : c'est un facteur de croissance stimulant l'angiogenèse et la vasculogenèse. En tant que facteur angiogénique principal, il est capital pour la placentation hémochoriale. Au niveau de l'endomètre, il régule la vascularisation, la perméabilité vasculaire et participe à l'établissement de la réceptivité endométriale (216).

- **Le Transforming Growth Factor Beta** ou TGF- β : il s'agit d'un facteur de croissance existant sous 3 isoformes. Elles se retrouvent toutes les 3 dans l'endomètre et au niveau de l'interface materno-fœtale en début de grossesse. Elles sont importantes pour l'implantation. Elles interviennent dans la régulation de molécules clés comme le VEGF et le LIF. De plus, elles favorisent l'adhésion du trophoblaste à la matrice extracellulaire de l'endomètre (217).

- **La famille des Colony Stimulating Factor** ou CSF : il existe 3 types de CSF qui ont tous les 3 un rôle dans la médecine de la reproduction. Le « Macrophages Colony Stimulating Factor » (M-CSF ou CSF-1) est un facteur de croissance majeur pour le trophoblaste. Les souris KO pour le CSF-1 sont stériles. Au niveau de l'endomètre, il régule le recrutement des macrophages et leur état d'activation, agissant comme un immunomodulateur (218). Le « Granulocytes-Macrophages Colony Stimulating Factor » (GM-CSF ou CSF-2) est exprimé au niveau de l'endomètre humain et son expression est maximale durant la fenêtre implantatoire. Il agit sur les leucocytes endométriaux, influence l'état immunitaire maternel et le

remodelage tissulaire lors de la décidualisation des cellules. Il influence également la différenciation des cellules trophoblastiques et le développement de l'embryon. L'adjonction de CSF-2 dans le milieu de culture des embryons en FIV augmente le pourcentage de blastulation en modèles murins et humains (219). Le GM-CSF augmente également le nombre de grossesse clinique et le taux d'implantation chez des patientes ayant déjà réalisé plusieurs tentatives de traitement FIV (220, 221). Le troisième type est appelé « Granulocytes Colony Stimulating Factor » (CSF-3 ou G-CSF). Son rôle dans la reproduction sera détaillé en introduction de l'article dont il fait l'objet.

1.7.2.3 Les chémokines

Les chémokines sont des protéines solubles dont la principale fonction est d'activer le chimiotactisme des cellules immunitaires. Au niveau de l'endomètre, elles jouent un rôle important car il existe un réseau complexe de chémokines permettant le recrutement et l'activation des leucocytes spécifiques de l'implantation.

1.7.2.4 Les cellules immunitaires

Certains sites du corps sont capables de tolérer l'introduction d'un antigène sans déclencher un processus inflammatoire. Les tissus greffés sont généralement reconnus par l'hôte et attaqués par le système immunitaire. Cependant, dans ces sites immunoprivilégiés, les greffes peuvent survivre durant une période étendue sans être rejetées. Le cerveau, les yeux, l'interface materno-fœtale et les testicules sont des exemples bien connus (222). Ces sites expriment une série de molécules/conditions en communs : barrière physique, expression de Fas-Ligand, TGF- β , neuropeptide, inhibiteurs des activateurs du complément et faible expression des molécules du système majeur d'histocompatibilité (MHC) de type Ia. Dans le cas des cellules trophoblastiques, elles ne vont exprimer ni HLA-A, ni HLA-B ; elles n'expriment que le HLG-G qui est un antigène présentant très peu de variation interindividuelle. Grâce à la présence de ces différents paramètres au niveau de l'endomètre lors de la fenêtre implantatoire, l'embryon est capable de s'implanter et d'envahir le stroma maternel. Le profil des cellules immunitaires endométriales est modifié au moment de l'implantation et ce sont alors majoritairement des cellules de l'immunité innées qui sont retrouvées : uNK (60-70%), macrophages (10-20%), Treg (<20%) et cellules dendritiques (>2%) contrairement à la phase proliférative durant laquelle sont retrouvées essentiellement des cellules de l'immunité adaptatives (qui ont pour fonction de défendre le tractus génital des infections) (223, 224).

Les **cellules NK** sont des cellules clés de l'immunité innée qui éliminent les cellules cancéreuses ou les cellules atteintes par un virus via leur sécrétion de molécules cytotoxiques. Les cellules NK utérines, appelée **uNK**, sont différentes des cellules NK sanguines. Elles sont moins cytotoxiques. Durant le cycle menstruel, le nombre de cellules uNK augmente durant la phase sécrétoire (225). En cas de grossesse,

le nombre de cellules uNK va fortement augmenter pour atteindre un pic à la fin du premier trimestre. Elles jouent un rôle important au niveau du remodelage vasculaire nécessaire à la placentation (226). Elles sécrètent également des facteurs proangiogènes telles que des membres de la famille du VEGF (227).

Les **macrophages** exercent principalement leur rôle de cellules de l'immunité innée de par leur action sur les microbes et sur les spermatozoïdes morts. Durant la phase proliférative, leur nombre augmente pour contribuer au remodelage vasculaire en début de grossesse. Leur rôle pendant la phase d'apposition et d'adhésion semble majeur car ils contribuent à l'apposition de deux épithéliums d'origine différente (228). Au niveau du placenta, des cellules ressemblant fort aux macrophages sont retrouvées à l'intérieur des villosités et sont appelées cellules de Hofbauer.

Les **cellules Treg** sont des lymphocytes immunosuppresseurs essentiels pour la tolérance immunitaire. Des Treg sont retrouvés au niveau de l'endomètre et dans la décidue en début de grossesse. Ils pourraient jouer un rôle dans la protection de l'allogreffe fœtale contre le système immunitaire maternel (229, 230). Leur rôle exact n'a pas encore été déterminé.

Les **cellules dendritiques** sont des cellules présentatrices d'antigènes hétérogènes. Des cellules dendritiques sont retrouvées dans l'endomètre durant le cycle menstruel et également durant la grossesse durant laquelle elles ont une capacité de stimulation limitée et sécrètent de l'IL-10. Elles coopèrent avec les cellules uNK notamment pour la décidualisation et pour la régulation de l'angiogenèse (223).

Les **cellules Th17** sont des cellules impliquées dans les maladies inflammatoires et auto-immunes via la sécrétion d'IL-17 (223). Elles ont été récemment intégrées au réseau complexe régulant l'implantation, notamment car un taux plus élevé de Th17 et d'IL-17 est retrouvé chez les patientes montrant des fausses couches à répétition (231).

1.7.3 L'hCG

L'hormone chorionique gonadotrope (hCG) est une hormone glycoprotéique de 36 à 40 kDa. Elle est composée de deux sous-unités, α et β liées par une liaison non covalente. La sous-unité α , composée de 92 acides aminés, est codée dans le chromosome 6 et est commune aux différentes hormones de la famille des glycoprotéines dont font partie la LH, la FSH et la TSH. La sous-unité β , qui est différente pour chaque hormone, est codée sur différents gènes situés sur le chromosome 19 (LH, hCG et TSH) ou sur le chromosome 11 (FSH). La sous-unité β de l'hCG est codée dans 6 gènes différents mais très similaires situés dans un groupe de gènes sur le chromosome 19 (232). La sous-unité β de l'hCG est la sous-unité β avec le plus grand nombre d'acides aminés, 145, mais également le plus grand domaine glycosylé. Cela confère à l'hCG une plus grande stabilité,

elle a donc une demi-vie supérieure à la LH, et cela facilite sa sécrétion rapide. A la différence des autres hormones glycoprotéiques qui sont synthétisées par le lobe antérieur de la glande pituitaire, l'hCG est principalement produite par le trophoblaste (et principalement par le syncytiotrophoblaste), mais également par des tumeurs malignes. L'hCG contient 4 oligosaccharides N-liés et 4 oligosaccharides O-liés (Figure 13).

L'hCG a une structure similaire à la LH, mais contrairement à elle, l'hCG existe sous plusieurs formes, connues comme l'hCG classique, l'hCG hyperglycosylée et l'unité β libre de l'hCG hyperglycosylée (233, 234). Chacune de ces 4 molécules ont des fonctions physiologiques différentes que nous détaillerons plus loin.

Il n'existe des gonadotrophines chorioniques que chez les primates (chez l'espèce humaine, il s'agit de l'hCG) et chez les équidés (chez la jument, il s'agit de l'eCG pour équine CG).

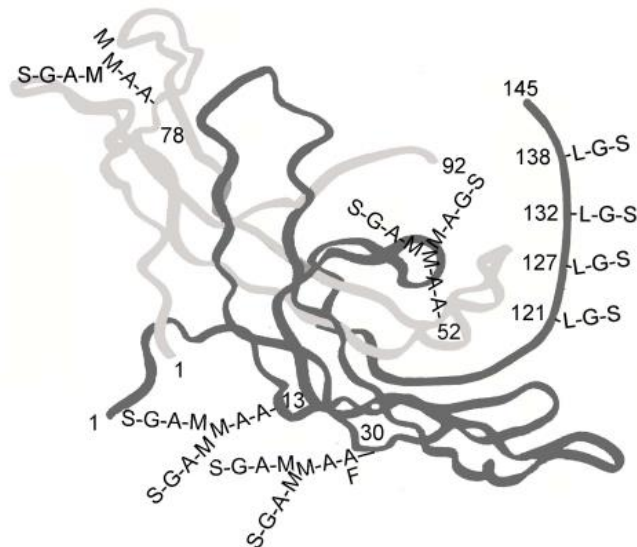


Figure 16 : structure tridimensionnelle de l'hCG classique

Figure extraite de l'article de Cole et al., *hCG, the wonder of today's science*, 2012 (199)

1.7.3.1 Sécrétion

L'hCG est une des premières molécules sécrétées par l'embryon. Son ARN est transcrit dès le stade 8 cellules (235) et le blastocyste produit la protéine avant son implantation (236, 237). Le syncytiotrophoblaste produit fortement cette hormone après l'implantation (238). Des concentrations significatives d'hCG peuvent déjà être mesurées dans le sang maternel 10 jours après l'ovulation. Le moment où la concentration de l'hCG atteint son paroxysme se situe aux environs de la 10^{ème} et de la 11^{ème} semaine de gestation, ensuite le niveau redescend à la 12^{ème} semaine pour rester basal jusqu'à la fin de la grossesse, mais à un taux toujours supérieur à celui de chez la femme non gestante (239).

Les macrophages réguleraient un excès d'hCG, connu pour avoir des effets tératogènes sur les tissus fœtaux. Les macrophages tissulaires fœtaux humains sont proposés pour incorporer et détruire l'hCG d'une manière chrono-dépendante qui protège la gonadogénèse fœtale des effets délétères de l'hCG (240, 241). Plus précisément, Katabuchi et son équipe ont montré récemment que l'hCG induirait la formation de vacuoles dans les monocytes humains qui ressemblent alors aux cellules de Hofbauer fœtales. Ils émettent l'hypothèse que les cellules de Hofbauer et plus particulièrement leurs vacuoles, seraient impliquées dans la protection des tissus fœtaux contre de trop grandes concentrations en hCG (242).

1.7.3.2 Actions

En 1920, Hirose a montré un lien hormonal entre une hormone produite par le placenta et la production de la progestérone par les cellules du corps jaune (233, 243). Cette hormone a été appelée hormone chorionique gonadotrope. La stimulation de la production de la progestérone par le corps jaune a été longtemps la seule fonction connue de l'hCG.

La glycosylation des hormones aurait une influence directe sur leur bioactivité. L'hCG hyperglycosylée interviendrait d'avantage dans l'implantation que l'hCG classique (244).

Trois équipes indépendantes ont montré que le blastocyste pré-implantatoire sécrète l'hCG dans l'espace utérin qui se lie à son récepteur LHCGR sur la surface déciduale. En réponse, la décidue se prépare pour l'implantation (Ohlsson et al. 1989; Srisuparp et al. 2001; Perrier d'Hauterive et al. 2004). Les cellules stromales subissent une décidualisation sous l'effet de l'hCG (247). L'hCG augmente la sécrétion du leukemia inhibitory factor (LIF) et diminue celle de l'IL-6 par les cellules endométriales, molécules connues pour leur influence sur l'implantation embryonnaire (248). Il favorise la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes (249), il peut réguler la synthèse des prostaglandines (250) et la formation de l'AMPc (251). Une étude récente a montré que les différentes formes d'hCG stimuleraient l'invasion trophoblastique indépendamment du récepteur classique à l'hCG, le LHCGR (252).

L'hCG a également des actions angiogéniques et immunologiques comme rapporté dans deux articles de notre laboratoire (253, 254). Il augmente la formation des vaisseaux sanguins et la migration et la maturation des péricytes dans différents modèles *in vitro* et *in vivo* (255-259). Il a également un impact positif sur la sécrétion du vascular endothelial growth factor (VEGF), molécule essentielle de l'angiogenèse (255, 260). L'hCG est donc considéré comme une molécule pro-angiogénique (261, 262). Par sa stimulation de l'angiogenèse et de la vasculogenèse, l'hCG assure au placenta un approvisionnement en sang maternel adéquat durant son invasion de l'endomètre fonctionnel avec une nutrition optimale du fœtus.

Les propriétés immunomodulatrices de l'hCG sont nombreuses et importantes pour la tolérance maternelle envers l'embryon. L'hCG a un impact positif sur les cellules uNK, les cellules leucocytaires prédominantes dans l'utérus non gestant et qui agissent sur l'établissement et le maintien de l'implantation embryonnaire chez la femme et la souris (263–265). L'hCG régule la prolifération des uNK (266) d'une manière dose dépendante *in vitro* (267). Ces cellules n'expriment pas le LHCGR et l'hCG agirait directement sur ces cellules par un autre récepteur, le mannose récepteur (267) qui est exprimé par les uNK. L'hCG agit également sur d'autres cellules immunitaires, les monocytes en promouvant leur fonction et leur sécrétion d'IL-8 (268) et aussi induisant les fonctions des macrophages (269). En stimulant la fonction des macrophages, l'hCG assainit l'endomètre en l'épurant des cellules apoptotiques et en le défendant d'éventuelles infections, deux mécanismes importants pour le maintien de la grossesse. Par ailleurs, l'hCG influence la différenciation et la fonction des cellules dendritiques, diminuant leur capacité à stimuler la prolifération des lymphocytes T (270). Au niveau des cellules nucléaires du sang périphériques, l'hCG induit la sécrétion de différentes cytokines, dont l'IL-1 β et LIF et pourrait stimuler l'invasion trophoblastique (271).

Finalement, l'hCG a différents effets sur les lymphocytes T CD4+. Durant les années 70, il a été suggéré que l'hCG aurait un effet sur les lymphocytes maternels (272). Depuis, il a été montré que l'hCG aurait un impact positif sur la prolifération des cellules T CD4+25+ et qu'elle attirerait ces cellules vers l'endomètre en début de grossesse (273, 274). L'hCG augmente la fréquence des cellules Treg murines *in vivo* et diminue leur activité suppressive *in vitro* (275). Un traitement d'hCG dans un modèle de souris de fausses couches spontanées augmente le nombre de cellules Treg à l'interface materno-fœtale et diminue le nombre de fausses couches. L'hCG a donc une fonction immunomodulatrice importante et ses effets sur les cellules uNK et Treg, deux populations de cellules majeures pour le maintien de la grossesse, démontrent le rôle crucial de ce signal embryonnaire comme régulateur immunitaire dans le déroulement de la grossesse.

L'hCG n'aurait pas d'impact sur la maturation ovocytaire. En effet, l'ajout d'hCG dans des milieux de culture d'ovocytes immatures n'améliore pas leur développement (276).

L'hCG est donc impliquée dans de nombreux processus assurant le bon déroulement d'une grossesse : la reconnaissance de la grossesse par l'organisme maternel, le maintien du corps jaune, la stimulation de la production de la progestérone, le renforcement de l'implantation de l'embryon, l'angiogenèse et la vasculogenèse nécessaires pour le développement du placenta, le contrôle de la différenciation du trophoblaste et finalement la régulation immunitaire à l'interface materno-fœtale (244, 277). Des études récentes montrent par ailleurs qu'une trop grande quantité d'hCG, telle qu'utilisée en PMA pour déclencher l'ovulation, serait délétère pour la réceptivité utérine, tout est une question d'équilibre (278).

1.7.3.3 Variantes de l'hCG

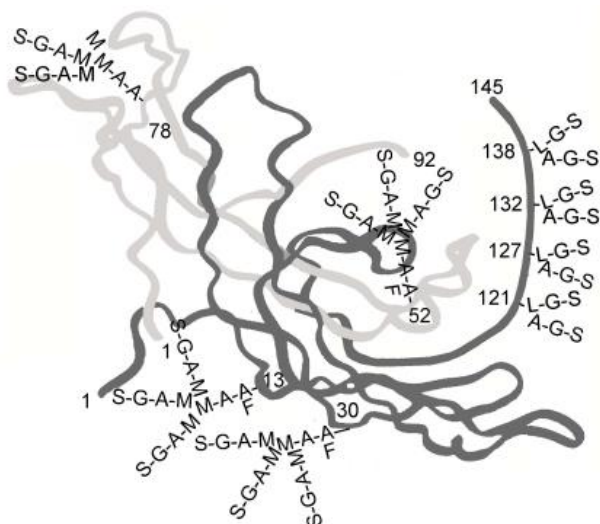


Figure 17 : structure de l'hCG hyperglycosylée

Figure extraite de l'article de Cole et al., hCG, the wonder of today's science, 2012

En plus de l'hCG classique, il existe un variant de l'hCG fortement glycosylée, il s'agit de **l'hCG hyperglycosylée** (hCG-H). Sa sous-unité β présente quatre O-glycanes liés aux oligosaccharides à la place de deux chez l'hCG classique (Figure 14) (279). Ce variant est produit massivement durant le premier trimestre de la grossesse par le cytotrophoblaste extravillieux ; c'est même la forme d'hCG qui est présente le plus massivement durant le tout début de la grossesse. Il représente 87% de l'hCG total à la troisième semaine de gestation et 51% durant la 4^{ème} semaine. Ensuite, il diminue rapidement jusqu'à disparaître complètement de la circulation maternelle à la fin du premier trimestre (280). L'hCG-H aurait une action essentiellement autocrine plutôt qu'endocrine, diminuant l'apoptose des cellules du trophoblaste (281) et induisant l'implantation de l'embryon (197) et l'invasion trophoblastique (282). Il est également sécrété massivement par les choriocarcinomes et par les tumeurs des cellules germinales (279, 283). Son action anti-apoptotique serait réalisée par sa liaison au récepteur TGF- β indépendamment du LHCGR. Il a également une forte activité pro-angiogénique comme l'hCG classique (257). Le monitoring de hCG-H est utile pour prédire le syndrome de Down (282), la pré éclampsie (284), la réponse thérapeutique en cas de maladies trophoblastiques et les prédictions de grossesses en fécondation *in vitro* (285).

La **sous-unité β de l'hCG libre** agirait également par antagonisme à travers le récepteur TGF- β (286, 287). Comme l'hCG-H, cette sous-unité aurait une action promotrice sur le cancer.

L'**hCG sulfaté** produit par la glande pituitaire est difficilement détectable lors du cycle menstruel. Il est sécrété parallèlement à la LH durant le cycle et il est concentré approximativement à un cinquantième de la concentration de la LH (233, 288). Alors que ces niveaux sont bas, l'hCG sulfaté est exactement 50 fois plus puissant que la LH (289). Ainsi, l'hCG sulfaté pourrait réaliser un travail comparable à la LH en stimulant la production d'androstènedione durant la phase folliculaire du cycle ainsi qu'en stimulant l'ovulation et la formation du corps jaune. Durant la phase lutéale, il pourrait aider à stimuler la production de la progestérone (288–291). Ces travaux sont néanmoins le fruit d'un seul groupe et nécessitent confirmation.

1.7.3.4 Evolution de l'hCG au fil des espèces

Le tableau ci-dessous est issu d'un travail de Cole en 2012 (199) et compile les données de différents articles sur l'évolution (Figure 15).

L'**être humain** a un gène de l'hCG qui a subi de nombreuses mutations entraînant l'apparition d'une hCG très acide avec 8 oligosaccharides. Cette molécule a une demi-vie de 36 heures et une bioactivité 109 fois supérieure à la LH des prosimiens. C'est cette hCG et l'hCG-H qui induiraient une implantation beaucoup plus profonde qui peut aller jusqu'au 1/3 du myomètre et une placentation hémochoriale encore plus efficiente. Cette placentation plus profonde permettrait un développement plus grand du cerveau humain par rapport aux primates, le cerveau humain adulte comptant pour 2,4% du poids total du corps.

Espèce	Caractéristiques du placenta	Profondeur de l'invasion	Molécule produite	Nombres d'oligosaccharides	Demi-vie circulante	Bioactivité relative	Masse du cerveau (% poids total du corps)	Première apparition de l'espèce (millions d'années)
Humains	Hémochorial	1/3 myomètre	hCG	8 oligos	36 heures	109 x	2,40%	0.1
Primates simiens évolués	Hémochorial	1/10 myomètre	CG	6 oligos	6 heures	18 x	0,74%	20
Primates simiens précoces	Hémochorial	A travers la décidue	CG	5 oligos	2,4 heures	7,7 x	0,17%	37
Primates prosimiens	Epithéliochorial	Pas d'implantation	LH	3 oligos	0,33 heure	1 x	0,07%	55

Figure 18 : évolution de l'hCG avec les espèces

Tableau extrait et traduit de l'article de Cole et al, *hCG, the wonder of today's science*, 2012

1.7.4 La LH

La LH est sécrétée par la glande pituitaire et est une glycoprotéine hétérodimérique avec une masse moléculaire de 28kDa comprenant deux sous-unités. La sous-unité α (semblable à celle de l'hCG) est composée de 92 acides

aminés et la sous-unité bêta de 120 acides aminés. Cette hormone a un rôle essentiel dans la reproduction en induisant la maturation ovocytaire et en provoquant l'ovulation durant le cycle menstruel. La LH contrôle la production de la progestérone par le corps jaune et si une grossesse survient chez l'être humain, l'hCG sécrétée par les cellules embryonnaires supplante le rôle de la LH pour la régulation de la production de la progestérone. Pour l'établissement de la grossesse, la LH favorise la décidualisation de l'endomètre. Comme montré précédemment, seuls les primates évolués comportent l'hCG dans leur génome. Le génome murin ne comporte donc pas de molécule équivalente à l'hCG et la LH est le seul ligand connu pour le LHCGR chez la souris. En outre, une étude a montré que les embryons de souris et de lapin sécrétaient une molécule bioactive avec une action semblable à l'hCG avant l'implantation embryonnaire, molécule qui pourrait être de la LH (292). La LH et l'hCG sont des molécules biologiquement distinctes et les actions de l'hCG ne peuvent pas être attribuées à la LH chez l'être humain (293). De l'hCG recombinante est régulièrement utilisée dans les traitements de PMA en tant que substitut de la LH mais les doses pharmacologiques d'hCG utilisées pourraient mener à des lutéinisations prématurées, une diminution du taux de fécondation et une diminution de l'expression du récepteur LHCGR dans le compartiment folliculaire (294).

Les actions immunomodulatoires de la LH sont peu connues. Schumacher et al., ont montré récemment que la LH pouvait contribuer à la tolérance materno-fœtale en agissant sur les cellules Treg chez la souris (295), comme l'hCG. Il a également été démontré que les lymphocytes T expriment le récepteur à la LH (296) suggérant que d'autres actions de la LH sur les cellules immunitaires pourraient être étudiées. Van den Heuvel et al., ont exploré les propriétés d'adhésion des lymphocytes dans l'utérus murin et ont révélé que cette adhésion était plus grande en présence de LH (297). Ces auteurs ont suggéré que la LH pourrait activer les molécules d'adhésion à la surface des précurseurs des cellules uNK, ainsi qu'augmenter leur recrutement dans l'utérus. Dans leur revue, la même équipe avance l'hypothèse qu'une variation cyclique hormonale pourrait générer une période favorable pour le recrutement des cellules uNK via l'expression de molécules d'adhésion. Ils suggèrent encore que la LH pourrait avoir un impact sur le recrutement des cellules uNK (298).

En outre, il a été observé lors d'une méta-analyse que l'application de LH recombinante durant des techniques de PMA peut améliorer la fécondation, l'implantation et le taux de grossesse chez des patients âgés en terme de reproduction (299).

1.7.5 Récepteur de la LH et de l'hCG

Les sous-unités β de l'hCG et de la LH ont 96% d'homologie qui leur permet de partager le même récepteur, le récepteur LH/hCG (LHCGR). L'hCG a une affinité 4 à 5 fois plus grande pour ce récepteur que la LH.

Le LHCGR est un membre de la famille des rhodopsines dans la grande famille des récepteurs protéine G qui contient 800 à 900 gènes dans le génome humain (300). Le LHCGR forme une des 3 classes dans cette famille des rhodopsines et est encodé par le chromosome 2. Ce gène unique est composé de 10 introns et de 11 exons chez la souris, il mesure approximativement 80kb. L'ADN complémentaire de ce gène code une glycoprotéine de 675 acides aminés. Chez l'être humain comme chez les primates, le gène du LHCGR est composé de 12 exons (301, 302).

Ce récepteur associe deux unités fonctionnelles, un large domaine extracellulaire riche en leucines permettant la reconnaissance spécifique de la liaison de l'hCG et de la LH, couplée à 7 domaines transmembranaires et un segment intracellulaire couplé à une protéine G. Ce dernier segment permet la transduction du signal généré par la liaison de l'hormone au domaine extracellulaire (303, 304). Ce récepteur couplé à une protéine G active la voie de signalisation AMPc/PKA dans les cellules de l'endomètre (305). L'expression du LHCGR se retrouve au niveau des tissus gonadiques (féminin et masculin) mais également à travers tous les organes du système reproducteur. Les cellules épithéliales luminales et glandulaires contiennent plus de LHCGR que les cellules stromales, les cellules du myomètre et que les cellules musculaires lisses (306). Il a été montré que les lymphocytes des femmes enceintes, ainsi que des femmes durant la phase lutéale du cycle menstruel, expriment le LHCGR (296).

La présence du LHCGR a également été montrée dans le cerveau de femmes adultes. Les récepteurs du système nerveux central sont présents dans différentes parties du cerveau telles que l'hippocampe, l'hypothalamus et dans le tronc cérébral (307, 308). La présence d'un récepteur à l'hCG dans ces parties du cerveau pourrait expliquer l'hyperémèse gravidique, les nausées et les vomissements qui peuvent arriver lors d'une grossesse normale. Par ailleurs, ce récepteur a été détecté dans des lignées de cellules mammaires (309).

Le LHCGR a également été retrouvé au niveau de différents organes fœtaux tels que les reins, le foie, les poumons, la rate et dans les intestins (310–312). Étonnamment, ce récepteur est présent dans ces organes fœtaux mais complètement absents dans ces organes chez l'adulte. Il semblerait que l'expression de ces récepteurs disparaisse à la naissance.

Zhang et son équipe ont créé les souris LuRKO en inactivant l'exon 11 du gène *Lhcgr*. Les souris LuRKO mâles et femelles sont nées avec des phénotypes normaux, avec des testicules, des ovaires et un appareil génital semblables aux

souris wild type (WT). Les souris mâles et femelles étaient infertiles. Les femelles LuRKO en grandissant ont eu des ovaires et un utérus sous-développés. Les hormones ovariennes étaient moins produites et le niveau des gonadotrophines était élevé (313). L'équipe de RAO a obtenu des résultats similaires sur ces différents points avec un autre type de souris KO au *Lhcgr*, KO obtenu par interruption de l'exon 1 (314). Les résultats diffèrent par contre au niveau des actions extragonadiques du LHCGR (315). Les souris LuRKO ont été greffées avec des ovaires provenant de souris WT (316) et sont redevenues fertiles suite à cette greffe. L'équipe de RAO a fait la même expérience avec ses souris KO et n'est jamais parvenue à obtenir de grossesse chez les souris transplantées (317). Des cas de mutations du LHCGR ont été rapportés chez l'être humain rendant les patients infertiles (302, 318).

De hauts niveaux de LH entraînent une désensibilisation et une diminution de l'expression des récepteurs à la LH (319, 320). Ceci arrive en conditions physiologiques (lors du pic de LH pré-ovulatoire) ou en réponse à des doses pharmacologiques d'hCG (321). Cette régulation de l'expression de ce récepteur est réalisée par une dégradation accélérée de l'ARNm du récepteur LH/hCG causée par une protéine se liant spécifique à cet ARNm, la protéine de liaison de l'ARNm du récepteur à la LH mevalonate kinase (320).

Un autre récepteur a été décrit pour l'hCG : il s'agit du récepteur mannose (CD206) qui ne se lierait pas à la LH. La liaison de l'hCG sur ce récepteur aurait d'autres effets que celles décrites pour le LHCGR (322). En effet, une autre étude a montré que l'hCG pouvait induire la sécrétion de l'IL-8 par les monocytes sans passer par le LHCGR (268).

Objectifs

Au cours des dernières années, une meilleure compréhension des interactions entre l'embryon et l'endomètre maternel a été acquise grâce à de nouvelles connaissances de la biologie cellulaire et moléculaire de l'embryon et de la physiologie de l'endomètre. Néanmoins, de nombreuses questions subsistent sur la compréhension du processus implantatoire et sur les différents événements moléculaires impliqués dans la qualité de l'embryon, dans son apposition, son adhésion et dans son invasion de l'endomètre maternel. En parallèle, une meilleure compréhension de la réceptivité utérine et la mise au point de techniques pour améliorer cette réceptivité sont nécessaires. Des études sur l'embryon, son implantation et la réceptivité utérine peuvent éclaircir certaines de ces zones d'ombres et révéler de nouvelles perspectives dans le diagnostic de l'infertilité et la mise en place de thérapies pour des couples de patients infertiles.

Dans l'étude des différents mécanismes impliqués dans le processus implantatoire, le laboratoire d'Immunoendocrinologie et Embryologie de l'Université de Liège s'est intéressé plus particulièrement aux phases initiales de l'implantation, à savoir le dialogue paracrine du blastocyste avec l'épithélium endométrial maternel après son entrée dans la cavité utérine. Les études actuelles montrent l'influence positive du signal spécifique de l'embryon, l'hCG, sur l'implantation, non seulement par son rôle lutéotrope mais aussi via son action au niveau de l'interface materno-fœtale en favorisant la production de cytokines pro-implantatoires, pro-angiogènes et immunorégulatrices. Cette action pro-implantatoire est mise en place par l'interaction de l'hCG avec son récepteur le LHCGR présent au niveau de l'endomètre. Cependant l'expression du LHCGR dans l'endomètre, tout comme l'analyse des différents marqueurs de la fenêtre implantatoire se révèlent difficiles lors de l'implantation embryonnaire humaine en raison de nombreux problèmes, notamment éthiques. A côté de ces mécanismes moléculaires liés à l'implantation, la qualité des embryons transférés lors d'un traitement FIV reste une donnée peu quantifiable. Notre laboratoire a précédemment participé à une étude qui a permis l'identification d'un biomarqueur potentiel de la qualité ovocytaire, le G-CSF, mais des données supplémentaires sur les performances de ce biomarqueur sont nécessaires.

L'objectif de cette thèse est double, avec un versant fondamental portant sur l'étude d'un dialogue entre l'embryon et l'endomètre chez la souris lors de l'implantation embryonnaire et un versant plus clinique portant sur l'utilisation d'un biomarqueur pour déterminer la qualité des ovocytes utilisés en fécondation *in vitro*.

La première partie de cette thèse a pour objectif d'étudier la possibilité d'un dialogue entre l'embryon murin et l'endomètre lors de l'implantation via l'existence d'une LH blastocytaire et l'expression de son récepteur par l'endomètre murin. L'existence de ce dialogue à l'interface materno-fœtale est importante pour la validation de l'utilisation d'un modèle murin pour l'étude de l'implantation embryonnaire. Pour ce faire, nous avons réalisé des expériences d'identification et de quantification d'une éventuelle présence d'un signal LH produit par le blastocyste murin. Nous avons ensuite réalisé des tests de bioactivité sur le signal que nous avons identifié. Finalement, nous avons étudié et quantifié l'expression du *Lhcgr* par les cellules endométriales lors des différentes phases du cycle œstral de la souris. Une localisation par immunohistochimie et une analyse d'expression protéique par westernblot ont été réalisés pour confirmer la présence du LHCGR indépendamment de l'expression de ses transcrits.

La deuxième partie de cette thèse concerne l'utilisation du G-CSF comme biomarqueur de la qualité ovocytaire afin de déterminer quels sont les meilleurs embryons à transférer *in utero*. Des études précédentes ont montré que le G-CSF quantifié dans les fluides folliculaires spécifiques des ovocytes est corrélé avec le taux de grossesses évolutives des embryons provenant de ces ovocytes. Le but de mon travail était de démontrer quel impact le dosage du G-CSF pourrait avoir sur les décisions des embryologistes lors du choix des embryons à transférer. Pour ce faire, nous avons analysé la quantité de G-CSF présente dans tous les fluides folliculaires ayant donné des embryons chez 78 patientes. Les embryons ont donc été soit transférés en frais, soit congelés pour un transfert ultérieur, soit détruits car leur morphologie n'était pas jugée suffisante pour une congélation. Précédemment, le G-CSF n'avait été dosé que dans les fluides folliculaires ayant donné des embryons transférés *in utero*.

Dialogue entre la LH blastocytaire et le récepteur de la LH au moment de l'implantation chez la souris

L'étude de l'implantation embryonnaire est non réalisable *in vivo* chez l'être humain pour des raisons éthiques évidentes. Pour ces raisons, des modèles de petits animaux avec une gestation courte qui ont des mécanismes moléculaires similaires d'implantation et qui peuvent être manipulés génétiquement sont des systèmes idéaux afin d'étudier en détail l'implantation *in vivo*. Parmi ces modèles, la souris est celui dont l'implantation se rapproche le plus de celui de l'homme (207). Chez l'être humain et chez les primates évolués, l'hCG joue un rôle crucial dans l'implantation embryonnaire (article de revue sur le sujet, (323)). La LH partage le même récepteur que l'hCG avec une affinité moindre, le LHCGR. Ce récepteur a déjà été décrit dans l'endomètre humain (248) mais il est difficile éthiquement d'étudier le dialogue entre ce récepteur au niveau des cellules épithéliales et stromales de l'endomètre et l'hCG, émit par l'embryon dès le stade 8 cellules, chez l'être humain. Il a été montré que l'embryon murin sécrèterait une molécule avec une action semblable à l'hCG durant son implantation (292).

L'objectif de cette étude était d'enquêter sur l'existence possible d'un dialogue LH-LHCGR à l'interface materno-fœtale durant l'implantation embryonnaire murine. Pour que ce dialogue puisse avoir lieu, il était nécessaire de démontrer la présence des deux protagonistes à l'interface materno-fœtale murine. Les expériences réalisées ont donc été :

3.1 La détection d'un signal LH au niveau de l'expression en ARNm et en protéines par des embryons de souris.

Des embryons murins ont été cultivés *in vitro* entre le jour cinq et le jour dix de leur développement embryonnaire et leur surnageants ainsi que leur contenus protéiques intracellulaires ont été collectés. Le contenu de 500 embryons de souris a été rassemblé et soumis à une RT-PCR et a permis de détecter un ARNm de la transcription de la *lh* au jour six du développement. Le produit de PCR a été séquencé et correspondait au gène *Mus musculus lh* (gi 930344). La protéine LH murine a été détectée par RIA dans les surnageants ainsi que dans les embryons murins correspondants aux 5 jours de développement étudiés (Figure 19).

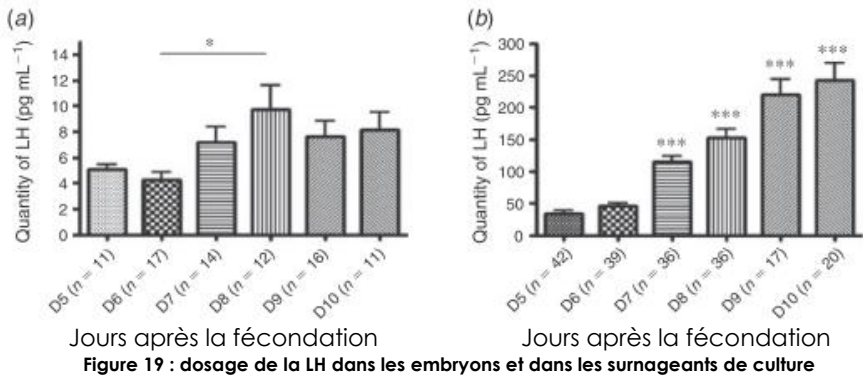


Figure 19 : dosage de la LH dans les embryons et dans les surnageants de culture

La quantité de LH restait constante à l'intérieur des embryons entre le jour 5 et le jour 10 alors que la quantité de LH produite et sécrétée dans le milieu de culture augmentait significativement entre le jour 5 et le jour 10. La LH a été également détectée par RIA chez des souris gestantes depuis 7 jours au niveau de leur sérum, de leur site d'implantation et à l'intérieur de leurs embryons. Le niveau le plus élevé de LH a été détecté dans leur sérum maternel.

3.2 La bioactivité de ce signal LH.

La bioactivité de la LH produite par les embryons de souris a été démontrée en utilisant un bioassay *in vitro*. Ce bioassay mesure la quantité de testostérone produite par des cellules de Leydig stimulées par la LH récoltée lors des cultures d'embryons de souris. La bioactivité de la LH contenue à l'intérieur des embryons de souris reste constante entre le jour 5 et le jour 10. La bioactivité de la LH récoltée dans les surnageants de culture augmente d'une manière significative après le septième jour de culture ($p > 0,001$).

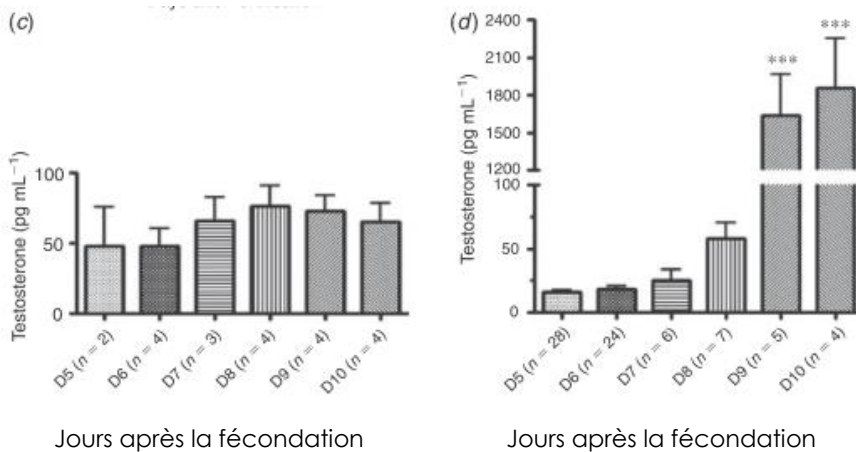


Figure 20 : bioactivité de la LH retrouvée dans les embryons et dans les surnageants de culture

3.3 La quantification de l'expression des ARNm du LHCGR dans les cellules de l'endomètre au cours du cycle œstral de la souris.

Les cellules de l'endomètre ont été isolées de 79 utérus pour quantifier l'expression du *Lhcgr* à travers le cycle œstral. L'endomètre a été collecté à chacune des 4 phases du cycle, à savoir le pro-œstrus (n=16), l'œstrus (n=14), le metoœstrus (n=25) et le dioœstrus (n=24). La quantification du *Lhcgr* a été réalisée par RT-qPCR avec le 18s comme gène de référence et du *Lhcgr* provenant de cellules de la granulosa a été utilisé pour réaliser la courbe standard. L'expression du *Lhcgr* augmentait d'une manière non significative lors de la comparaison entre le pro-œstrus et l'œstrus ainsi qu'entre l'œstrus et le metoœstrus. Par contre, cette différence était significative entre le metoœstrus et le pro-œstrus ($p=0,00257$). Il y a également une diminution significative de l'expression du *Lhcgr* entre le dioœstrus et le pro-œstrus ($p=0,0245$).

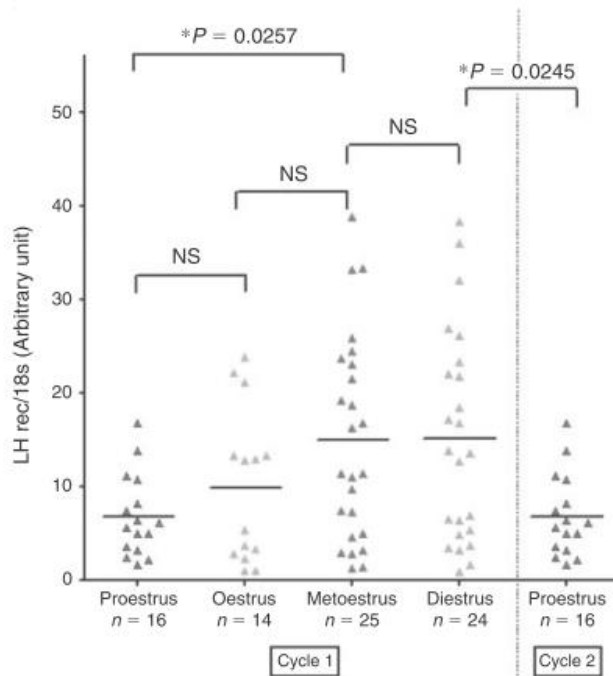


Figure 21 : PCR quantitative du *Lhcgr* dans les différentes phases du cycle œstral

3.4 La détection de la protéine de la LH au cours du cycle œstral de la souris.

La protéine du LHCGR a été détectée par immunohistochimie dans des coupes d'endomètre de souris récupérées lors des différentes phases du cycle œstral.

Cette protéine a été observée dans les cellules épithéliales luminales et glandulaires de l'endomètre lors de chaque phase. Cette observation a été confirmée par une analyse western blot d'extraits protéiques des différentes phases du cycle œstral.

3.5 Discussion des résultats

Durant cette étude, la présence d'un signal, la LH a été démontré comme étant sécrété par des embryons murins. Cette LH pourrait avoir les mêmes fonctions que l'hCG sécrétée par l'embryon humain. En plus de sa présence, la bioactivité de cette LH sécrétée dès le stade blastocyste par l'embryon murin a été confirmée via la production de testostérone par des cellules de Leydig sous la stimulation de cette LH embryonnaire. Cette bioactivité augmente significativement sous l'influence de la LH retrouvée dans le milieu de culture des embryons après le septième jour de développement alors qu'elle reste constante sous l'influence de la LH contenue à l'intérieur des embryons. Ceci peut s'expliquer par une sécrétion rapide de la LH après sa synthèse dans les embryons. Cette hypothèse semble confirmée par la faible quantité de LH retrouvée dans le cytoplasme des embryons par rapport à la quantité retrouvée dans les surnageants de culture.

Le cycle œstral murin est divisé entre 4 phases qui se reproduisent tous les 5 jours : le pro-œstrus, l'œstrus, le metoestrus et le dioestrus. Ces 4 phases ont été identifiées grâce à des frottis vaginaux déposés sur lames selon la méthode décrite par Allen en 1922 (67). Cette identification est importante afin de déterminer si le LHCGR est exprimé durant l'ensemble du cycle œstral et si cette expression est modifiée d'une phase à l'autre. Des études chez l'humain ont montré l'expression du récepteur LHCGR dans l'endomètre au cours du cycle menstruel (311, 324). Zhang et son équipe ont observé une expression de transcrits du *Lhcgr* dans le système génital murin (325). Les expériences d'immunohistochimie ont montré que le LHCGR était présent durant les différentes phases du cycle et plus particulièrement sur les cellules épithéliales luminales et glandulaires de l'endomètre murin. Ces cellules sont particulièrement importantes pour faciliter le dialogue entre l'embryon et l'endomètre puisqu'elles sont les premières avec lesquelles les cellules trophoblastiques de l'embryon rentreront directement en contact. L'expression protéique du LHCGR par les cellules épithéliales pourrait jouer un rôle déterminant durant la phase d'adhésion de l'implantation. En outre, une analyse western blot a confirmé l'expression protéique d'une protéine de 60 kDa correspondant au LHCGR durant les différentes phases du cycle murin.

Dans notre étude, il a été également observé que les transcrits du *Lhcgr* étaient exprimés au niveau endométrial durant les 4 phases du cycle. Une quantification de cette expression a été réalisée par Taqman pour chaque phase du cycle et les transcrits du *Lhcgr* seraient plus exprimés dans les cellules de l'endomètre au moment de la fenêtre implantatoire théorique de l'embryon murin. Après le dioestrus, l'expression du *Lhcgr* diminue fortement pour atteindre le niveau

d'expression du pro-oestrus au cycle suivant. L'augmentation de l'expression du *Lhcgr* au moment de la fenêtre implantatoire appuie la théorie selon laquelle le dialogue LH/LHCGR pourrait être important pour l'implantation embryonnaire. Ces résultats sont en adéquation avec ceux de Chudgar (317), qui a montré que les souris KO au LHCGR n'étaient pas capables de tomber enceintes après une substitution hormonale ou après une transplantation d'ovaires de souris wild type. La contribution de l'absence du LHCGR utérin dans l'infertilité des souris KO au LHCGR a été démontrée par une équipe (326), mais des résultats contradictoires ont été publiés par un autre équipe (327) qui a été incapable de montrer qu'une transplantation orthotopique d'ovaires chez les souris LuRKO résultaient en échecs d'implantation.

Une autre étude a confirmé l'expression transcriptomique et protéique du LHCGR dans l'endomètre murin au cours du cycle œstral (328). Durant cette étude, la production de la progestérone par l'endomètre serait augmentée sous l'effet de la LH sur le LHCGR via les voies de signalisation impliquant l'AMPc, la protéine Kinase A et ER K1/2.

Il serait intéressant de réaliser une étude sur la liaison de la LH blastocytaire murine à son récepteur endométrial pour comprendre l'impact de cette LH au niveau endométrial au moment de l'implantation embryonnaire. Un autre point d'intérêt serait la découverte du type cellulaire qui sécrète et synthétise la LH dans le blastocyste murin. Serait-ce les cellules trophoblastiques comme chez l'être humain pour l'hCG ou la masse cellulaire interne ? A partir de combien de cellules est-ce que l'embryon murin sécrète cette LH exactement ? L'utilisation d'un système Cre/Lox ou de SI RNA pour inactiver l'expression du *Lhcgr* au niveau endométrial permettrait de terminer la controverse entourant le dialogue LH/LHCGR au moment de l'implantation.

En conclusion, ce travail a montré l'expression protéique et transcriptomique du LHCGR durant les différentes phases du cycle œstral comme cela avait déjà été observé dans les phases du cycle menstruel féminin. Le blastocyste murin sécrète de la LH, une molécule proche de l'hCG et partageant son récepteur, à partir de son cinquième jour de développement et cette LH est bioactive. Le dialogue hCG/LHCGR qui a un impact important au niveau immunologique et angiogénique lors de l'implantation humaine pourrait donc provenir de beaucoup plus loin dans la chaîne de l'évolution que simplement au niveau des primates (329).

Impact de la quantification du G-CSF folliculaire sur les décisions des embryons à transférer : une étude prouvant le concept

4.1 Etudes antérieures sur le G-CSF comme biomarqueur de la qualité ovocytaire

Les recherches réalisées par l'équipe de N. Lédée ont exploré les propriétés du G-CSF comme biomarqueur non invasif du potentiel implantatoire des ovocytes ponctionnés lors de traitements FIV (6).

Dans la première étude, les FF étaient ponctionnés d'une manière individuelle et la traçabilité de chaque fluide était assurée jusqu'à ce que la naissance ou que l'échec de la tentative soit connu. Vingt-huit cytokines et chémokines ont été mesurées simultanément dans chaque FF des 132 fluides de follicules individuels d'ovocyte qui ont été fertilisés et transférés après une hyperstimulation ovarienne conventionnelle. Les molécules testées étaient : IL-1 α , IL-1Ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IFN- α , TNF- α , G-CSF, GM-CSF, VEGF, PDGF, FGF, IP-10, MCP-1, CCL5, eotaxin, MIP-1- α and MIP-1- β . La conclusion de cette étude était que les niveaux de G-CSF dans ces fluides individuels sont corrélés avec le potentiel implantatoire des embryons correspondants.

Ces données ont été reproduites dans une cohorte de 200 embryons en utilisant de nouveau le Luminex et également un système FACS avec des microbilles pour mesurer le taux de G-CSF dans les FF. Les résultats obtenus ont été similaires à la première étude. Par contre, le dosage du G-CSF avec un Elisa classique n'a pas donné les mêmes résultats discriminants (330).

Une troisième étude a été menée incluant 83 patients suivant un cycle FIV/ICSI naturel modifié pour mesurer 26 facteurs solubles dans les FF de ces patients. Les facteurs mesurés étaient : IL-1 α , IL-1Ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IFN-g, TNF- α , G-CSF, GM-CSF, VEGF, PDGF, FGF, IP-10, MCP-1, CCL5, eotaxin, MIP-1 α , and MIP-1-b. Le but de cette étude était de fournir un modèle expérimental où la traçabilité était complète. Un seul ovocyte était retrouvé et donc, seulement un seul embryon était transféré. Chacun des 26 facteurs a été évalué comme un potentiel marqueur de la naissance d'un enfant et le G-CSF a

été trouvé comme étant le meilleur prédicteur de naissance lors de cette étude. La combinaison du G-CSF des FF et du score morphologique de l'embryon à son deuxième jour de développement a été suggérée comme un test d'évaluation possible avant de réaliser le transfert embryonnaire (331). A travers ces 3 études, la sélection des FF au travers de milliers de fluides a été réalisée pour sélectionner les fluides correspondants à un embryon qui a été transféré avec la traçabilité de chacun des fluides jusqu'à la naissance. Chaque fluide a été analysé avec une technologie multiplex. Dans chacune de ces études, le G-CSF apparaît comme un excellent biomarqueur non invasif de la compétence des ovocytes en regard de son fort pouvoir discriminant et indépendant de la méthode généralement utilisée en FIV qu'est l'évaluation morphologique des embryons avant le transfert.

Une autre équipe a testé différentes cytokines comme marqueurs de la capacité des ovocytes à donner une grossesse, ils ont testé Rantes, TNF α , IFN γ , IL-2, IL-4 et le G-CSF et ils ont confirmé les résultats obtenus par notre équipe pour le G-CSF (332).

4.2 Le G-CSF

Le G-CSF est une cytokine qui stimule la prolifération et la différenciation des granulocytes en neutrophiles. Il est codé par un gène unique localisé sur le chromosome 17 (q11-22)(333). Ce gène est composé de 5 exons et a une longueur de 2.3 kb (334). Le G-CSF possède 2 récepteurs (335), un de 759 acides aminés et l'autre de 812 acides aminés, leur distinction de conformation se situe au niveau de la chaîne carboxy-terminale (336). Le G-CSF est sécrété par différentes cellules immunitaires, les NK, les macrophages/monocytes, les lymphocytes T et les cellules dendritiques (337–342).

La présence du G-CSF dans le tractus génital féminin et son rôle possible dans la reproduction ont déjà été étudiés dans le passé (343). Il est produit par les cellules de la décidue et son récepteur c-fms est exprimé par les cellules trophoblastiques (344–348).

Le G-CSF a été montré comme étant sécrété par les cellules de la granulosa au moment de l'ovulation (349) puis durant la phase lutéale dans l'endomètre (350) et finalement durant la gestation dans le placenta (351). Il est également produit par les cellules uNK dans l'endomètre (352). Le G-CSF dans le FF peut promouvoir la tolérance materno-fœtale (353, 354) ou influencer le niveau d'ARNm de l'ovocyte ou sa capacité à s'autorégénérer (355). Il peut aussi interagir avec son environnement cellulaire pour produire des cytokines et des facteurs de croissance nécessaires au bon développement de l'embryon et à son implantation.

Le récepteur du G-CSF voit son expression augmenter durant la maturation des follicules (350), il s'exprime également dans les cellules de la granulosa (349). Les

cellules de l'endomètre humain expriment le récepteur du G-CSF durant le cycle menstruel d'une manière variable (356) influencée par les œstrogènes (357).

Il a été suggéré que le G-CSF pourrait jouer un rôle majeur dans l'ovulation humaine (358) qui pourrait être un phénomène immunologique (139). Au niveau immunologique également, des interactions clés dans le follicule impliquant des cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques et les cellules T régulatrices (Treg) pourraient être influencées par le G-CSF (331).

L'immunotolérance materno-fœtale pourrait également être améliorée par le G-CSF : presque toutes les fausses couches observées dans la cohorte réalisée par Ledee et al., ont été trouvées dans un groupe avec un faible niveau de G-CSF dans le FF. Deux autres études ont montré qu'une administration de G-CSF en sous-cutané ou *in utero* augmente significativement la probabilité de mener une grossesse à terme chez les patientes sujettes à des fausses couches inexplicables (359, 360). Cette amélioration pourrait être expliquée par une action du G-CSF sur l'épaisseur de l'endomètre (361, 362) même si cette action est controversée (363–365). Une étude récente a montré dans un modèle *in vitro* que le G-CSF recombinant pouvait influencer l'expression d'ARNm endométrial de gènes importants pour le remodelage vasculaire endométrial, la modulation immunologique locale et les voies d'adhésion cellulaires (366).

4.3 Résumé de l'article

L'objectif de cette étude était de voir l'impact que le dosage du G-CSF pourrait avoir lors de la décision du transfert embryonnaire. Il a pour la première fois été mesuré dans les FF de l'ensemble de la cohorte des ovocytes ponctionnés ayant donné des embryons de 78 patientes. Précédemment, il n'avait été mesuré que dans les FF des ovocytes ayant donné des embryons transférés. Le taux de G-CSF et de GM-CSF ont été mesurés par la technologie Luminex dans 522 fluides folliculaires correspondant à 116 embryons transférés en frais, 275 embryons congelés et 131 embryons détruits.

Les ovocytes ont été ponctionnés après une stimulation hormonale des patientes prescrites par les médecins du CPMA. Ils ont été fécondés le jour de la ponction avec le sperme du conjoint par une méthode d'ICSI. Au troisième jour de développement, la morphologie des embryons a été analysée à l'aide de différents critères décrit dans l'introduction. Les embryons de classe A sont définis comme ayant au moins 6 cellules, moins de 10% de fragmentation et une taille cellulaire similaire. Les embryons de qualité morphologique A ont été transférés préférentiellement, ensuite les embryons de qualité B et finalement les embryons de qualité C s'ils étaient les seuls disponibles. Les embryons non transférés ont été congelés et transférés ultérieurement si nécessaire.

Sur les 78 patientes qui ont eu un transfert embryonnaire en frais (42 avec 1 seul embryon, 34 avec 2 embryons et 2 avec 3 embryons), 24 (31%) étaient enceintes

après 12 semaines. En outre, 34 de ces 78 patientes (43,5%) ont eu des embryons congelés après la tentative en frais. La décongélation embryonnaire a permis de transférer 79 embryons supplémentaires résultant en 10 grossesses supplémentaires. Le taux de grossesse cumulé est de 43,6% (34/78) dont 29 grossesses avec un seul enfant et 7 grossesses gémellaires.

Pour vérifier le pouvoir prédictif du G-CSF et du GM-CSF en tant que marqueurs de réussite de grossesse, une analyse multivariée (multivariable logistic regression analysis) utilisant la courbe ROC a été réalisée. Cette analyse a permis de déterminer la performance, la sensibilité et la spécificité des concentrations folliculaires de G-CSF et de GM-CSF en tant que marqueurs d'implantation. Le GM-CSF n'a pas fourni de résultat statistiquement significatif. Le G-CSF a obtenu un résultat de 0.77 (0.69-0.83) avec un $P < 0.001$ indiquant un bon pouvoir discriminant de la qualité embryonnaire. En comparaison, la courbe ROC de la qualité morphologique des embryons seule a obtenu un résultat de 0.66 (0.58-0.73) ($p=0.01$). Le G-CSF folliculaire apparaît comme très sensible (92%) avec une haute valeur prédictive négative (97%) mais sa spécificité et sa valeur prédictive positive étaient basses (53 et 28% respectivement). La concentration du G-CSF et la morphologie de l'embryon semblent indépendants et lorsque les deux résultats ont été analysés ensemble, la spécificité de la prédiction est passée de 53 à 77% mais la sensibilité était diminuée.

Le tableau ci-dessous illustre les taux d'implantation obtenus pour 195 embryons transférés. Ils sont répartis selon leur score morphologique (A, B ou C) et selon leur concentration en G-CSF (I : haute concentration >30 pg/ml, II : concentration moyenne <30 et $>18,4$ pg/ml et III : basse concentration $<18,4$ pg/ml). Brièvement, les embryons avec une haute concentration de G-CSF et une bonne morphologie (A) ont un taux d'implantation de 54%, taux significativement plus élevé que toutes les autres combinaisons ($p > 0.001$).

Catégorie de G-CSF (pg/ml)	Nombre d'embryons	Taux d'implantation	FF G-CSF (I-II-III) et type d'embryon (A-B-C)	Nombre d'embryons	Taux d'implantation
I : > 30 pg/ml	59	36,4**	IA	27	53,7***
			IB	14	28,5
			IC	18	16,6
II : 18 - 30 pg/ml	105	16,8	IIA	36	19,4
			IIB	28	16
			IIC	41	14
III : < 18 pg/ml	31	6	IIIA	15	6
			IIIB	6	8
			IIIC	16	5

Figure 22 : Taux d'implantation embryonnaire en fonction du dosage du G-CSF intra-folliculaire

Dans les cas des 79 embryons congelés transférés après décongélation, le taux d'implantation était également significativement plus élevé chez les embryons de classe I (36%) que chez les embryons de classe II (9%) et que chez les embryons de classe III (3%).

Un des buts de ce travail était de déterminer l'influence que pourrait avoir la mesure de la concentration du G-CSF folliculaire lors de la sélection embryonnaire par le biologiste. L'hypothèse avancée, après les résultats obtenus, est que l'embryon transféré devrait être choisi selon la règle :

IA > IB > IIA > IC > IIB > IIC > IIIA > IIIB > IIIC.

en partant du principe que l'embryon le plus à gauche devrait être préférentiellement transféré par rapport à celui se situant à sa droite. Le nombre (I, II et III) se référant à la classification du G-CSF et la lettre (A, B et C), au score morphologique de l'embryon. Le choix du biologiste a été caractérisé comme optimal lorsqu'il a sélectionné un embryon au jour 3 avec un score le plus à gauche. De nos 77 patientes, 22 n'ont pas obtenu l'embryon avec le meilleur score. Chez ces patientes, le taux d'implantation était significativement plus bas que chez les 55 patientes ayant obtenu au moins un embryon de qualité optimal (18 comparé à 36%).

Cette étude suggère que la combinaison de la concentration folliculaire du G-CSF et du score morphologique de l'embryon peut améliorer l'efficacité de la sélection embryonnaire. Cette approche modifierait le choix des biologistes sur les embryons qu'il serait intéressant de transférer directement, de congeler et de détruire. Les résultats obtenus suggèrent également qu'en utilisant le dosage du G-CSF, il serait possible de réduire le nombre de grossesses multiples.

Le dosage d'un biomarqueur tel que le G-CSF dans les fluides folliculaires a comme principal avantage que cette méthode est non invasive, simple et bon marché comparée à des méthodes d'évaluation génomique de la compétence des ovocytes (367, 368). Le désavantage est que cette méthode d'évaluation ne tient pas compte de l'influence des conditions de culture des embryons ou de l'impact des facteurs paternels sur le développement embryonnaire.

Il est important de réaliser des études prospectives de l'intérêt de la mesure du G-CSF folliculaire pour déterminer le coût de cet outil et les bénéfices réels de cette mesure. Il serait également intéressant de déterminer si la mesure du G-CSF pourrait être utile chez des patientes avec une faible réserve ovarienne.

En conclusion, cette étude suggère que la mesure du G-CSF pourrait améliorer le taux de grossesses en FIV en permettant de sélectionner un embryon de bonne qualité, limiter le nombre de grossesses multiples, diminuer le nombre d'embryons cryopréservés et utiliser des embryons qui sont actuellement détruits. Ce dosage, en permettant une meilleure sélection embryonnaire, permettrait d'augmenter l'efficacité des traitements FIV en diminuant le temps et l'argent nécessaire pour

l'obtention d'une grossesse. Des études prospectives randomisées devront être réalisées pour déterminer si cet outil permet réellement de diminuer le nombre d'embryons et le nombre de cycles requis pour obtenir une grossesse.

Discussion générale

Les techniques de procréation médicalement assistée sont sans cesse en évolution depuis l'avènement de la fécondation *in vitro* en 1979. Ces dernières années, citons l'avènement de l'Injection intracytoplasmique du spermatozoïde avec sélection morphologique (IMSI), la vitrification ovocytaire et le suivi en temps réel de l'évolution morphologique des embryons. Cependant, si des avancées majeures sont réalisées en PMA, de larges inconnues persistent, et l'implantation embryonnaire reste une « boîte noire » de la reproduction.

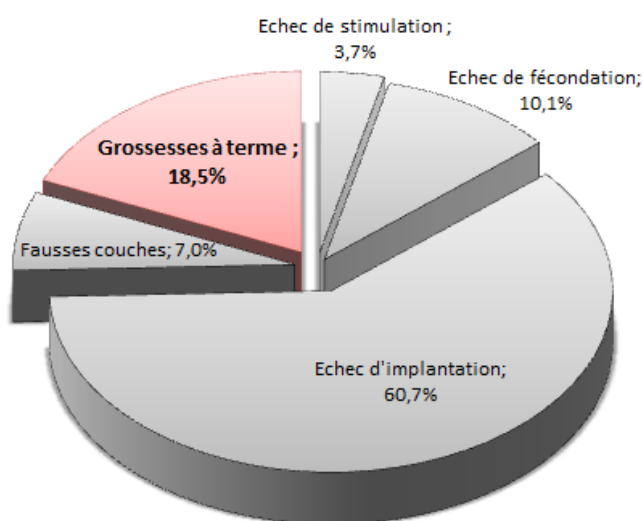


Figure 23 - Taux de réussite en FIVETE et causes d'échecs

Figure extraite de statistiques réalisées sur les chiffres du BELRAP 2012

Au regard des statistiques nationales Belge de 2012 (BELRAP), lors de FIVETE en routine, seulement 18% des embryons transférés lors d'une première tentative arrivent au terme d'une grossesse. Ces statistiques montrent également que la cause principale de non réussite d'un traitement est due à un échec d'implantation, la grande majorité des patients arrivant à avoir des embryons *in vitro*. Pour augmenter le taux de réussite d'un traitement FIV qui est de 18,5% lorsqu'il y a une ponction (tous rangs et âges confondus), la pratique courante est de transférer plus d'embryons au prix d'un risque accru de grossesses multiples avec toutes les conséquences obstétricales, périnatales, sociales et économiques que cela implique. La législation belge définit le nombre d'embryons qu'une patiente peut recevoir en fonction de son âge et du nombre de traitements FIV qu'elle a déjà suivi (Figure 24). Le risque d'une telle législation est la diminution du taux de réussite des traitements suivis par les patientes.

Les échecs d'implantation en FIV peuvent avoir différentes causes possibles : une mauvaise qualité de l'embryon, un défaut de réceptivité endométriale, un environnement immunitaire inadéquat pour l'acceptation de l'allogreffe fœtale ou un défaut de communication entre l'embryon et l'endomètre maternel conduisant à des dérégulations du processus implantatoire.

Différents centres travaillent sur une amélioration de l'implantation suite au transfert des embryons en PMA. Certains groupes travaillent sur la détection de la fenêtre implantatoire comme l'équipe de Diaz-Gimeno (369). D'autres équipes travaillent sur des mesures à prendre lors du transfert embryonnaire. Par exemple, des études récentes ont montré qu'une lésion de l'endomètre juste avant un transfert lors de traitement FIV pourrait améliorer le taux d'implantation (370). Ou encore, des instillations de *granulocyte colony-stimulating factor* (361), de hCG (371) ou de piroxicam (372) avant le transfert pourraient également avoir un impact positif sur l'implantation de l'embryon. L'administration intra-utérine d'hCG pour améliorer le taux d'implantation est actuellement controversée (373, 374).

Age	Rang	Emb Frais	Emb Cg
< 36	1	1	2
	2	1+ 2-	2
	3-6	2	2
36 - 39	1-2	2	2
	3-6	3	2
40 - 42	1-6	Au choix	2

Figure 24 : loi Belge et nombre d'embryons pouvant être transférés lors d'un traitement FIV

Figure extraite du Cours sur la PMA à l'académie de Médecine par le Pr S. Perrier d'Hauterive en 2009

La question principale qui nous intéresse ici est finalement : « Comment permettre aux couples présentant des problèmes de fertilité d'avoir une plus grande chance d'avoir des enfants avec le moins de risque possible ? » Pour ce faire, deux réponses possibles ont suscité notre intérêt : une meilleure sélection des embryons à transférer *in utero* et la possible utilisation d'un modèle animal pour comprendre le dialogue materno-fœtal lors de l'implantation embryonnaire.

5.1 La sélection des embryons à transférer

La diminution du nombre de grossesses multiples pourrait être envisagée avec une meilleure sélection des embryons à transférer et ainsi généraliser un transfert mono-embryonnaire permettant aux patientes de vivre leur grossesse avec un risque moindre et une plus grande chance de succès. Différentes

techniques sont étudiées actuellement pour cette sélection d'embryon sur d'autres critères que l'observation morphologique juste avant le transfert. Citons notamment une méthode d'analyse de chromosomes lors d'un diagnostic pré-implantatoire, méthode appelée aCGH pour « array comparative genomic hybridization » (375, 376). Le HLA-G a également été proposé comme marqueur de la qualité embryonnaire lorsqu'il est dosé dans les milieux de culture des embryons (377, 378). Finalement, la technique la plus étudiée actuellement est l'observation de la dynamique de développement de l'embryon en temps réel avec des caméras appelée « time lapse video » (379).

Les meilleures études en recherche clinique sont les études prospectives randomisées. Malheureusement, pour les raisons suivantes, ce type d'étude est très compliqué à réaliser lorsque l'on veut étudier les embryons humains (175, 177, 380, 381):

- (a) Si le nombre d'embryons transférés est supérieur au nombre de sacs gestationnels ou de fœtus présents, la capacité à déterminer les embryons qui se sont implantés est très limitée.
- (b) Le transfert d'un seul embryon n'est pas réalisé dans la majorité des centres FIV ; la majorité des études de ce type sont réalisées sur des très petits nombres d'embryons.
- (c) La variabilité dans la sélection des patients et dans la gradation des embryons par chaque centre rend les études et les comparaisons inter-cliniques très difficiles.
- (d) Chaque embryon et chaque patient sont uniques, rendant difficile la comparaison entre les différentes méthodes d'évaluation et les résultats obtenus.

Ceci a pour conséquence que la majorité des études sur la sélection des embryons sont rétrospectives ou incluent un très faible nombre de patients.

5.2 L'intérêt de la mesure du G-CSF folliculaire

Dans notre étude sur le G-CSF, 522 embryons ont été inclus et ont soit été transférés (116), soit congelés pour un transfert ultérieur (275), soit détruits (131). D'autres études avaient été menées sur le G-CSF précédemment, ce qui inclut un total de 354 embryons testés pour le G-CSF et transférés *in utero*. Un brevet a été déposé par Nathalie Lédée pour l'utilisation du G-CSF folliculaire comme biomarqueur de la qualité ovocytaire. Des études prospectives sur l'utilisation du G-CSF dans des centres FIV sont actuellement en cours de réalisation pour confirmer l'hypothèse et la valeur ajoutée de ce dosage à l'évaluation morphologique des embryons réalisée par les embryologistes.

La mesure du G-CSF folliculaire est une méthode peu invasive pour l'évaluation du potentiel de l'embryon à s'implanter. Cette méthode pourrait être rapidement utilisée avec une réponse suffisamment rapide pour la sélection des

embryons avant le transfert. Le G-CSF folliculaire peut aussi être utilisé dans la politique de transfert d'un seul embryon pour permettre de distinguer les ovocytes de bonne qualité avant même leur fécondation. Il pourrait être utile également pour évaluer individuellement les ovocytes (pour les femmes avec une faible réserve ovarienne) afin d'évaluer le meilleur protocole de stimulation ovarienne à appliquer (des indications spécifiques pour une stimulation minimale) et pour déterminer quels embryons sont intéressants à cryopréserver ou non. Nous avons montré que la concentration du G-CSF dans les fluides folliculaires individuels semble être corrélée avec la naissance potentielle des embryons correspondants dans deux modèles opposés de stimulation ovarienne : dans l'hyperstimulation ovarienne standard et dans des cycles FIV/ICSI naturels modifiés.

Le rôle du G-CSF au niveau du follicule est encore mal connu. Il a été trouvé comme biomarqueur potentiel parmi 27 molécules dosées mais son action est indéterminée. Depuis longtemps, l'ovulation est considérée comme un phénomène inflammatoire (382). Actuellement, il est proposé que les cellules immunitaires pourraient jouer un rôle dans le déclenchement de l'ovulation par invasion de la thèque externe et par la sécrétion de protéases qui dégraderaient la mur folliculaire et permettrait sa rupture et la libération de l'ovocyte (139). Il a été proposé que le G-CSF pourrait recruter des leucocytes dans la thèque externe pour accélérer le mécanisme d'ovulation (383), notamment parce qu'il y a une augmentation progressive de G-CSF durant la phase folliculaire jusqu'au moment de l'ovulation où il atteint sa concentration maximale (363, 383–385). Il y a également une augmentation significative de G-CSF et de globules blancs chez les patientes stimulées en FIV parallèlement à cette stimulation (386).

5.3 Le dialogue entre la LH blastocyttaire et le LHR endométrial murin

Différents articles ont montré que l'hCG avait un rôle important à jouer dans l'implantation de l'embryon (248, 255, 323), or cette hormone est sécrétée spécifiquement par les embryons des grands primates. Une hormone semblable est sécrétée par l'embryon équin, appelée eCG. Pour des raisons éthiques évidentes, il est difficile d'aller étudier l'implantation embryonnaire humaine chez des patientes au niveau moléculaire. Le modèle animal le plus utilisé actuellement est la souris, or il n'existe pas d'hCG chez la souris. Notre hypothèse de départ était donc que si une molécule avec une action semblable à l'hCG lors de l'implantation existe, elle pouvait être structurellement proche de la LH puisqu'elle partage le même récepteur que l'hCG.

Dans ce travail, il a été montré que le blastocyste murin exprime le gène *Lh* et produit un signal LH bioactif qui pourrait interagir avec son récepteur LHCGR endométrial. Par ce biais, l'embryon pourrait contribuer activement au processus de son implantation. Cette LH pourrait avoir des actions semblables à l'hCG lors de l'implantation. Il serait intéressant d'étudier cette LH au niveau moléculaire

pour voir s'il y a des différences dans sa configuration ou dans sa glycosylation avec de la LH classique. En effet, l'hCG hyperglycosylée est de plus en plus souvent mise en évidence comme ayant un rôle différent de l'hCG classique (329).

L'évolution de l'implantation embryonnaire et du système immunitaire sont étroitement liés (387). Il est intéressant de comprendre d'où viennent nos gènes et nos protéines pour comprendre les dysfonctions de ces protéines en cas de mutation (318). Le gène du LHCGR évolue à travers les espèces. Il présente 11 exons dans les espèces inférieures et il y a l'introduction d'un exon 6A dans ce gène chez les primates, induisant la formation d'un récepteur LHCGR modifié qui contient alors 12 exons. Selon l'hypothèse de Troppmann, le système LHCGR/hCG/LH est en évolution dynamique et il existerait différentes formes du LHCGR (302). Il serait intéressant d'étudier ces différentes formes du LHCGR ainsi que leur expression et leur mode d'actions qui pourraient être différentes en fonction des tissus et de l'hormone qui se lierait à eux (la LH ou l'hCG) (388).

L'équipe de Zenclussen, spécialisée dans l'implication de l'hCG sur l'immunotolérance de l'endomètre, s'est intéressée à l'action de la LH sur cette immunotolérance chez la souris (295). Ils ont démontré que l'application de la LH diminue le nombre de fausses couches dans un modèle de souris connu pour ses fausses couches liées à des troubles immunologiques (389). Le blastocyste murin pourrait donc induire sa propre tolérance immunitaire maternelle par la sécrétion de LH avant son implantation dans l'endomètre. Dans le même sens, citons un article réalisant une méta-analyse montrant que l'application de LH durant des techniques de PMA peut améliorer la fécondation, l'implantation et le taux de grossesse clinique chez des patientes d'un âge reproductif avancé (299).

Perspectives

6.1 L'intérêt de la mesure du G-CSF folliculaire

La **validation du G-CSF** en tant que marqueur prédictif de l'implantation embryonnaire en clinique humaine requiert plusieurs étapes additionnelles :

1. Une standardisation des techniques de prélèvement ovocytaire en FIV doit permettre une meilleure comparaison des données entre les centres de recherche. En effet, selon le matériel utilisé, la longueur des aiguilles et des cathéters, le volume d'espace mort rempli de liquide de culture varie et cette variation influence donc de manière considérable le volume du liquide folliculaire, introduisant une erreur, d'autant plus élevée que ce volume est important ou que le médecin rince le follicule aspiré à l'aide d'un flushing.
2. Il importe de tester la valeur de ce marqueur de manière prospective et randomisée, en conditions réelles réalisées chez des populations distinctes de femmes stériles (<36 ans >39 ans, femmes atteintes de PCOS, ou d'endométriose ou d'échecs à répétitions, procédures ICSI, IMSI, ...). Ceci permettra de mieux cerner les groupes pour lesquels ce test est le plus performant.
3. Il sera important de vérifier si la corrélation démontrée entre le taux de G-CSF folliculaire et le potentiel implantatoire au J3 se vérifie lorsque les blastocystes sont transférés au Jour 5 de culture.
4. Il serait essentiel de pouvoir identifier ces embryons au J2 ou au J3 qui ont un maximum de chance de devenir des blastocystes à J5. Cette identification permettrait de réduire la culture *in vitro* source d'artéfacts, et de modifications épigénétiques indésirables.
5. En cas de transfert de plusieurs embryons, il serait possible de prendre en compte le taux de grossesses, le taux de grossesses multiples et le « time to pregnancy » dans le groupe témoin et dans celui où la décision de transfert est basée sur le dosage de G-CSF associé aux critères morphologiques standards.
6. Enfin, il importe d'évaluer les contributions respectives des études morphologiques en time lapse vidéo associées à la mesure du G-CSF

folliculaire. La valeur prédictive du G-CSF peut se révéler un marqueur indépendant ou corrélé aux autres marqueurs prédictifs de l'implantation en cours d'évaluation. Son intérêt en routine clinique dépendra alors de son caractère non redondant ou de la facilité respective d'un dosage ELISA par rapport à un time lapse microscopy. La codification de cet outil clinique potentiel demeure donc un domaine d'avenir et de recherche.

7. Finalement, sur le plan de la biologie cellulaire, il importe de mieux identifier les types cellulaires responsables de la synthèse de G-CSF et ceux qui présentent son récepteur. Son rôle physiologique dans la maturation folliculaire demeure mal codifié. Attraction de leucocytes, cytokine à action immuno-modulatrice locale, régulation d'activités biosynthétiques ovocytaires, induction de la rupture folliculaire, effets à distance sur l'endomètre demeurent autant d'hypothèses émises mais non clairement validées. Ces travaux de biologie cellulaire sont actuellement en cours à l'ULg.

6.2 Le dialogue entre la LH blastocyttaire et le LHR endométrial murin

Pour comprendre l'implication de la LH sécrétée par le blastocyste lors de son implantation embryonnaire, il serait intéressant de poursuivre d'autres études sur le sujet :

1. Il est important de comprendre l'impact de la LH au niveau de l'endomètre lors de l'implantation. Pour ce faire, il faudrait étudier la liaison de cette LH à son récepteur sur des cultures de cellules épithéliales et/ou stromales d'endomètre murin et d'observer les effets que cette LH a sur les cellules de l'endomètre au niveau cellulaire, transcriptionnel et protéique. Il serait notamment possible de réaliser des microhistocultures sur des éponges pour conserver au maximum la morphologie de l'endomètre. Cela permettra de déterminer si ces effets sont les mêmes que ceux observés chez l'être humain ou s'ils présentent des différences.
2. L'action de l'hCG ayant déjà été étudiée chez l'être humain dans des cultures de cellules *in vitro*, il serait intéressant d'observer *in vivo* chez des souris l'influence qu'aurait l'introduction de LH au niveau de la cavité utérine en l'absence d'embryons. Quels sont les recrutements cellulaires *in vivo* dans l'endomètre ? Est-ce que le corps jaune est maintenu par la présence de cette LH ? Quels sont les taux de progestérone dans le sang suite à cette introduction de LH ?
3. Il serait également intéressant d'observer quelles cellules embryonnaires expriment l'ARNm et la protéine de la LH. Cela pourrait être les cellules

de la masse cellulaire interne et/ou les cellules trophoblastiques qui sécrètent cette LH. C'est une expérience qui est difficilement réalisable chez l'être humain pour des raisons éthiques évidentes.

4. Une expérience cruciale qu'il serait intéressant de réaliser serait l'utilisation d'un système Cre/Lox ou l'utilisation d'un système de siRNA pour inactiver l'expression génique du *Lhcgr* au niveau de l'endomètre. Ceci pourrait définitivement élucider la controverse autour de l'importance du dialogue LH/LHCGR au moment de l'implantation embryonnaire.
5. Suite aux travaux de Cole (390), il a été démontré qu'il existait différents types d'hCG tels que l'hCG hyperglycosylée, l'hCG sulfatée, la sous-unité β libre de l'hCG qui pouvaient avoir des modes actions différents de l'hCG classique. Par des études de chromatographie, il serait possible d'étudier la LH sécrétée par les embryons murins aux différents jours de développement pour déterminer si cette LH présente des glycosylations différentes en fonction des différents jours ou si elle garde la même conformation en permanence.
6. Il est maintenant établi que chez la souris, chez le cheval, chez les primates et chez l'être humain, il y a une molécule proche de l'hCG sécrétée par l'embryon qui interagit avec son récepteur pour permettre l'implantation embryonnaire. Est-ce qu'il en est de même chez tous les autres mammifères réalisant une implantation embryonnaire ? Autrement, au niveau de l'évolution des espèces, à partir de quand est-ce qu'une telle molécule est apparue ? Existe-t-elle depuis qu'il y a une implantation embryonnaire ou est-elle apparue plus tard ?

Conclusion générale

L'implantation du blastocyste requiert un embryon compétent – formé par la fécondation d'un ovocyte de qualité avec un spermatozoïde apte – capable de dialoguer avec un endomètre réceptif. Les échecs d'implantation et d'autres pathologies de la grossesse sont associés à un défaut de ce dialogue ou à une non-compétence d'un de ces acteurs. Les taux d'implantation en traitement FIV bénéficient de la recherche dans ces différents domaines, capables d'augmenter la sélection, le diagnostic ou le traitement de ces différents acteurs de l'implantation et de leur interaction. Dans ce travail, nous avons confirmé l'utilisation d'un biomarqueur diagnostique de la qualité ovocytaire et améliorer la connaissance du modèle murin pour l'étude du mystère qu'est l'implantation embryonnaire.

Bibliographie

1. J. E. Cartwright, R. Fraser, K. Leslie, A. E. Wallace, J. L. James, Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders. *Reproduction*. **140**, 803–813 (2010).
2. P. Díaz-Gimeno, M. Ruíz-Alonso, D. Blesa, C. Simón, Transcriptomics of the human endometrium. *Int. J. Dev. Biol.* **58**, 127–137 (2014).
3. M. Singh, P. Chaudhry, E. Asselin, Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors. *J Endocrinol.* **210**, 5–14 (2011).
4. O. Berlanga, H. B. Bradshaw, F. Vilella-Mitjana, T. Garrido-Gomez, C. Simon, How endometrial secretomics can help in predicting implantation. *Placenta*. **32 Suppl 3**, S271–5 (2011).
5. N. A. Rashid, S. Lalitkumar, P. G. Lalitkumar, K. Gemzell-Danielsson, Endometrial receptivity and human embryo implantation. *Am J Reprod Immunol.* **66 Suppl 1**, 23–30 (2011).
6. N. Ledee *et al.*, Cytokines and chemokines in follicular fluids and potential of the corresponding embryo: the role of granulocyte colony-stimulating factor. *Hum Reprod.* **23**, 2001–2009 (2008).
7. N. Lédée *et al.*, Endometrial vascularity by three-dimensional power Doppler ultrasound and cytokines: a complementary approach to assess uterine receptivity. *J. Reprod. Immunol.* **77**, 57–62 (2008).
8. F. Boitrelle *et al.*, Large human sperm vacuoles observed in motile spermatozoa under high magnification: nuclear thumbprints linked to failure of chromatin condensation. *Hum Reprod.* **26**, 1650–1658 (2011).
9. M. Tavalaei, S. Razavi, M. H. Nasr-Esfahani, Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril.* **91**, 1119–1126 (2009).
10. A. Kashiwagi *et al.*, The postimplantation embryo differentially regulates endometrial gene expression and decidualization. *Endocrinology.* **148**, 4173–4184 (2007).
11. S. Bauersachs *et al.*, The endometrium responds differently to cloned versus fertilized embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 5681–5686 (2009).
12. S. A. Robertson, P. Y. Chin, D. J. Glynn, J. G. Thompson, Peri-conceptual cytokines—setting the trajectory for embryo implantation, pregnancy and beyond. *Am J Reprod Immunol.* **66 Suppl 1**, 2–10 (2011).
13. E. Marieb, *Anatomie et physiologie humaine* (1999).
14. J. Dean, Oocyte-specific genes regulate follicle formation, fertility and early mouse development. *J. Reprod. Immunol.* **53**, 171–80 (2002).
15. Larsen, Schoenwolf, Bleyl, Brauer, Francis-West, *Embryologie humaine* (De Boeck., 2003).
16. L. Wolpert, *Biologie du développement : Les grands principes* (Broché., 2004).
17. C. A. Gray *et al.*, Developmental biology of uterine glands. *Biol. Reprod.* **65**, 1311–23 (2001).
18. C. L. Stewart *et al.*, Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature.* **359**, 76–9 (1992).
19. J. Filant, T. E. Spencer, Uterine glands: biological roles in conceptus implantation, uterine receptivity and decidualization. *Int. J. Dev. Biol.* **58**, 107–16 (2014).
20. H. L. Franco *et al.*, WNT4 is a key regulator of normal postnatal uterine development and progesterone signaling during embryo implantation and decidualization in the mouse. *FASEB J.* **25**, 1176–87 (2011).
21. J.-W. Jeong *et al.*, beta-catenin mediates glandular formation and dysregulation of beta-catenin induces hyperplasia formation in the murine uterus. *Oncogene.* **28**, 31–40 (2009).
22. J.-W. Jeong *et al.*, Foxa2 is essential for mouse endometrial gland development and fertility. *Biol. Reprod.* **83**, 396–403 (2010).

23. C. Dennis, Brain development: the most important sexual organ. *Nature*. **427**, 390–392 (2004).
24. I. J. Clarke, H. C. Parkington, Gonadotropin inhibitory hormone (GnIH) as a regulator of gonadotropes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **385**, 36–44 (2014).
25. R. Depalo *et al.*, GnRH agonist versus GnRH antagonist in in vitro fertilization and embryo transfer (IVF/ET). *Reprod. Biol. Endocrinol.* **10**, 26 (2012).
26. P. Vrtačnik, B. Ostanek, S. Mencej-Bedrač, J. Marc, The many faces of estrogen signaling. *Biochem. medica.* **24**, 329–42 (2014).
27. D. J. Mangelsdorf *et al.*, The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. **83**, 835–9 (1995).
28. M. Robinson-Rechavi, H. Escriva Garcia, V. Laudet, The nuclear receptor superfamily. *J. Cell Sci.* **116**, 585–6 (2003).
29. M. Beato, Gene regulation by steroid hormones. *Cell*. **56**, 335–44 (1989).
30. L. Klein-Hitpass *et al.*, The progesterone receptor stimulates cell-free transcription by enhancing the formation of a stable preinitiation complex. *Cell*. **60**, 247–57 (1990).
31. M. J. Tsai, B. W. O'Malley, Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 451–86 (1994).
32. N. J. McKenna, R. B. Lanz, B. W. O'Malley, Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr. Rev.* **20**, 321–44 (1999).
33. J. K. Richer *et al.*, Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 5209–18 (2002).
34. E. Kalkhoven, S. Wissink, P. T. van der Saag, B. van der Burg, Negative interaction between the RelA(p65) subunit of NF-kappaB and the progesterone receptor. *J. Biol. Chem.* **271**, 6217–24 (1996).
35. A. M. Bamberger, C. M. Bamberger, B. Gellersen, H. M. Schulte, Modulation of AP-1 activity by the human progesterone receptor in endometrial adenocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 6169–74 (1996).
36. J. J. Kim, O. L. Buzzio, S. Li, Z. Lu, Role of FOXO1A in the regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 in human endometrial cells: interaction with progesterone receptor. *Biol. Reprod.* **73**, 833–9 (2005).
37. A. Migliaccio *et al.*, Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J.* **17**, 2008–2018 (1998).
38. V. Boonyaratanakornkit *et al.*, Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol. Cell.* **8**, 269–80 (2001).
39. M. E. Meyer *et al.*, Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function. *Cell*. **57**, 433–42 (1989).
40. M. E. Meyer, C. Quirin-Stricker, T. Lerouge, M. T. Bocquel, H. Gronemeyer, A limiting factor mediates the differential activation of promoters by the human progesterone receptor isoforms. *J. Biol. Chem.* **267**, 10882–7 (1992).
41. P. Kastner *et al.*, Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* **9**, 1603–14 (1990).
42. H. Gronemeyer *et al.*, Progestin receptors: isoforms and antihormone action. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **40**, 271–8 (1991).
43. E. Vegeto *et al.*, Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol. Endocrinol.* **7**, 1244–55 (1993).
44. D. P. Edwards, The role of coactivators and corepressors in the biology and mechanism of action of steroid hormone receptors. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* **5**, 307–24 (2000).
45. M. J. Tetel, P. H. Giangrande, S. A. Leonhardt, D. P. McDonnell, D. P. Edwards, Hormone-dependent interaction between the amino- and carboxyl-terminal domains of progesterone receptor in vitro and in vivo. *Mol. Endocrinol.* **13**, 910–24 (1999).
46. J. D. Graham, C. L. Clarke, Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.* **18**, 502–19 (1997).

47. M. Wetendorf, F. J. DeMayo, The progesterone receptor regulates implantation, decidualization, and glandular development via a complex paracrine signaling network. *Mol Cell Endocrinol.* **357**, 108–118 (2012).
48. C. L. Sentman, S. K. Meadows, C. R. Wira, M. Eriksson, Recruitment of uterine NK cells: induction of CXC chemokine ligands 10 and 11 in human endometrium by estradiol and progesterone. *J Immunol.* **173**, 6760–6766 (2004).
49. L. M. Goddard *et al.*, Progesterone receptor in the vascular endothelium triggers physiological uterine permeability preimplantation. *Cell.* **156**, 549–562 (2014).
50. P. Frachimont, S. Chari, M. T. Hagelstein, S. Duraiswami, Existence of a follicle-stimulating hormone inhibiting factor "inhibin" in bull seminal plasma. *Nature.* **257**, 402–4 (1975).
51. D. M. de Kretser, M. P. Hedger, K. L. Loveland, D. J. Phillips, Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Hum. Reprod. Update.* **8**, 529–41.
52. R. R. González *et al.*, Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 4883–4888 (2000).
53. L. C. Schulz, E. P. Widmaier, The effect of leptin on mouse trophoblast cell invasion. *Biol Reprod.* **71**, 1963–1967 (2004).
54. L. C. Schulz, E. P. Widmaier, J. Qiu, R. M. Roberts, Effect of leptin on mouse trophoblast giant cells. *Biol Reprod.* **80**, 415–424 (2009).
55. M. P. Ramos, B. R. Rueda, P. C. Leavis, R. R. Gonzalez, Leptin serves as an upstream activator of an obligatory signaling cascade in the embryo-implantation process. *Endocrinology.* **146**, 694–701 (2005).
56. M. Herrid *et al.*, An updated view of leptin on implantation and pregnancy: a review. *Physiol Res* (2014) (available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24908087>).
57. J. A. Cioffi *et al.*, The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol Hum Reprod.* **3**, 467–472 (1997).
58. C. Karlsson *et al.*, Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab.* **82**, 4144–4148 (1997).
59. C. S. Mantzoros, Role of leptin in reproduction. *Ann N Y Acad Sci.* **900**, 174–183 (2000).
60. I. E. Messinis, C. I. Messini, K. Dafopoulos, Novel aspects of the endocrinology of the menstrual cycle. *Reprod. Biomed. Online.* **28**, 714–22 (2014).
61. C. A. Finn, L. Martin, The control of implantation. *J Reprod Fertil.* **39**, 195–206 (1974).
62. Q. Li *et al.*, The antiproliferative action of progesterone in uterine epithelium is mediated by Hand2. *Science.* **331**, 912–6 (2011).
63. J. J. Kim, T. Kurita, S. E. Bulun, Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. *Endocr. Rev.* **34**, 130–62 (2013).
64. D. Chung, S. K. Das, Mouse primary uterine cell coculture system revisited: ovarian hormones mimic the aspects of in vivo uterine cell proliferation. *Endocrinology.* **152**, 3246–58 (2011).
65. W. Winuthayanon, S. C. Hewitt, G. D. Orvis, R. R. Behringer, K. S. Korach, Uterine epithelial estrogen receptor α is dispensable for proliferation but essential for complete biological and biochemical responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 19272–7 (2010).
66. S. L. Young, Oestrogen and progesterone action on endometrium: a translational approach to understanding endometrial receptivity. *Reprod. Biomed. Online.* **27**, 497–505 (2013).
67. E. Allen, The oestrous cycle in the mouse. *Am. J. Anat.* **30**, 297–371 (1922).
68. A. K. Champlin, D. L. Dorr, A. H. Gates, Determining the Mouse the Stage by the of the Estrous Cycle in Appearance of the Vagina mice. *Biol. Reprod.* **8**, 191–194 (1973).
69. E. Knobil, J. D. Neill, *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Volume 1* (Gulf Professional Publishing, 2006; <https://books.google.com/books?id=6j-mOAcNnPUc&pgis=1>).

70. I. E. Messinis, A. A. Templeton, Effects of supraphysiological concentrations of progesterone on the characteristics of the oestradiol-induced gonadotrophin surge in women. *J. Reprod. Fertil.* **88**, 513–9 (1990).
71. A. Zavos *et al.*, The progesterone positive feedback effect in women after ovariectomy. *Gynecol. Endocrinol.* **29**, 254–8 (2013).
72. H. Zhu, C.-C. Hou, L.-F. Luo, Y.-J. Hu, W.-X. Yang, Endometrial stromal cells and decidualized stromal cells: origins, transformation and functions. *Gene.* **551**, 1–14 (2014).
73. H. Wang, S. K. Dey, Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 185–99 (2006).
74. T. Strowitzki, A. Germeyer, R. Popovici, M. von Wolff, The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Updat.* **12**, 617–630 (2006).
75. W. Ma, H. Song, S. K. Das, B. C. Paria, S. K. Dey, Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 2963–8 (2003).
76. G. Nikas *et al.*, Uterine pinopodes as markers of the “nidation window” in cycling women receiving exogenous oestradiol and progesterone. *Hum. Reprod.* **10**, 1208–13 (1995).
77. H. Achache, A. Revel, Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Updat.* **12**, 731–746 (2006).
78. R. J. Paulson, Hormonal induction of endometrial receptivity. *Fertil Steril.* **96**, 530–535 (2011).
79. A. Phillips *et al.*, Inhibition of pregnancy before and after implantation in rats with monoclonal antibody against progesterone. *Contraception.* **38**, 109–16 (1988).
80. K. Gemzell-Danielsson, M. L. Swahn, P. Svalander, M. Bygdeman, Early luteal phase treatment with mifepristone (RU 486) for fertility regulation. *Hum. Reprod.* **8**, 870–3 (1993).
81. R. W. Noyes, A. T. Hertig, J. Rock, Dating the endometrial biopsy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **122**, 262–3 (1975).
82. C. Coutifaris *et al.*, Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status. *Fertil. Steril.* **82**, 1264–72 (2004).
83. M. J. Murray *et al.*, A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. *Fertil. Steril.* **81**, 1333–1343 (2004).
84. B. A. Lessey, Assessment of endometrial receptivity. *Fertil Steril.* **96**, 522–529 (2011).
85. N. Lédée *et al.*, Uterine receptivity and cytokines: new concepts and new applications. *Gynecol. Obstet. Invest.* **64**, 138–43 (2007).
86. P. Díaz-Gimeno *et al.*, The accuracy and reproducibility of the endometrial receptivity array is superior to histology as a diagnostic method for endometrial receptivity. *Fertil. Steril.* **99**, 508–517 (2013).
87. J. A. Horcajadas, P. Díaz-Gimeno, A. Pellicer, C. Simón, Uterine receptivity and the ramifications of ovarian stimulation on endometrial function. *Semin. Reprod. Med.* **25**, 454–60 (2007).
88. P. Diaz-Gimeno *et al.*, A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil Steril.* **95**, 50–60, 60 e1–15 (2011).
89. Y. Cheong, C. Boomsma, C. Heijnen, N. MacKlon, Uterine secretomics: A window on the maternal-embryo interface. *Fertil. Steril.* **99**, 1093–1099 (2013).
90. F. Vilella, L. B. Ramirez, C. Simon, Lipidomics as an emerging tool to predict endometrial receptivity. *Fertil Steril.* **99**, 1100–1106 (2013).
91. A. Revel, Defective endometrial receptivity. *Fertil Steril.* **97**, 1028–1032 (2012).
92. N. Lédée *et al.*, Specific and extensive endometrial deregulation is present before conception in IVF/ICSI repeated implantation failures (IF) or recurrent miscarriages. *J. Pathol.* **225**, 554–64 (2011).
93. J. E. Markee, Menstruation in intraocular endometrial transplants in the Rhesus monkey. *Am J Obs. Gynecol.* **131**, 558–559 (1978).
94. J. Song, T. Rutherford, F. Naftalin, S. Brown, G. Mor, Hormonal regulation of apoptosis and the Fas and Fas ligand system in human endometrial cells. *Mol Hum Reprod.* **8**, 447–455 (2002).

95. P. Coudyzer *et al.*, Hypoxia is not required for human endometrial breakdown or repair in a xenograft model of menstruation. *FASEB J.* **27**, 3711–3719 (2013).
96. M. Johnson, B. Everitt, *Essential Reproduction* (5th ed. Ox., 2000).
97. P. M. Motta, S. Makabe, S. A. Nottola, The ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Hum Reprod Updat.* **3**, 281–295 (1997).
98. P. M. Motta, S. A. Nottola, S. Makabe, Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development. *Eur J Obs. Gynecol Reprod Biol.* **75**, 5–10 (1997).
99. I. Virant-Klun, Postnatal oogenesis in humans: a review of recent findings. *Stem Cells Cloning.* **8**, 49–60 (2015).
100. A. Bukovsky, M. Svetlikova, M. R. Caudle, Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **3**, 17 (2005).
101. I. Virant-Klun *et al.*, Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. *Differentiation.* **76**, 843–856 (2008).
102. L. M. Mehlmann, Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction.* **130**, 791–799 (2005).
103. S. Vaccari, K. Horner, L. M. Mehlmann, M. Conti, Generation of mouse oocytes defective in cAMP synthesis and degradation: endogenous cyclic AMP is essential for meiotic arrest. *Dev Biol.* **316**, 124–134 (2008).
104. D. F. Albertini, C. M. H. Combelles, E. Benecchi, M. J. Carabatsos, Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction.* **121**, 647–653 (2001).
105. J. Poulton, D. R. Marchington, Segregation of mitochondrial DNA (mtDNA) in human oocytes and in animal models of mtDNA disease: clinical implications. *Reproduction.* **123**, 751–755 (2002).
106. J. Pozo, E. Corral, J. Pereda, Subcellular structure of prenatal human ovary: mitochondrial distribution during meiotic prophase. *J Submicrosc Cytol Pathol.* **22**, 601–607 (1990).
107. O. Epifano, J. Dean, Biology and structure of the zona pellucida: a target for immunocontraception. *Reprod Fertil Dev.* **6**, 319–330 (1994).
108. R. De La Fuente, J. J. Eppig, Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. *Dev Biol.* **229**, 224–236 (2001).
109. R. H. Liu *et al.*, Extracellular and intracellular factors affecting nuclear and cytoplasmic maturation of porcine oocytes collected from different sizes of follicles. *Zygote.* **10**, 253–260 (2002).
110. A. Gougeon, D. Busso, Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.* **163**, 33–42 (2000).
111. M. Sullivan, a Stewartakers, J. Krasnow, S. Berga, a Zeleznik, Ovarian responses in women to recombinant follicle stimulating hormone (r-hFSH) and luteinizing hormone (r-hLH): Maintenance of the final stages of follicular development by r-hLH. *J. Soc. Gynecol. Investig.* **5**, 57A–57A (1998).
112. H. M. Fraser, Regulation of the ovarian follicular vasculature. *Reprod Biol Endocrinol.* **4**, 18 (2006).
113. A. J. Hsueh, H. Billig, A. Tsafiriri, Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev.* **15**, 707–724 (1994).
114. J. K. Pru, J. L. Tilly, Programmed cell death in the ovary: insights and future prospects using genetic technologies. *Mol. Endocrinol.* **15**, 845–853 (2001).
115. N. Manabe *et al.*, Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. *J. Reprod. Dev.* **50**, 493–514 (2004).
116. H. Kondo, T. Maruo, X. Peng, M. Mochizuki, Immunological evidence for the expression of the Fas antigen in the infant and adult human ovary during follicular regression and atresia. *J Clin Endocrinol Metab.* **81**, 2702–2710 (1996).

117. N. Hakuno *et al.*, Fas/APO-1/CD95 system as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. *Endocrinology*. **137**, 1938–1948 (1996).
118. M. L. Hennet, C. M. H. Combelles, The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *Int J Dev Biol*. **56**, 819–831 (2012).
119. A. Revelli *et al.*, Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol*. **7**, 40 (2009).
120. C. M. H. Combelles, E. a. Holick, L. J. Paoletta, D. C. Walker, Q. Wu, Profiling of superoxide dismutase isoenzymes in compartments of the developing bovine antral follicles. *Reproduction*. **139**, 871–881 (2010).
121. H. Tamura *et al.*, Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res*. **44**, 280–287 (2008).
122. S. Fahiminiya, V. Labas, S. Roche, J. L. Dacheux, N. Gerard, Proteomic analysis of mare follicular fluid during late follicle development. *Proteome Sci*. **9**, 54 (2011).
123. K. Jarkovska *et al.*, Development of ovarian hyperstimulation syndrome: interrogation of key proteins and biological processes in human follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization. *Mol Hum Reprod*. **17**, 679–692 (2011).
124. S. C. Laws, J. C. Webster, W. L. Miller, Estradiol alters the effectiveness of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in ovine pituitary cultures: GnRH receptors versus responsiveness to GnRH. *Endocrinology*. **127**, 381–6 (1990).
125. D. R. Danforth, K. Elkind-Hirsch, G. D. Hodgen, In vivo and in vitro modulation of gonadotropin-releasing hormone metabolism by estradiol and progesterone. *Endocrinology*. **127**, 319–24 (1990).
126. M. K. Clements *et al.*, FMRFamide-related neuropeptides are agonists of the orphan G-protein-coupled receptor GPR54. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **284**, 1189–93 (2001).
127. M. Kotani *et al.*, The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J. Biol. Chem*. **276**, 34631–6 (2001).
128. S. Hameed, C. N. Jayasena, W. S. Dhillon, Kisspeptin and fertility. *J. Endocrinol*. **208**, 97–105 (2011).
129. A. K. Roseweir, R. P. Millar, The role of kisspeptin in the control of gonadotrophin secretion. *Hum. Reprod. Update*. **15**, 203–212 (2008).
130. I. Dedes, Kisspeptins and the control of gonadotrophin secretion. *Syst. Biol. Reprod. Med*. **58**, 121–8 (2012).
131. L. Pinilla, E. Aguilar, C. Dieguez, R. P. Millar, M. Tena-Sempere, Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol. Rev*. **92**, 1235–316 (2012).
132. M. S. Irwig *et al.*, Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*. **80**, 264–72 (2004).
133. J. T. Smith, M. J. Cunningham, E. F. Rissman, D. K. Clifton, R. A. Steiner, Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*. **146**, 3686–92 (2005).
134. A. N. Comninos *et al.*, Kisspeptin signaling in the amygdala modulates reproductive hormone secretion. *Brain Struct. Funct.* (2015), doi:10.1007/s00429-015-1024-9.
135. C. Izzì-Engbeaya, K. Meeran, W. S. Dhillon, Kisspeptin is providing new insights into the control of reproduction. *Clin. Med*. **13**, 547–8 (2013).
136. J. S. Richards, Genetics of ovulation. *Semin Reprod Med*. **25**, 235–242 (2007).
137. L. L. Espey, H. Lipner, Measurements of Intrafollicular Pressures in the Rabbit Ovary. *Am J Physiol*. **205**, 1067–1072 (1963).
138. R. J. Blandau, R. E. Rumery, Measurements of intrafollicular pressure in ovulatory and preovulatory follicles of the rat. *Fertil Steril*. **14**, 330–341 (1963).
139. O. R. Oakley *et al.*, Periovarian leukocyte infiltration in the rat ovary. *Endocrinology*. **151**, 4551–9 (2010).
140. L. K. Akison, R. L. Robker, The critical roles of progesterone receptor (PGR) in ovulation, oocyte developmental competence and oviductal transport in mammalian reproduction. *Reprod Domest Anim*. **47 Suppl 4**, 288–296 (2012).

141. L. Rienzi, G. Vajta, F. Ubaldi, Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Hum Reprod Updat.* **17**, 34–45 (2011).
142. B. Balaban, B. Urman, Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod. Biomed. Online.* **12**, 608–15 (2006).
143. K. Lasiene, A. Vitkus, A. Valanciute, V. Lasys, Morphological criteria of oocyte quality. *Med.* **45**, 509–515 (2009).
144. V. Gridelet *et al.*, in *Embryology - Updates and Highlights on Classic Topics* (InTech., 2012), pp. Chapitre 5, 85–126.
145. P. Fancsovsits *et al.*, Correlation between first polar body morphology and further embryo development. *Acta Biol Hung.* **57**, 331–338 (2006).
146. P. A. Navarro *et al.*, Relationship between first polar body morphology before intracytoplasmic sperm injection and fertilization rate, cleavage rate, and embryo quality. *Int J Gynaecol Obs.* **104**, 226–229 (2009).
147. A. Yanaihara *et al.*, High concentrations of lactoferrin in the follicular fluid correlate with embryo quality during in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril.* **87**, 279–282 (2007).
148. G. De Placido *et al.*, Intra-follicular leptin concentration as a predictive factor for in vitro oocyte fertilization in assisted reproductive techniques. *J Endocrinol Invest.* **29**, 719–726 (2006).
149. R. Mashlach *et al.*, Follicular fluid levels of anti-Mullerian hormone as a predictor of oocyte maturation, fertilization rate, and embryonic development in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* **93**, 2299–2302 (2010).
150. T. H. Wang *et al.*, Insulin-like growth factor-II (IGF-II), IGF-binding protein-3 (IGFBP-3), and IGFBP-4 in follicular fluid are associated with oocyte maturation and embryo development. *Fertil Steril.* **86**, 1392–1401 (2006).
151. L. Li, M. Ferin, M. V Sauer, R. A. Lobo, Serum and follicular fluid ghrelin levels negatively reflect human oocyte quality and in vitro embryo development. *Fertil Steril.* **96**, 1116–1120 (2011).
152. R. M. Schultz, From egg to embryo: a peripatetic journey. *Reproduction.* **130**, 825–828 (2005).
153. G. N. Corry, B. Tanasijevic, E. R. Barry, W. Krueger, T. P. Rasmussen, Epigenetic regulatory mechanisms during preimplantation development. *Birth Defects Res C Embryo Today.* **87**, 297–313 (2009).
154. R. M. Schultz, The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum Reprod Updat.* **8**, 323–331 (2002).
155. R. Urrego, N. Rodriguez-Osorio, H. Niemann, Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. *Epigenetics.* **9**, 803–15 (2014).
156. L. Petrusa, H. Van de Velde, M. De Rycke, Dynamic regulation of DNA methyltransferases in human oocytes and preimplantation embryos after assisted reproductive technologies. *Mol. Hum. Reprod.* **20**, 861–74 (2014).
157. B. F. Hales, L. Grenier, C. Lalancette, B. Robaire, Epigenetic programming: from gametes to blastocyst. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* **91**, 652–665 (2011).
158. C. De Paepe, M. Krivega, G. Cauffman, M. Geens, H. Van De Velde, Totipotency and lineage segregation in the human embryo. **20**, 599–618 (2014).
159. H. Van De Velde, G. Cauffman, H. Tournaye, P. Devroey, I. Liebaers, The four blastomeres of a 4-cell stage human embryo are able to develop individually into blastocysts with inner cell mass and trophectoderm. **23**, 1742–1747 (2008).
160. C. De Paepe *et al.*, Human trophectoderm cells are not yet committed. **28**, 740–749 (2013).
161. M. T. McMaster *et al.*, Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J. Immunol.* **154**, 3771–3778 (1995).
162. R. Rizzo, M. Vercammen, V. Rebmann, The importance of HLA-G expression in embryos , trophoblast cells , and embryonic stem cells. 341–352 (2011).
163. C. A. Strott, T. Yoshimi, G. T. Ross, M. B. Lipsett, Ovarian physiology: relationship between plasma LH and steroidogenesis by the follicle and corpus luteum; effect of HCG. *J Clin Endocrinol Metab.* **29**, 1157–1167 (1969).

164. D. Glujovsky, D. Blake, C. Farquhar, A. Bardach, Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev.* **7**, CD002118 (2012).
165. E. G. Papanikolaou *et al.*, Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* **23**, 91–99 (2008).
166. J. Holte *et al.*, Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for implantation potential of embryos scored and transferred on day 2 after oocyte retrieval. *Hum Reprod.* **22**, 548–557 (2007).
167. C. Racowsky *et al.*, Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability. *Reprod Biomed Online.* **6**, 323–331 (2003).
168. G. M. Jones, A. O. Trounson, N. Lolatgis, C. Wood, Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril.* **70**, 1022–1029 (1998).
169. M. Alikani *et al.*, Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril.* **71**, 836–842 (1999).
170. A. Jurisicova, S. Varmuza, R. F. Casper, Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod.* **2**, 93–98 (1996).
171. G. I. Perez, X. J. Tao, J. L. Tilly, Fragmentation and death (a.k.a. apoptosis) of ovulated oocytes. *Mol Hum Reprod.* **5**, 414–420 (1999).
172. H. J. Chi, J. J. Koo, S. Y. Choi, H. J. Jeong, S. I. Roh, Fragmentation of embryos is associated with both necrosis and apoptosis. *Fertil Steril.* **96**, 187–192 (2011).
173. F. Pellestor, A. Girardet, B. Andreo, F. Arnal, C. Humeau, Relationship between morphology and chromosomal constitution in human preimplantation embryo. *Mol Reprod Dev.* **39**, 141–146 (1994).
174. V. Y. Fujimoto, R. W. Browne, M. S. Bloom, D. Sakkas, M. Alikani, Pathogenesis, developmental consequences, and clinical correlations of human embryo fragmentation. *Fertil Steril.* **95**, 1197–1204 (2011).
175. S. Ziebe *et al.*, Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* **12**, 1545–1549 (1997).
176. L. Rienzi *et al.*, Significance of morphological attributes of the early embryo. *Reprod Biomed Online.* **10**, 669–681 (2005).
177. C. Giorgetti *et al.*, Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod.* **10**, 2427–2431 (1995).
178. T. Hardarson, C. Hanson, A. Sjogren, K. Lundin, Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod.* **16**, 313–318 (2001).
179. E. Van Royen *et al.*, Multinucleation in cleavage stage embryos. *Hum. Reprod.* **18**, 1062–1069 (2003).
180. P. Saldeen, P. Sundstrom, Nuclear status of four-cell preembryos predicts implantation potential in in vitro fertilization treatment cycles. *Fertil Steril.* **84**, 584–589 (2005).
181. J. Ambroggio *et al.*, Multinucleation of a sibling blastomere on day 2 suggests unsuitability for embryo transfer in IVF-preimplantation genetic screening cycles. *Fertil Steril.* **96**, 856–859 (2011).
182. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum. Reprod.* **26**, 1270–83 (2011).
183. G. Cauffman, G. Verheyen, H. Tournaye, H. Van de Velde, Developmental capacity and pregnancy rate of tetrahedral- versus non-tetrahedral-shaped 4-cell stage human embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.* **31**, 427–34 (2014).
184. M. J. De Los Santos *et al.*, A multicenter prospective study to assess the effect of early cleavage on embryo quality, implantation, and live-birth rate. *Fertil Steril.* **101**, 981–987 (2014).
185. H. N. Ciray, Should early cleavage be assessed in routine practice? *Fertil Steril.* **101**, e34 (2014).
186. N. Lédée *et al.*, Impact of follicular G-CSF quantification on subsequent embryo transfer decisions: a proof of concept study. *Hum Reprod.* **28**, 406–413 (2013).

187. M. Meseguer *et al.*, The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod.* **26**, 2658–2671 (2011).
188. S. Hashimoto, N. Kato, K. Saeki, Y. Morimoto, Selection of high-potential embryos by culture in poly(dimethylsiloxane) microwells and time-lapse imaging. *Fertil Steril.* **97**, 332–337 (2012).
189. I. Rubio *et al.*, Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertil. Steril.* **102**, 1287–1294.e5 (2014).
190. F. Guerif *et al.*, Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: a prospective study based on 4042 embryos. *Hum Reprod.* **22**, 1973–1981 (2007).
191. D. J. Kaser, C. Racowsky, Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. *Hum Reprod Updat.* **20**, 617–631 (2014).
192. L. Alter, F. Boitrelle, C. Sifer, Comment sélectionner aujourd'hui le meilleur embryon à transférer ? *Gynécologie Obs. Fertil.* **42**, 515–525 (2014).
193. M. G. Katz-Jaffe, S. McReynolds, D. K. Gardner, W. B. Schoolcraft, The role of proteomics in defining the human embryonic secretome. *Mol Hum Reprod.* **15**, 271–277 (2009).
194. L. Botros, D. Sakkas, E. Seli, Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Mol Hum Reprod.* **14**, 679–690 (2008).
195. D. K. Gardner, P. L. Wale, R. Collins, M. Lane, Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. *Hum Reprod.* **26**, 1981–1986 (2011).
196. E. Seli *et al.*, Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. *Fertil Steril.* **94**, 535–542 (2010).
197. Y. Sasaki, D. G. Ladner, L. A. Cole, Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin and the source of pregnancy failures. *Fertil Steril.* **89**, 1781–1786 (2008).
198. A. J. Wilcox, C. R. Weinberg, D. D. Baird, Risk factors for early pregnancy loss. *Epidemiology.* **1**, 382–5 (1990).
199. L. A. Cole, hCG, the wonder of today's science. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **10**, 24 (2012).
200. A. E. Semprini, G. Simoni, Not so inefficient reproduction. *Lancet.* **356**, 257–258 (2000).
201. E. R. Norwitz *et al.*, Separation of conjoined twins with the twin reversed-arterial-perfusion sequence after prenatal planning with three-dimensional modeling. *N. Engl. J. Med.* **343**, 399–402 (2000).
202. G. a Thouas *et al.*, Soluble Ligands and their Receptors in Human Embryo Development and Implantation. *Endocr. Rev.*, er20141046 (2014).
203. M. Brayman, A. Thathiah, D. D. Carson, MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2**, 4 (2004).
204. O. D. Genbacev *et al.*, Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science.* **299**, 405–8 (2003).
205. B. Gellersen, I. A. Brosens, J. J. Brosens, Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin. Reprod. Med.* **25**, 445–53 (2007).
206. A. Schmidt, D. M. Morales-prieto, J. Pastuschek, K. Fröhlich, U. R. Markert, Only humans have human placentas : molecular differences between mice and humans. *J. Reprod. Immunol.* **108**, 65–71 (2015).
207. Thibault, Levasseur, *La reproduction chez les mammifères et l'homme* (Ellipses., 2011).
208. G. Chaouat, D. A. Clark, Are animal models useful or confusing in understanding the human feto-maternal relationship ? A debate &. *J. Reprod. Immunol.* **108**, 56–64 (2015).

209. J. Brogin Moreli, A. M. Cirino Ruocco, J. M. Vernini, M. V. C. Rudge, I. M. P. Calderon, Interleukin 10 and tumor necrosis factor-alpha in pregnancy: aspects of interest in clinical obstetrics. *ISRN Obstet. Gynecol.* **2012**, 230742 (2012).
210. S. Saito, A. Nakashima, T. Shima, M. Ito, Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **63**, 601–10 (2010).
211. G. Chaouat, The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin. Immunopathol.* **29**, 95–113 (2007).
212. A. M. Bamberger, S. Jenatschke, H. M. Schulte, T. Löning, M. C. Bamberger, Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates the human HLA-G promoter in JEG3 choriocarcinoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 3932–6 (2000).
213. E. Dimitriadis, E. Menkhorst, L. A. Salamonsen, P. Paiva, Review: LIF and IL11 in trophoblast-endometrial interactions during the establishment of pregnancy. *Placenta*. **31 Suppl**, S99–104 (2010).
214. C. Simón *et al.*, Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. *Endocrinology*. **134**, 521–8 (1994).
215. N. Lédée-Bataille *et al.*, Role of the endometrial tripod interleukin-18, -15, and -12 in inadequate uterine receptivity in patients with a history of repeated in vitro fertilization-embryo transfer failure. *Fertil. Steril.* **83**, 598–605 (2005).
216. N. Alfaidy *et al.*, The multiple roles of EG-VEGF/PROK1 in normal and pathological placental angiogenesis. *Biomed Res. Int.* **2014**, 451906 (2014).
217. R. L. Jones, C. Stoikos, J. K. Findlay, L. A. Salamonsen, TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction*. **132**, 217–32 (2006).
218. M. Rahmati *et al.*, Colony Stimulating Factors 1, 2, 3 and early pregnancy steps: from bench to bedside. *J. Reprod. Immunol.* **109**, 1–6 (2015).
219. S. A. Robertson, GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. *Cytokine Growth Factor Rev.* **18**, 287–98.
220. S. Ziebe *et al.*, A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage embryo culture medium for in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* **99**, 1600–1609.e2 (2013).
221. S. Tevkin, V. Lokshin, M. Shishimorova, V. Polumiskov, The frequency of clinical pregnancy and implantation rate after cultivation of embryos in a medium with granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in patients with preceding failed attempts of ART. **3590**, 9–12 (2014).
222. J. Charles A Janeway, P. Travers, M. Walport, M. J. Shlomchik, Immunobiology (2001), (available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10757/>).
223. J. Y. Lee, M. Lee, S. K. Lee, Role of endometrial immune cells in implantation. *Clin. Exp. Reprod. Med.* **38**, 119–25 (2011).
224. G. Chaouat, M. Petitbarat, S. Dubanchet, M. Rahmati, N. Ledée, Tolerance to the foetal allograft? *Am. J. Reprod. Immunol.* **63**, 624–36 (2010).
225. A. King, N. Balendran, P. Wooding, N. P. Carter, Y. W. Loke, CD3- leukocytes present in the human uterus during early placentation: phenotypic and morphologic characterization of the CD56++ population. *Dev. Immunol.* **1**, 169–90 (1991).
226. I. Manaster, O. Mandelboim, The unique properties of human NK cells in the uterine mucosa. *Placenta*. **29 Suppl A**, S60–6 (2008).
227. J. Hanna *et al.*, Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med.* **12**, 1065–1074 (2006).
228. T. Nagamatsu, D. J. Schust, The contribution of macrophages to normal and pathological pregnancies. *Am. J. Reprod. Immunol.* **63**, 460–71 (2010).
229. Y. Sasaki *et al.*, Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol. Hum. Reprod.* **10**, 347–53 (2004).
230. D. A. Clark, G. Chaouat, Regulatory T cells and reproduction : how do they do it ? *J. Reprod. Immunol.* **96**, 1–7 (2012).
231. W.-J. Wang *et al.*, Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *J. Reprod. Immunol.* **84**, 164–70 (2010).

232. P. F. Policastro, S. Daniels-McQueen, G. Carle, I. Boime, A map of the hCG beta-LH beta gene cluster. *J Biol Chem.* **261**, 5907–5916 (1986).
233. L. A. Cole, New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin. *Reprod Biol Endocrinol.* **7**, 8 (2009).
234. T. Fournier, J. Guibourdenche, D. Evain-brion, Review : hCGs : Different sources of production , different glycoforms and functions. *Placenta.* **36**, S60–S65 (2015).
235. A. Jurisicova, M. Antenos, K. Kapasi, J. Meriano, R. F. Casper, Variability in the expression of trophoctodermal markers beta-human chorionic gonadotrophin, human leukocyte antigen-G and pregnancy specific beta-1 glycoprotein by the human blastocyst. *Hum Reprod.* **14**, 1852–1858 (1999).
236. M. L. Bonduelle *et al.*, Chorionic gonadotrophin-beta mRNA, a trophoblast marker, is expressed in human 8-cell embryos derived from tripronucleate zygotes. *Hum Reprod.* **3**, 909–914 (1988).
237. A. Lopata, D. L. Hay, The potential of early human embryos to form blastocysts, hatch from their zona and secrete HCG in culture. *Hum. Reprod.* **4**, 87–94 (1989).
238. M. Hoshina *et al.*, Linkage of human chorionic gonadotrophin and placental lactogen biosynthesis to trophoblast differentiation and tumorigenesis. *Placenta.* **6**, 163–172 (1985).
239. G. D. Braunstein, J. Rasor, H. Danzer, D. Adler, M. E. Wade, Serum human chorionic gonadotropin levels throughout normal pregnancy. *Am J Obs. Gynecol.* **126**, 678–681 (1976).
240. N. Sonoda *et al.*, Expression of variant luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors and degradation of chorionic gonadotropin in human chorionic villous macrophages. *Placenta.* **26**, 298–307 (2005).
241. H. Katabuchi, T. Ohba, Human chorionic villous macrophages as a fetal biological shield from maternal chorionic gonadotropin. *Dev Growth Differ.* **50**, 299–306 (2008).
242. M. Yamaguchi, T. Ohba, H. Tashiro, G. Yamada, H. Katabuchi, Human chorionic gonadotropin induces human macrophages to form intracytoplasmic vacuoles mimicking Hofbauer cells in human chorionic villi. *Cells Tissues Organs.* **197**, 127–135 (2013).
243. Hirose T., Exogenous stimulation of corpus luteum formation in the rabbit: influence of extracts of human placenta, decidua, fetus, hydatid mole, and corpus luteum on the rabbit gonad. *J. Jpn. Gynecol. Soc.* **16**, 1055 (1920).
244. L. A. Cole, hCG and hyperglycosylated hCG in the establishment and evolution of hemochorial placentation. *J Reprod Immunol.* **82**, 112–118 (2009).
245. R. Ohlsson, E. Larsson, O. Nilsson, T. Wahlstrom, P. Sundstrom, Blastocyst implantation precedes induction of insulin-like growth factor II gene expression in human trophoblasts. *Development.* **106**, 555–559 (1989).
246. S. Srisuparp, Z. Strakova, A. T. Fazleabas, The role of chorionic gonadotropin (CG) in blastocyst implantation. *Arch Med Res.* **32**, 627–634 (2001).
247. Z. Strakova *et al.*, In vivo infusion of interleukin-1beta and chorionic gonadotropin induces endometrial changes that mimic early pregnancy events in the baboon. *Endocrinology.* **146**, 4097–104 (2005).
248. S. Perrier d'Hauterive *et al.*, Human chorionic gonadotropin and growth factors at the embryonic-endometrial interface control leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin 6 (IL-6) secretion by human endometrial epithelium. *Hum. Reprod.* **19**, 2633–2643 (2004).
249. Q. J. Shi, Z. M. Lei, C. V Rao, J. Lin, Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology.* **132**, 1387–1395 (1993).
250. R. A. North, R. Whitehead, R. G. Larkins, Stimulation by human chorionic gonadotropin of prostaglandin synthesis by early human placental tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **73**, 60–70 (1991).
251. M. S. Weedon-Fekjaer, K. Tasken, M. S. Weedon-Fekjaer, K. Taskén, Review: Spatiotemporal dynamics of hCG/cAMP signaling and regulation of placental function. *Placenta.* **33 Suppl**, S87–91 (2012).
252. C. L. Lee *et al.*, Human chorionic gonadotropin and its free beta-subunit stimulate trophoblast invasion independent of LH/hCG receptor. *Mol Cell Endocrinol.* **375**, 43–52 (2013).

253. M. Tsampalalas *et al.*, Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. *J Reprod Immunol.* **85**, 93–98 (2010).
254. B. Polese *et al.*, The endocrine milieu and CD4 T-lymphocyte polarization during pregnancy. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **5** (2014).
255. S. Berndt *et al.*, Angiogenic activity of human chorionic gonadotropin through LH receptor activation on endothelial and epithelial cells of the endometrium. *FASEB J.* **20**, 2630–2632 (2006).
256. S. Berndt *et al.*, Chorionic gonadotropin stimulation of angiogenesis and pericyte recruitment. *J Clin Endocrinol Metab.* **94**, 4567–4574 (2009).
257. S. Berndt *et al.*, Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin stimulates angiogenesis through TGF-beta receptor activation. *FASEB J.* **27**, 1309–1321 (2013).
258. F. Herr *et al.*, HCG in the regulation of placental angiogenesis. Results of an in vitro study. *Placenta.* **28 Suppl A**, S85–93 (2007).
259. A. Bourdicé, D. Bedard, C. V Rao, A. Akoum, Human chorionic gonadotropin regulates endothelial cell responsiveness to interleukin 1 and amplifies the cytokine-mediated effect on cell proliferation, migration and the release of angiogenic factors. *Am J Reprod Immunol.* **70**, 127–138 (2013).
260. K. Reisinger, N. Baal, T. McKinnon, K. Munstedt, M. Zygmunt, The gonadotropins: tissue-specific angiogenic factors? *Mol Cell Endocrinol.* **269**, 65–80 (2007).
261. M. Zygmunt *et al.*, Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor. *J Clin Endocrinol Metab.* **87**, 5290–5296 (2002).
262. A. Schanz *et al.*, hCG stimulates angiogenic signals in lymphatic endothelial and circulating angiogenic cells. *J. Reprod. Immunol.* **110**, 102–108 (2015).
263. G. E. Lash, S. C. Robson, J. N. Bulmer, Review: Functional role of uterine natural killer (uNK) cells in human early pregnancy decidua. *Placenta.* **31 Suppl**, S87–92 (2010).
264. S. Yagel, The developmental role of natural killer cells at the fetal-maternal interface. *Am J Obs. Gynecol.* **201**, 344–350 (2009).
265. A. Moffett, F. Colucci, Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface. *J Clin Invest.* **124**, 1872–1879 (2014).
266. A. S. Bansal *et al.*, Mechanism of human chorionic gonadotrophin-mediated immunomodulation in pregnancy. *Expert Rev Clin Immunol.* **8**, 747–753 (2012).
267. N. Kane, R. Kelly, P. T. Saunders, H. O. Critchley, Proliferation of uterine natural killer cells is induced by human chorionic gonadotropin and mediated via the mannose receptor. *Endocrinology.* **150**, 2882–2888 (2009).
268. K. Kosaka *et al.*, Human chorionic gonadotropin (HCG) activates monocytes to produce interleukin-8 via a different pathway from luteinizing hormone/HCG receptor system. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 5199–5208 (2002).
269. H. Wan *et al.*, Chorionic gonadotropin can enhance innate immunity by stimulating macrophage function. *J Leukoc Biol.* **82**, 926–933 (2007).
270. H. Wan *et al.*, Chorionic gonadotropin induces dendritic cells to express a tolerogenic phenotype. *J Leukoc Biol.* **83**, 894–901 (2008).
271. N. Yu *et al.*, HCG-Activated Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) Promote Trophoblast Cell Invasion, 1–12 (2015).
272. E. W. Adcock 3rd *et al.*, Human chorionic gonadotropin: its possible role in maternal lymphocyte suppression. *Science (80-).* **181**, 845–847 (1973).
273. L. Y. Khil *et al.*, Human chorionic gonadotropin is an immune modulator and can prevent autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetologia.* **50**, 2147–2155 (2007).
274. A. Schumacher *et al.*, Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal interface during early human pregnancy. *J Immunol.* **182**, 5488–5497 (2009).
275. A. Schumacher *et al.*, Human chorionic gonadotropin as a central regulator of pregnancy immune tolerance. *J. Immunol.* **190**, 2650–8 (2013).
276. H. Ge *et al.*, Exposure to human chorionic gonadotropin during in vitro maturation does not improve the maturation rate and developmental potential of immature oocytes from patients with polycystic ovary syndrome. **89** (2008), doi:10.1016/j.fertnstert.2007.02.021.
277. C. Ticconi *et al.*, Pregnancy-promoting actions of HCG in human myometrium and fetal membranes. *Placenta.* **28 Suppl A**, S137–43 (2007).

278. J. Evans, L. A. Salamonsen, Too much of a good thing ? Experimental evidence suggests prolonged exposure to hCG is detrimental to endometrial receptivity. **28**, 1610–1619 (2013).
279. L. A. Cole, S. A. Butler, Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin and human chorionic gonadotropin free beta-subunit: tumor markers and tumor promoters. *J Reprod Med.* **53**, 499–512 (2008).
280. J. Guibourdenche *et al.*, Hyperglycosylated hCG is a marker of early human trophoblast invasion. *J Clin Endocrinol Metab.* **95**, E240–4 (2010).
281. A. L. Hamada *et al.*, Transfection of antisense chorionic gonadotropin beta gene into choriocarcinoma cells suppresses the cell proliferation and induces apoptosis. *J Clin Endocrinol Metab.* **90**, 4873–4879 (2005).
282. L. A. Cole, Hyperglycosylated hCG. *Placenta.* **28**, 977–986 (2007).
283. L. A. Cole, D. Dai, S. A. Butler, K. K. Leslie, E. I. Kohorn, Gestational trophoblastic diseases: 1. Pathophysiology of hyperglycosylated hCG. *Gynecol Oncol.* **102**, 145–150 (2006).
284. G. Kovalevskaya, T. Kakuma, J. Schlatterer, J. F. O'Connor, Hyperglycosylated HCG expression in pregnancy: cellular origin and clinical applications. *Mol Cell Endocrinol.* **260-262**, 237–243 (2007).
285. N. A. Bersinger *et al.*, Serum hyperglycosylated human chorionic gonadotropin to predict the gestational outcome in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection pregnancies. *Fetal Diagn Ther.* **24**, 74–78 (2008).
286. S. A. Butler, M. S. Ikram, S. Mathieu, R. K. Iles, The increase in bladder carcinoma cell population induced by the free beta subunit of human chorionic gonadotropin is a result of an anti-apoptosis effect and not cell proliferation. *Br J Cancer.* **82**, 1553–1556 (2000).
287. L. A. Cole, S. Butler, Hyperglycosylated hCG, hCGbeta and Hyperglycosylated hCGbeta: interchangeable cancer promoters. *Mol Cell Endocrinol.* **349**, 232–238 (2012).
288. L. A. Cole, "Background" human chorionic gonadotropin in healthy, nonpregnant women. *Clin Chem.* **51**, 1765–1766 (2005).
289. S. Birken *et al.*, Isolation and characterization of human pituitary chorionic gonadotropin. *Endocrinology.* **137**, 1402–1411 (1996).
290. L. A. Cole, J. M. Gutierrez, Production of human chorionic gonadotropin during the normal menstrual cycle. *J Reprod Med.* **54**, 245–250 (2009).
291. L. A. Cole, L. L. Laidler, C. Y. Muller, USA hCG reference service, 10-year report. *Clin Biochem.* **43**, 1013–1022 (2010).
292. N. J. Joshi, T. D. Nandedkar, Effects of intrauterine instillation of antiserum to hCG during early pregnancy in mice. *Acta Endocrinol.* **107**, 268–274 (1984).
293. J. Choi, J. Smitz, Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: distinguishing unique physiologic roles. *Gynecol. Endocrinol.* **30**, 174–81 (2014).
294. D. Ezcurra, P. Humaidan, A review of luteinising hormone and human chorionic gonadotropin when used in assisted reproductive technology. **12**, 1–12 (2014).
295. A. Schumacher *et al.*, Luteinizing hormone contributes to fetal tolerance by regulating adaptive immune responses. *Am J Reprod Immunol.* **71**, 434–440 (2014).
296. J. Lin *et al.*, Lymphocytes from pregnant women express human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene. *Mol Cell Endocrinol.* **111**, R13–7 (1995).
297. M. J. Van Den Heuvel *et al.*, Menstrual cycle hormones induce changes in functional interactions between lymphocytes and decidual vascular endothelial cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 2835–2842 (2005).
298. M. J. van den Heuvel *et al.*, A review of trafficking and activation of uterine natural killer cells. *Am J Reprod Immunol.* **54**, 322–331 (2005).
299. M. J. Hill *et al.*, The use of recombinant luteinizing hormone in patients undergoing assisted reproductive techniques with advanced reproductive age: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* **97**, 1108–14 e1 (2012).
300. D. Puett, Y. Li, G. DeMars, K. Angelova, F. Fanelli, A functional transmembrane complex: The luteinizing hormone receptor with bound ligand and G protein. *Mol. Cell. Endocrinol.* **260-262**, 126–136 (2007).

301. N. Kossack, M. Simoni, A. Richter-unruh, A. P. N. Themmen, Mutations in a Novel , Cryptic Exon of the Luteinizing Hormone / Chorionic Gonadotropin Receptor Gene Cause Male Pseudohermaphroditism. **5** (2008), doi:10.1371/journal.pmed.0050088.
302. B. Troppmann, G. Kleinau, G. Krause, Structural and functional plasticity of the luteinizing hormone / choriogonadotrophin receptor. **19**, 583–602 (2013).
303. M. Ascoli, D. L. Segaloff, On the structure of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor. *Endocr Rev.* **10**, 27–44 (1989).
304. M. L. Dufau, The luteinizing hormone receptor. *Annu Rev Physiol.* **60**, 461–496 (1998).
305. S. Srisuparp *et al.*, Signal transduction pathways activated by chorionic gonadotropin in the primate endometrial epithelial cells. *Biol Reprod.* **68**, 457–464 (2003).
306. E. Reshef *et al.*, The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes, and decidua. *J Clin Endocrinol Metab.* **70**, 421–430 (1990).
307. Z. M. Lei, C. V Rao, J. L. Kornyei, P. Licht, E. S. Hiatt, Novel expression of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene in brain. *Endocrinology.* **132**, 2262–2270 (1993).
308. C. V Rao, Immunocytochemical localization of gonadotropin and gonadal steroid receptors in human pineal glands. *J Clin Endocrinol Metab.* **82**, 2756–2757 (1997).
309. S. Lojun, S. Bao, Z. M. Lei, C. V Rao, Presence of functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin (hCG) receptors in human breast cell lines: implications supporting the premise that hCG protects women against breast cancer. *Biol Reprod.* **57**, 1202–1210 (1997).
310. M. A. Abdallah *et al.*, Human fetal nongonadal tissues contain human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptors. *J Clin Endocrinol Metab.* **89**, 952–956 (2004).
311. C. V Rao, Z. M. Lei, The past, present and future of nongonadal LH/hCG actions in reproductive biology and medicine. *Mol Cell Endocrinol.* **269**, 2–8 (2007).
312. P. C. Goldsmith, W. G. McGregor, W. J. Raymoure, R. W. Kuhn, R. B. Jaffe, Cellular localization of chorionic gonadotropin in human fetal kidney and liver. *J Clin Endocrinol Metab.* **57**, 654–661 (1983).
313. F. P. Zhang, M. Poutanen, J. Wilbertz, I. Huhtaniemi, Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol Endocrinol.* **15**, 172–183 (2001).
314. Z. M. Lei *et al.*, Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Mol. Endocrinol.* **15**, 184–200 (2001).
315. P. Ahtiainen *et al.*, Phenotypic characterisation of mice with exaggerated and missing LH/hCG action. *Mol Cell Endocrinol.* **260-262**, 255–263 (2007).
316. T. Pakarainen *et al.*, Extragonadal LH/hCG action--not yet time to rewrite textbooks. *Mol Cell Endocrinol.* **269**, 9–16 (2007).
317. D. Chudgar, Z. Lei, C. V Rao, Orthotopic transplantation of LH receptor knockout and wild-type ovaries. *Life Sci.* **77**, 2656–62 (2005).
318. F. Mitri, Y. Bentov, L. A. Behan, N. Esfandiari, R. F. Casper, GONADAL PHYSIOLOGY AND DISEASE A novel compound heterozygous mutation of the luteinizing hormone receptor – implications for fertility, 787–794 (2014).
319. M. L. Grøndahl *et al.*, Differences in gene expression of granulosa cells from women undergoing controlled ovarian hyperstimulation with either recombinant follicle-stimulating hormone or highly purified human menopausal gonadotropin. *Fertil. Steril.* **91**, 1820–30 (2009).
320. K. M. J. Menon, A. K. Nair, L. Wang, A novel post-transcriptional mechanism of regulation of luteinizing hormone receptor expression by an RNA binding protein from the ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.* **246**, 135–41 (2006).
321. S. W. Han, Z. M. Lei, C. V Rao, Homologous down-regulation of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors by increasing the degradation of receptor transcripts in human uterine endometrial stromal cells. *Biol. Reprod.* **57**, 158–64 (1997).

322. N. Kane, R. Kelly, P. T. K. Saunders, H. O. D. Critchley, Proliferation of uterine natural killer cells is induced by human chorionic gonadotropin and mediated via the mannose receptor. *Endocrinology*. **150**, 2882–2888 (2009).
323. M. Tsampalas *et al.*, Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. *J Reprod Immunol*. **85**, 93–98 (2010).
324. P. Licht, M. von Wolff, A. Berkholtz, L. Wildt, Evidence for cycle-dependent expression of full-length human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor mRNA in human endometrium and decidua. *Fertil. Steril.* **79 Suppl 1**, 718–23 (2003).
325. M. Zhang, H. Shi, D. L. Segaloff, B. J. Van Voorhis, M. Zheng, Expression and localization of luteinizing hormone receptor in the female mouse reproductive tract. *Biol. Reprod.* **64**, 179–87 (2001).
326. D. X. Lin, Z. M. Lei, X. Li, C. V Rao, Targeted disruption of LH receptor gene revealed the importance of uterine LH signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* **234**, 105–16 (2005).
327. T. Pakarainen, Fertility in luteinizing hormone receptor-knockout mice after wild-type ovary transplantation demonstrates redundancy of extragonadal luteinizing hormone action. *J. Clin. Invest.* **115**, 1862–1868 (2005).
328. S. Kundu, K. Pramanick, S. Paul, A. Bandyopadhyay, D. Mukherjee, Expression of LH receptor in nonpregnant mouse endometrium: LH induction of 3 β -HSD and de novo synthesis of progesterone. *J. Endocrinol.* **215**, 151–65 (2012).
329. L. a Cole, hCG, the wonder of today's science. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **10**, 24 (2012).
330. N. Lédée *et al.*, Performance evaluation of microbead and ELISA assays for follicular G-CSF: A non-invasive biomarker of oocyte developmental competence for embryo implantation. *J. Reprod. Immunol.* **86**, 126–132 (2010).
331. N. Ledee *et al.*, Levels of follicular G-CSF and interleukin-15 appear as noninvasive biomarkers of subsequent successful birth in modified natural in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril.* **95**, 94–98 (2011).
332. T. M. Gaafar *et al.*, Evaluation of cytokines in follicular fluid and their effect on fertilization and pregnancy outcome. *Immunol. Invest.* **43**, 572–584 (2014).
333. M. M. Le Beau *et al.*, Chromosomal localization of the human G-CSF gene to 17q11 proximal to the breakpoint of the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*. **1**, 795–9 (1987).
334. S. Nagata *et al.*, The chromosomal gene structure and two mRNAs for human granulocyte colony-stimulating factor. *EMBO J.* **5**, 575–81 (1986).
335. A. Larsen *et al.*, Expression cloning of a human granulocyte colony-stimulating factor receptor: a structural mosaic of hematopoietin receptor, immunoglobulin, and fibronectin domains. *J. Exp. Med.* **172**, 1559–70 (1990).
336. D. J. Tweardy *et al.*, Molecular cloning of cDNAs for the human granulocyte colony-stimulating factor receptor from HL-60 and mapping of the gene to chromosome region 1p32-34. *Blood*. **79**, 1148–54 (1992).
337. Y. Aoki, S. Sha, H. Mukai, Y. Nishi, Selective stimulation of G-CSF gene expression in macrophages by a stimulatory monoclonal antibody as detected by a luciferase reporter gene assay. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 757–64 (2000).
338. S. Nioche, A. Tazi, D. Lecossier, A. J. Hance, Production of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) by human cells: T lymphocyte-dependent and T lymphocyte-independent release of G-CSF by blood monocytes. *Eur. J. Immunol.* **18**, 1021–6 (1988).
339. G. D. Demetri, J. D. Griffin, Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*. **78**, 2791–808 (1991).
340. M. A. Moore, The clinical use of colony stimulating factors. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 159–91 (1991).
341. K. Matsushita *et al.*, Granulocyte colony-stimulating factor production by adult T-cell leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* **111**, 208–15 (2000).
342. S. B. Cheknev *et al.*, Production of the growth factors GM-CSF, G-CSF, and VEGF by human peripheral blood cells induced with metal complexes of human serum γ - globulin formed with copper or zinc ions. *Mediators Inflamm.* **2014**, 518265 (2014).
343. W. Würfel, patients with repetitive implantation failures and / or recurrent spontaneous abortions. *J. Reprod. Immunol.*, 1–13 (2015).

344. H. Uzumaki *et al.*, Identification and characterization of receptors for granulocyte colony-stimulating factor on human placenta and trophoblastic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **86**, 9323–9326 (1989).
345. S. C. Shorter, G. S. Vince, P. M. Starkey, Production of granulocyte colony-stimulating factor at the materno-foetal interface in human pregnancy. *Immunology*. **75**, 468–474 (1992).
346. S. Saito, R. Fukunaga, M. Ichijo, S. Nagata, Expression of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor at the fetomaternal interface in murine and human pregnancy. *Growth Factors*. **10**, 135–143 (1994).
347. S. McCracken *et al.*, Expression of granulocyte-colony stimulating factor and its receptor is regulated during the development of the human placenta. *J Endocrinol*. **149**, 249–258 (1996).
348. S. A. McCracken, K. E. Grant, I. Z. MacKenzie, C. W. Redman, H. J. Mardon, Gestational regulation of granulocyte-colony stimulating factor receptor expression in the human placenta. *Biol Reprod*. **60**, 790–796 (1999).
349. A. Salmassi *et al.*, Detection of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in human follicular luteinized granulosa cells. *Fertil Steril*. **81 Suppl 1**, 786–791 (2004).
350. R. Fujii *et al.*, The involvement of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in the release of a mature oocyte. *Hum Reprod*. **26**, 310–311 (2011).
351. J. S. Duan, Production of granulocyte colony stimulating factor in decidual tissue and its significance in pregnancy. *Osaka City Med J*. **36**, 81–97 (1990).
352. R. Sharma, A. Das, Organ-specific phenotypic and functional features of NK cells in humans. *Immunol. Res*. **58**, 125–31 (2014).
353. S. Rutella, F. Zavala, S. Danese, H. Kared, G. Leone, Granulocyte colony-stimulating factor: a novel mediator of T cell tolerance. *J Immunol*. **175**, 7085–7091 (2005).
354. S. Rutella, Granulocyte colony-stimulating factor for the induction of T-cell tolerance. *Transplantation*. **84**, S26–30 (2007).
355. E. Yannaki *et al.*, G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp Hematol*. **33**, 108–119 (2005).
356. D. T. Vandermolen, Y. Gu, Human endometrial expression of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and its receptor, stimulation of endometrial G-CSF production by interleukin-1 beta, and G-CSF inhibition of choriocarcinoma cell proliferation. *Am. J. Reprod. Immunol*. **36**, 278–84 (1996).
357. H. B. Zeyneloglu, G. Onalan, T. Durak, I. Alyazici, E. Unal, Granulocyte macrophage colony stimulating factor (G-CSF) administration for art patients with repeated implantation failure (RIF): which route is best? *Fertil. Steril*. **100**, S291–S292 (2013).
358. S. Makinoda, N. Hirotsaki, T. Waseda, H. Tomizawa, R. Fujii, Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in the mechanism of human ovulation and its clinical usefulness. *Curr. Med. Chem*. **15**, 604–13 (2008).
359. F. Scarpellini, M. Sbracia, Use of granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of unexplained recurrent miscarriage: a randomised controlled trial. *Hum Reprod*. **24**, 2703–2708 (2009).
360. C. Santjohanser *et al.*, Granulocyte-colony stimulating factor as treatment option in patients with recurrent miscarriage. *Arch Immunol Ther Exp*. **61**, 159–164 (2013).
361. N. Gleicher *et al.*, A pilot cohort study of granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of unresponsive thin endometrium resistant to standard therapies. *Hum Reprod*. **28**, 172–177 (2013).
362. M. Kunicki *et al.*, Evaluation of granulocyte colony-stimulating factor effects on treatment-resistant thin endometrium in women undergoing in vitro fertilization. *Biomed Res Int*. **2014**, 913235 (2014).
363. D. H. Barad *et al.*, A randomized clinical trial of endometrial perfusion with granulocyte colony-stimulating factor in in vitro fertilization cycles: impact on endometrial thickness and clinical pregnancy rates. *Fertil Steril*. **101**, 710–715 (2014).
364. Y. Li *et al.*, Granulocyte colony-stimulating factor administration for infertile women with thin endometrium in frozen embryo transfer program. *Reprod Sci*. **21**, 381–385 (2014).

365. M. B. Cavalcante, F. D. S. Costa, R. Barini, E. A. Júnior, Granulocyte colony-stimulating factor and reproductive medicine: A review. *Iran. J. Reprod. Med.* **13**, 195–202 (2015).
366. M. Rahmati *et al.*, Granulocyte-Colony Stimulating Factor Related Pathways Tested on an Endometrial Ex-Vivo Model. *PLoS One.* **9**, e102286 (2014).
367. S. Assou *et al.*, A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study. *Mol. Hum. Reprod.* **14**, 711–9 (2008).
368. K. M. Gebhardt, D. K. Feil, K. R. Dunning, M. Lane, D. L. Russell, Human cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer. *Fertil. Steril.* **96**, 47–52.e2 (2011).
369. T. Garrido-Gómez *et al.*, Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results. *Fertil. Steril.* **99**, 1078–1085 (2013).
370. A. Barash *et al.*, Local injury to the endometrium doubles the incidence of successful pregnancies in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* **79**, 1317–22 (2003).
371. R. Mansour *et al.*, Intrauterine injection of human chorionic gonadotropin before embryo transfer significantly improves the implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a prospective randomized study. *Fertil. Steril.* **96**, 1370–1374.e1 (2011).
372. H. S. Moon, S. H. Park, J. O. Lee, K. S. Kim, B. S. Joo, Treatment with piroxicam before embryo transfer increases the pregnancy rate after in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil. Steril.* **82**, 816–20 (2004).
373. K. H. H. M. D *et al.*, Endometrial infusion of human chorionic gonadotropin at the time of blastocyst embryo transfer does not impact clinical outcomes : *Fertil. Steril.* **102**, 1591–1595.e2 (2014).
374. B. Wirleitner *et al.*, Intrauterine administration of human chorionic gonadotropin does not improve pregnancy and life birth rates independently of blastocyst quality : a randomised prospective study (2015), doi:10.1186/s12958-015-0069-1.
375. E. S. Sills, Z. Yang, D. J. Walsh, S. A. Salem, Comprehensive genetic assessment of the human embryo: can empiric application of microarray comparative genomic hybridization reduce multiple gestation rate by single fresh blastocyst transfer? *Arch. Gynecol. Obstet.* **286**, 755–61 (2012).
376. L. Rodrigo *et al.*, New tools for embryo selection: comprehensive chromosome screening by array comparative genomic hybridization. *Biomed Res. Int.* **2014**, 517125 (2014).
377. M. Vercammen, A. Verloes, P. Haentjens, H. Van De, Can soluble human leucocyte antigen-G predict successful pregnancy in assisted reproductive technology ? (2009), doi:10.1097/GCO.0b013e32832924cd.
378. D. Kotze *et al.*, The effect of the biochemical marker soluble human leukocyte antigen G on pregnancy outcome in assisted reproductive technology—a multicenter study. *Fertil. Steril.* **100**, 1303–9 (2013).
379. K. Kirkegaard, A. Ahlström, H. J. Ingerslev, T. Hardarson, Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology. *Fertil. Steril.* **103**, 323–32 (2015).
380. E. Van Royen *et al.*, Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum. Reprod.* **14**, 2345–9 (1999).
381. R. Machtinger, C. Racowsky, Morphological systems of human embryo assessment and clinical evidence. *Reprod. Biomed. Online.* **26**, 210–21 (2013).
382. L. L. Espey, Ovulation as an inflammatory reaction—a hypothesis. *Biol. Reprod.* **22**, 73–106 (1980).
383. K. Yanagi *et al.*, Cyclic changes of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mRNA in the human follicle during the normal menstrual cycle and immunolocalization of G-CSF protein. *Hum. Reprod.* **17**, 3046–52 (2002).
384. S. Makinoda *et al.*, Serum concentration of endogenous G-CSF in women during the menstrual cycle and pregnancy. *Eur. J. Clin. Invest.* **25**, 877–9 (1995).
385. A. Salmassi *et al.*, Is granulocyte colony-stimulating factor level predictive for human IVF outcome? *Hum Reprod.* **20**, 2434–2440 (2005).

386. D. L. Hock, R. D. Huhn, E. Kemmann, Leukocytosis in response to exogenous gonadotrophin stimulation. *Hum. Reprod.* **12**, 2143–6 (1997).
387. A. Civetta, Adaptive evolution at immune system genes and deep pregnancy implantation in primates. *Genomics.* **105**, 17–22 (2015).
388. L. Casarini *et al.*, LH and hCG action on the same receptor results in quantitatively and qualitatively different intracellular signalling. *PLoS One.* **7**, e46682 (2012).
389. A. C. Zenclussen *et al.*, Abnormal T-Cell Reactivity against Paternal Antigens in Spontaneous Abortion. *Am. J. Pathol.* **166**, 811–822 (2005).
390. L. a. Cole, HCG, five independent molecules. *Clin. Chim. Acta.* **413**, 48–65 (2012).

Annexes

1. The actors of human implantation: gametes, embryo and endometrium – 2012 – InTech.
2. Human chorionic gonadotropin: A hormone with immunological and angiogenic properties – 2010 – J Reprod Immunol.