

DU NOUVEAU À L'INTERFACE MATERNO-FŒTALE :

rôle du couple hCG/récepteur LH-hCG dans l'implantation embryonnaire

S. PERRIER D'HAUTERIVE (1), C. CHARLET-RENARD (2), M. DUBOIS (3), J-M. FOIDART (4), V. GEENEN (5)

RÉSUMÉ : L'implantation de l'embryon dans l'endomètre maternel est un phénomène unique, associant un paradoxe immunologique (tolérance d'une allogreffe) et biologique (adhésion de deux épithéliums). Le succès de l'implantation nécessite un endomètre réceptif, un blastocyste normal et, surtout, un dialogue synchronisé entre tissus embryonnaires et maternels. Bien que les stéroïdes sexuels soient les acteurs de première ligne, une série de cytokines et de facteurs paracrines sont les médiateurs privilégiés du dialogue à l'interface materno-fœtale. L'endomètre est un des rares tissus dans lequel l'embryon ne peut pas s'implanter, excepté au cours d'une période limitée (fenêtre implantatoire), requise pour l'établissement du dialogue, notamment via le marqueur le plus spécifique de l'embryon : l'hormone chorionique gonadotrope (hCG). L'hCG - une des molécules les plus précocement produites par l'embryon - est un facteur lutéotrope qui relaie le soutien inadéquat fourni par les taux réduits de LH. L'hCG influence aussi l'implantation par une action locale, en interagissant via son récepteur, le LH/hCG-R, que nous avons mis en évidence au niveau de l'épithélium endométrial humain. Le LH/hCG-R a été initialement décrit dans les tissus gonadiques. Il est maintenant évident qu'il est aussi exprimé par de nombreux tissus extra-gonadiques. Via le système hCG/récepteur LH-hCG, l'embryon participe activement à son implantation, sa tolérance et sa placentation.

MOTS-CLÉS : hCG - LH/hCG-R - Implantation - Embryo

INTRODUCTION

L'implantation d'un embryon dans l'endomètre maternel constitue une des étapes clés du processus reproductif et de l'initiation de la grossesse dans de nombreuses espèces. Ce processus est constitué d'une série d'événements finement coordonnés, au cours desquels les cellules trophoblastiques embryonnaires entrent en contact avec l'utérus en 3 étapes : l'apposition, l'adhésion, puis l'invasion dans l'endomètre maternel. Le succès de l'implantation résulte de la synchronisation spatio-temporelle entre les tissus maternels et embryonnaires. Cette coordination requiert un endomètre réceptif, un embryon fonctionnellement normal au stade blastocyste et, surtout, un dialogue étroit entre ces deux protagonistes. Bien que les stéroïdes sexuels soient les acteurs de première ligne au

WHAT'S NEW AT THE MATERNAL-FŒTAL INTERFACE : ROLE OF THE hCG/LH-hCG RECEPTOR COUPLE DURING EMBRYO IMPLANTATION

SUMMARY : Implantation of the embryo into the maternal endometrium represents a unique biological process, combining an immunological (tolerance of an allograft) and biological (adhesion of two epitheliums) paradox. The success of implantation depends on a receptive endometrium, a functionally normal blastocyst and a synchronized cross-talk between embryonic and maternal tissues. Though sexual steroids control the process, a cascade of growth factors or cytokines are the prime paracrine mediators of the dialogue at the maternal-embryonic interface. HCG is one of the molecules most precociously produced by the embryo and is the most specific marker of its presence. HCG is a luteotropic factor which relays the inadequate support provided by the reduced rates of LH, but also influences the pregnancy on a paracrine mode by a local action on implantation process, probably by interacting with its receptor, the LH/hCG-R that we have evidenced on endometrial epithelium. We demonstrate that embryo actively participate into its implantation, tolerance and placentation.

KEYWORDS : hCG - LH/hCG-R - Implantation - Embryo

niveau du microenvironnement établi à l'interface materno-fœtale, une série d'autres facteurs interviennent aussi dans ce dialogue, de façon paracrine ou juxtacrine (1, 2).

Les progrès en procréation médicalement assistée (PMA) sont manifestes depuis ces dernières années (micro-injection intra cytoplasmique de spermatozoïdes, éclosion assistée, maturation in vitro, ...). Cependant, si des avancées majeures ont été réalisées dans certains domaines de la procréation humaine, l'implantation reste la 'boîte noire' de la reproduction. Trente à cinquante pourcents des échecs de PMA sont directement dus à l'embryon (3), la majorité des échecs restants étant liés à un défaut de réceptivité utérine, de tolérance maternelle vis-à-vis de l'embryon, ou de communication materno-fœtale. L'objectif principal de la recherche actuelle consiste en l'amélioration de la compréhension des différentes étapes de l'implantation et du rôle joué par chacun des protagonistes (endomètre et embryon) afin d'optimiser la réussite en PMA et de réduire le nombre d'embryons replacés (et, par conséquent les écueils engendrés par les grossesses multiples) (4). Une meilleure connaissance de l'implantation est aussi cruciale pour définir la pathogénie non seulement des anomalies de l'implantation pouvant conduire à l'infertilité, mais aussi celles en cause dans les

(1) Assistante clinique, Centre d'immunologie CHU, Département universitaire de Gynécologie et Obstétrique, CHR Citadelle, Liège. 2) Technologue, 3) Chef de service associé, Directeur du CPMA de Liège, 4) Professeur, 5) Professeur, ULg, Directeur de Recherches au FNRS, Centre d'Immunologie CHU Sart Tilman, Liège.

fausses couches à répétition, le RCIU ou la pré-éclampsie.

Le signal de communication spécifique de l'embryon est l'hormone chorionique gonadotrope (hCG). Dans le cadre de nos recherches sur l'implantation, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à cette hormone et à son récepteur, le LH/hCG-R, afin de déterminer leur impact sur l'endomètre et la physiologie implantatoire.

LA RÉCEPTIVITÉ UTÉRINE

Alors que l'implantation peut se produire dans n'importe quel tissu du corps humain, l'endomètre est un des rares tissus dans lequel l'embryon ne peut pas s'implanter, excepté au cours d'une période limitée appelée fenêtre implantaire, qui s'étend du j20 au j24 d'un cycle menstruel normal (5) (Fig. 1). Celle-ci permet l'établissement du dialogue paracrine complexe entre mère et embryon. A l'heure actuelle, il n'existe pas de définition moléculaire précise de la fenêtre implantaire. En effet, son étude est grevée de difficultés, notamment éthiques, et aucun modèle humain *in vitro* ne peut donner une idée satisfaisante de la cascade exacte des événements conduisant à la réceptivité utérine et à l'implantation. Il n'existe donc aucun marqueur de réceptivité utilisable de façon fiable et reproductible en clinique. Certaines molécules ou modifications ultra-structurales ont été proposées, contribuant au processus implantaire de façon positive ou négative sans qu'aucune ne soit à elle seule spécifique d'un endomètre réceptif (Tableau I).

A l'interface materno-fœtale, coexistent une série de facteurs redondants, mais complémen-

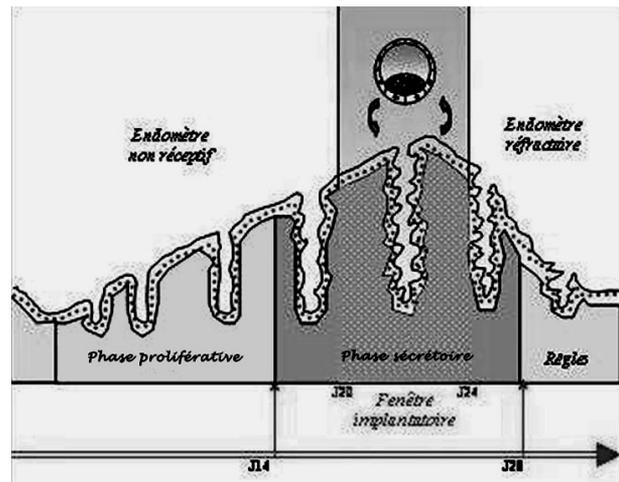


Figure 1 : Représentation chronologique de la fenêtre implantaire au cours du cycle menstruel

taires, accentuant la difficulté pour les chercheurs de trouver les marqueurs spécifiques d'un endomètre réceptif. Pour avoir une valeur pronostique, un marqueur adéquat doit pouvoir témoigner de la réceptivité utérine cycle après cycle. Pour pouvoir envisager son utilisation en PMA, il faut pouvoir mettre en évidence ce marqueur de façon simple et non invasive, si possible au cours du cycle où sera transféré un embryon. Le seul marqueur spécifique de la réceptivité utérine est actuellement l'implantation elle-même, et, donc, la production d'hCG. Au laboratoire de Neuroimmuno-endocrinologie et d'Embryologie du Centre d'Immunologie de Liège (CIL), nous nous sommes particulièrement intéressés à ce marqueur spécifique de l'embryon et avons évalué son rôle potentiel dans les toutes premières phases de l'implantation embryonnaire, quand les cellules

TABEAU I : LISTE NON EXHAUSTIVE DES FACTEURS D'INTÉRÊT DANS L'IMPLANTATION ET LE MAINTIEN DE LA GROSSESSE

Facteurs	Exemples	Rôles présumés
Hormones	Œstradiol, progestérone hCG	Promouvoir la prolifération et la différenciation de l'endomètre Soutenir le corps jaune, agir localement de façon paracrine ou autocrine
Modifications structurales de l'épithélium	Pinopodes, mucines	Faciliter l'adhésion du blastocyste, promouvoir la différenciation et l'invasion trophoblastique
Cytokines et facteurs de croissance	LIF, HB-EGF, VEGF, CSF, I L-6, IL-1, IL-4, TGF- β , IGF1 et IGF2, ...	Faciliter le dialogue entre blastocyste et utérus; moduler la production de PG, promouvoir la prolifération/différenciation. Remodeler l'endomètre; faciliter l'invasion trophoblastique, contrôler la perméabilité vasculaire endométriale
Facteurs immunologiques	IL-10, Crry, HLA-G Indoleamine 2,3 dioxygénase	Immunosuppression Dégradation du tryptophane
Protéinases, inhibiteurs et molécules d'adhésion	MMP, TIMP, cadhérines, intégrines	Contrôler l'invasion trophoblastique
Autres facteurs	COX-2, tension en oxygène	Régulation de la balance entre la prolifération et la différenciation trophoblastique

trophoblastiques entrent en contact avec l'épithélium endométrial.

L'HCG : LE SIGNAL SPÉCIFIQUE DE L'EMBRYON

Tout comme les hormones hypophysaires LH, FSH et TSH, l'hCG appartient à la famille des hormones glycoprotéiques. Ces hormones sont constituées de deux sous-unités associées de façon non-covalente. La sous-unité α , commune à tous les membres de la famille, est codée par un seul gène localisé sur le chromosome 6. La sous-unité β , différente pour chaque hormone, est quant à elle codée par des gènes distincts localisés sur le chromosome 19 pour LH, hCG et TSH et sur le chromosome 11 pour FSH. Bien que la sous-unité β confère la spécificité de l'activité biologique de chaque glycoprotéine, la sous-unité α est importante pour permettre la liaison de l'hormone à son récepteur avec une haute affinité et l'activité biologique complète. La combinaison des sous-unités α et β est donc indispensable pour la pleine expression de l'activité hormonale. La β -hCG est la plus grande des sous-unités β . Elle contient une partie glycosylée plus grande et 145 résidus d'acides aminés dont une extrémité carboxy-terminale unique de 24 acides aminés permettant la production d'anticorps hautement spécifiques et l'utilisation de dosages immunologiques spécifiques. L'importante glycosylation de la β -hCG lui confère une stabilité plus grande et facilite la rapidité de sa sécrétion. Les sous-unités β de la LH et de l'hCG sont *quasi* identiques (96 % d'identité), ce qui permet à ces deux hormones de partager le même récepteur. Cependant, l'hCG s'y fixe avec une affinité 4,5 fois plus grande que la LH. De par sa stabilité et sa plus longue demi-vie (24 h) par rapport à la LH (20 min), l'hCG est préférée en utilisation clinique. L'hCG est principalement produite par le trophoblaste et certaines tumeurs malignes (cancer testiculaire, ovarien ou mammaire, adénocarcinome endométrial et quelques tumeurs pancréatiques ou gastriques).

LE RÉCEPTEUR LH/hCG

Le LH/hCG-R est un membre du sous-groupe des récepteurs des hormones glycoprotéiques de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G, à 7 domaines transmembranaires. Il est codé par un gène unique localisé sur le bras court du chromosome 2. Le gène du LH/hCGR s'étend sur approximativement 80 kb et consiste en 10 introns et 11 exons. Son cDNA code pour une glycoprotéine de 675 acides aminés. La masse moléculaire des chaînes polypeptidiques du récepteur est d'environ 75 kDa, mais le LH/hCG-

R mature a probablement une masse moléculaire supérieure en raison de sa glycosylation (85-95 kDa). Comme tous les récepteurs couplés aux protéines G, il associe 2 unités fonctionnelles : une large portion extracellulaire, site de reconnaissance et de fixation spécifique de l'hCG ou de la LH, couplée à 7 domaines transmembranaires, et un segment intracellulaire lui-même couplé aux protéines G. Ce dernier est le site de transduction du signal généré par la fixation hormonale dans le domaine extracellulaire (6, 7). Le second messenger principal est constitué par la cascade de l'AMP cyclique et de la protéine kinase A (PKA) bien que certaines études évoquent la possibilité de l'activation de la protéine kinase C (PKC) par l'intermédiaire du diacylglycerol (DAG) (8), ou la phosphorylation de ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinase), d'une manière indépendante à la PKA (9). Cette voie alternative d'activation de ERK pourrait prévenir la désensibilisation en présence de fortes concentrations d'hCG dans l'utérus au moment de l'implantation et permettre ainsi à l'hCG d'exercer en continu son action sur l'endomètre en préparation pour la grossesse (10).

L'expression du LH/hCGR a été initialement décrite dans les tissus gonadiques : dans l'ovaire au niveau de la thèque, de la granulosa, des cellules interstitielles, des cellules lutéales et dans le testicule au niveau des cellules de Leydig (7). L'existence extragonadique du récepteur a été suggérée pour la première fois par Ziecik et al. (11) grâce à des études de liaison dans l'utérus de porc. Malgré plusieurs études démontrant l'existence du LH/hCG-R au niveau extra-gonadique, et endométrial plus particulièrement, il a longtemps existé un débat, quant à la présence d'une forme complète et fonctionnelle du récepteur ou plutôt d'isoformes tronquées sans activité physiologique, voire même d'un variant encore inconnu du récepteur. Cette controverse est née notamment des résultats publiés par EA Stewart et al. Ces auteurs n'ont pas réussi à amplifier l'ARNm du LH/hCGR dans l'endomètre humain par RT-PCR classique (12, 13) alors que d'autres équipes y étaient parvenues. L'expression de la protéine du récepteur complet a été mise en évidence par Western Blot, révélant une bande à 80 kDa (14). Les analyses par RT-PCR et Northern Blot ont également suggéré l'expression de l'ARNm du récepteur (15). Pour mettre fin à cette controverse, Licht et al. ont étudié l'expression de la forme complète du LH/hCGR dans l'endomètre humain à différents moments du cycle et dans la décidua (16). Ils ont utilisé la technique de RT-PCR à l'aide de différents couples d'amorces oligonucléotidiques permettant l'amplification de l'entièreté de la séquence codante de l'ARNm du LH/hCGR ou certains fragments d'ARNm plus

courts. Afin d'augmenter la spécificité et la sensibilité, les produits de PCR ont ensuite été ré-amplifiés (nested PCR) à l'aide d'amorces internes permettant d'amplifier les produits du premier cycle de PCR. Les résultats de Licht et al. confirment que l'endomètre humain exprime le *LH/hCGR* dans sa forme complète tout au long du cycle menstruel (16).

Des mutations spontanées du *LH/hCGR* ont été décrites chez l'homme (17). Les mutations activatrices engendrent l'activation des protéines G sans liaison du ligand au récepteur. Il en résulte, chez les garçons, une augmentation des taux sériques de testostérone en présence de taux faibles, voire non détectables, de LH, et donc une puberté précoce. Chez les filles, ces mutations activatrices n'ont pas de phénotype particulier. On a également décrit des mutations inactivatrices. Les garçons ayant une mutation complète inactivatrice sont pseudo-hermaphrodites (organes génitaux externes féminins et testicules intra-abdominaux, agénésie des cellules de Leydig et azoospermie). Les filles atteintes ont un développement pubertaire normal avec une aménorrhée et une anovulation. Finalement, l'inactivation partielle du récepteur engendre chez le garçon des signes d'imprégnation faible en testostérone (micropénis) (Tableau II).

SYSTÈME HCG- LH/hCGR ET IMPLANTATION

Au CIL, nous avons également étudié l'expression de *LH/hCGR* dans l'endomètre humain. Tout d'abord, au niveau de l'ARNm, par RT-PCR réalisée à l'aide de deux couples d'amorces. Le premier couple (Fig. 2 : couple A) a été utilisé en RT-PCR conventionnelle et a permis de mettre en évidence les transcrits du récepteur dans le tissu endométrial entier, dans les cellules stromales et dans les cellules épithéliales isolées à partir de biopsies d'endomètres réalisée chez des patientes fertiles et sans traitement (Fig. 3). Il est à noter que, contrairement aux équipes de Licht et Rao (14-16), nous avons pu les mettre en évidence sans devoir recourir à une nested PCR. Le second couple (Fig. 2 : couple B) a été choisi spécifiquement pour répondre aux exigences de la PCR en

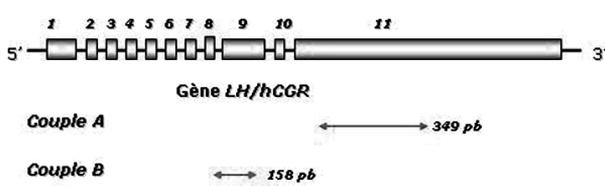


Figure 2 : Positionnement sur la séquence codante du *LH/hCGR* des amorces pour les RT-PCR et taille des amplicons obtenus

TABEAU II : RELATION ENTRE LE TYPE DE MUTATION SPONTANÉE DU *LH/hCGR* ET LE PHÉNOTYPE DU PATIENT (17)

Type de mutation du <i>LH/hCGR</i>	Phénotype	
	MASCULIN	FEMININ
Activatrice	Puberté précoce familiale des garçons	Aucun
Inhibitrice complète	Pseudo-hermaphrodisme	Aménorrhée primaire
Inhibitrice partielle	Micropénis et hypovirilisation	Inconnu

temps réel (méthode TaqMan). D'abord testé en PCR conventionnelle, ce couple d'amorces nous a également permis de mettre en évidence les transcrits du *LH/hCGR* sur les cellules épithéliales isolées d'endomètres en phase proliférative et en phase sécrétoire. La PCR classique n'étant pas quantitative, nous avons mis au point la technique de PCR en temps réel afin de quantifier l'expression de *LH/hCGR* sur les cellules épithéliales isolées d'endomètres prélevés à différents moments du cycle menstruel. Nous avons observé que l'expression de *LH/hCGR* est accrue au cours de la mi-phase sécrétoire et donc au moment de la fenêtre implantatoire (Fig. 4). Il faut cependant noter que l'expression de base du récepteur est faible. Cela peut s'expliquer par le fait que les cellules épithéliales d'endomètre n'expriment probablement pas toutes le récepteur. Cette expression pourrait n'être confinée qu'à une partie restreinte de l'endomètre, celle directement en regard de l'embryon pré-implantatoire. Ce faible niveau d'expression explique probablement les difficultés éprouvées par certaines équipes à mettre en évidence ce récepteur par PCR conventionnelle. La cinétique d'expression de *LH/hCGR* que nous avons observée suggère que ce récepteur pourrait constituer un marqueur de réceptivité endométriale et, donc, de fenêtre

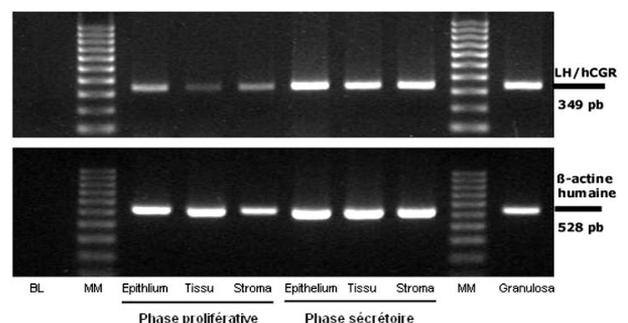


Figure 3 : Mise en évidence des transcrits du *LH/hCGR* (haut) et de la β -actine humaine (bas) dans la granulosa humaine (contrôle +), dans l'épithélium, le stroma et les tissus entiers de deux endomètres humains : 1 endomètre en phase proliférative et 1 endomètre en phase sécrétoire. BL=ARN-, MM= marqueur de la masse moléculaire (100 pb)

implantatoire. La relation entre le niveau d'expression du récepteur et la réceptivité utérine doit cependant encore être élucidée par d'autres expérimentations. Après avoir mis en évidence les transcrits du *LH/hCGR*, nous avons recherché la présence du récepteur au niveau protéique. La capacité de l'hCG à se fixer aux cellules épithéliales d'endomètre a été démontrée par une expérience de liaison utilisant de l'hCG marquée à la fluorescéine (avec l'aimable aide du Dr J. Closset, ULg). La nature épithéliale des cellules ayant fixé l'hCG-fluo a été démontrée par le double marquage avec un anticorps anti-cytokératine.

Nous avons également montré la fonctionnalité de ce récepteur, puisque l'hCG (1-50 UI/ml) est capable de stimuler la production par les cellules épithéliales d'endomètre *in vitro* d'une cytokine primordiale pour l'implantation embryonnaire chez la souris : le leukemia inhibitory factor (LIF) (18). L'hCG inhibe également la production d'une cytokine pro-inflammatoire, l'interleukine 6 (IL-6). Ces effets sont inhibés par un anticorps anti-hCG et ne sont pas liés à une action locale de l'interleukine 1β (IL-1 β) comme le démontre l'absence d'effet d'un anticorps anti-IL-1 β sur l'action stimulatrice ou inhibitrice d'hCG sur la production respectivement de LIF et d'IL-6 par l'épithélium endométrial *in vitro*. Cependant, seule la forme complète, dimérique, de l'hCG peut remplir ces fonctions biologiques puisque les sous-unités α et β séparément n'induisent aucune modulation de la production cytokinique endométriale. Finalement, nous avons démontré qu'hCG stimule également la production par l'épithélium endométrial, d'un facteur pro-angiogène puissant, le vascular endothelium epidermal growth factor (VEGF).

Nos résultats suggèrent que l'embryon participe activement aux premières phases de l'implantation. En effet, par sa production d'hCG et d'autres facteurs de croissance comme les IGFs et

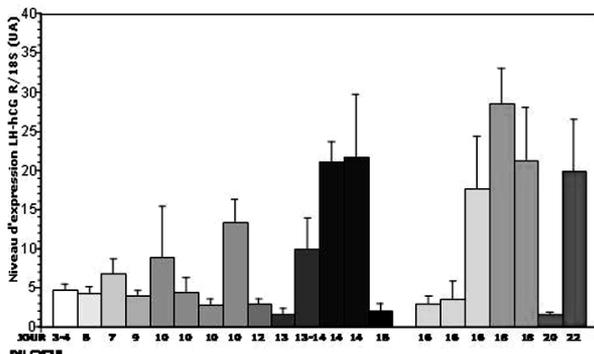


Figure 4 : Quantification au cours du cycle mensuel (1 colonne = 1 échantillon au jour X) du niveau d'expression du *LH/hCGR* normalisé par rapport à l'ARNr 18S (unité arbitraire), par PCR en temps réel (méthode TaqMan).

différents membres de la famille TGF-β, l'embryon stimule la production de LIF pro-implantatoire, de VEGF pro-angiogène et réduit la production d'IL-6 pro-inflammatoire par l'épithélium endométrial humain au cours du cycle, probablement en interagissant avec son récepteur, le LH/hCG-R que nous avons mis en évidence au niveau de l'épithélium (19-20) (Fig. 5).

SYSTÈME hCG – LH/hCGR ET DÉBUT DE LA GROSSESSE

L'hCG est une des molécules les plus précocément produites par l'embryon et la plus spécifique de sa présence. En effet, l'ARNm de l'hCG est transcrit dès le stade 2 cellules (21). Au stade blastocyste, les transcrits de l'hCG sont détectés dans le trophoblaste et la production d'hCG par le blastocyste débute avant même son implantation. Des taux significatifs d'hCG peuvent être mesurés dans le sang maternel 10 jours après l'ovulation. Le pic de production d'hCG par le placenta est atteint entre la 10ème et la 11ème semaine de gestation, puis la synthèse décline dès la 12ème semaine pour rester à des taux faibles pendant tout le reste de la grossesse. Il ressort des études actuelles et de nos résultats personnels que l'hCG influence positivement l'implantation, non seulement par son rôle lutéotrope, mais également via une action locale à l'interface materno-fœtale, probablement en interagissant avec LH/hCG-R. A la lumière d'études récentes, il est de plus en

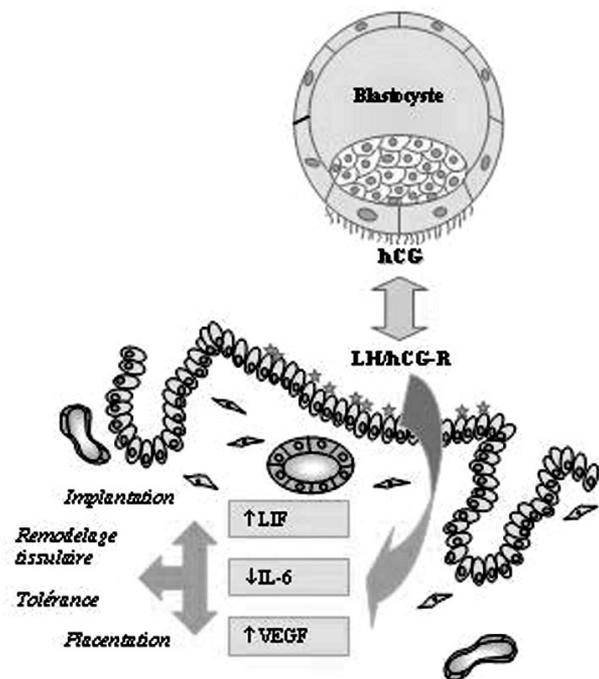


Figure 5 : Schéma récapitulatif de l'impact du système hCG-LH/hCG-R dans la grossesse précoce. Par ses trois actions (↑ LIF, ↓ IL-6 et ↑ VEGF), l'hCG exprimée par le blastocyste intervient dans son implantation, sa tolérance et sa placentation.

plus clair que l'hCG intervient dans la régulation de la différenciation endométriale et dans le processus implantatoire au sens large avec un impact aux différentes phases de l'implantation.

RÔLE PRO-IMPLANTATOIRE

Licht et al. ont utilisé la technique de microdialyse pour administrer de faibles concentrations d'hCG dans l'utérus de femmes en phase lutéale. Cette administration d'hCG a provoqué de profonds effets paracrines sur des paramètres de la différenciation déciduale (inhibition d'un marqueur de décidualisation, IGFBP-1, uniquement en phase lutéale tardive suggérant que l'embryon pourrait augmenter la durée de la fenêtre implantatoire et, donc, la période au cours de laquelle il lui est possible de s'implanter), du remodelage de la matrice extracellulaire (augmentation de la MMP-9), de l'implantation (LIF, M-CSF), de l'angiogenèse (VEGF) (22). Le traitement de cellules stromales ou épithéliales endométriales avec de l'hCG augmente l'expression du gène *COX2* de façon dépendante à la dose et au temps, par l'intermédiaire du système de signalisation de l'AMPc/Protéine kinase A (23, 24). L'enzyme COX-2, qui catalyse la formation des prostaglandines (PGE2 notamment qui favorise la différenciation des cellules stromales en décidua), est absolument essentiel pour l'implantation. L'inactivation ciblée de *Cox2* chez la souris conduit à des anomalies sévères de la reproduction comme l'échec de l'implantation (25). Nos propres résultats confirment également le rôle primordial joué par l'embryon lors du dialogue étroit entre trophoblaste et épithélium endométrial qui s'établit au moment de l'implantation.

RÔLE DANS L'ANGIOGÉNÈSE ET LA PLACENTATION

La présence du LH/hCG-R à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux utérins ainsi que dans la couche musculaire lisse des artères utérines a déjà été décrit (26). Toth et coll. ont démontré (27) que l'administration *in vivo* d'hCG réduit les résistances vasculaires dans l'utérus humain et, *in vitro*, réduit les eicosanoïdes vasoconstricteurs de la paroi vasculaire. Ces résultats ont initié une étude chez une population de patientes présentant des signes de fausses-couches. Ces patientes ont été traitées avec du magnésium ou de la progestérone et/ou de l'hCG. Les résultats ont montré que le nombre de patientes qui ont atteint le deuxième trimestre de grossesse était plus élevé quand de l'hCG était inclus au protocole thérapeutique, en parallèle avec une réduction des résistances vasculaires. De plus, le nombre d'accouchements prématurés ou de RCIU était plus faible lorsque de l'hCG avait

été administrée au premier trimestre. Zygmunt et al. ont récemment proposé l'hCG comme nouveau facteur angiogène (28). A l'aide d'un système d'angiogenèse *in vitro* en 3-D, ils ont démontré que l'hCG est un facteur promoteur de l'angiogenèse en favorisant la migration et la formation d'ébauches de capillaires par les cellules endothéliales de l'utérus. Dans le but d'approfondir la compréhension de l'implication de l'hCG dans le processus implantatoire, nous avons étudié, au CIL, l'impact de l'hCG sur la production de VEGF par des cellules épithéliales d'endomètre *in vitro*. Nos résultats suggèrent que l'épithélium endométrial est capable de répondre au signal spécifiquement envoyé par un embryon en voie d'apposition, par la production de VEGF et de stimuler ainsi l'angiogenèse au niveau des vaisseaux sous-jacents. Par ailleurs, une fois les premières phases d'apposition et d'adhésion accomplies, l'embryon en phase d'invasion endométriale continue à produire de l'hCG qui serait aussi capable de stimuler directement l'angiogenèse (Berndt S, Noël A, Foidart JM et al., non publié).

RÔLE DANS LA TOLÉRANCE MATERNELLE DE L'EMBRYON

A côté de son action directe sur l'endomètre humain (épithélium et stroma), il faut également évoquer la contribution de l'hCG dans la tolérance maternelle de l'embryon. Cette fonction, témoin de l'interrelation entre les systèmes immunitaires et endocriniens, est évoquée dans plusieurs études. Nous citerons celle de Kayisli et al. qui suggère que l'hCG pourrait être un facteur placentaire clé pour le développement de l'immunos tolérance locale maternelle par le biais du système de mort cellulaire programmée Fas/Fas-Ligand (29). De manière plus générale, Khan et al. ont montré que l'administration d'hCG à des souris diabétiques non obèses (NOD) avant le début des symptômes cliniques réduit l'augmentation de la glycémie, inverse l'établissement de l'infiltration inflammatoire dans le tissu pancréatique et inhibe profondément et de façon prolongée le développement du diabète, cette maladie auto-immune liée aux lymphocytes Th1 (30).

PERSPECTIVES

Parmi les nombreuses molécules qui interviennent dans l'établissement de la réceptivité utérine, aucune n'a encore prouvé en clinique sa valeur prédictive et pronostique d'une grossesse. Le plus souvent dans la littérature, ces marqueurs sont mis en évidence dans un cycle autre que celui où un embryon pourrait s'implanter.

Mais, ce profil d'expression de ces marqueurs lors d'un cycle peut-il être extrapolé à tous les cycles suivants? Pour qu'un marqueur de réceptivité utérine puisse être utilisé en PMA, il doit pouvoir être mis en évidence de façon simple, rapide et sûre. S'il est recherché en dehors d'un cycle où sera transféré un embryon, il doit pouvoir attester de la réceptivité de façon stable d'un cycle à l'autre chez une même patiente et pouvoir attester de la réceptivité d'un cycle suivant. Si les marqueurs de réceptivité sont mis en évidence lors du cycle où sera transféré un embryon, on évite la variabilité de l'endomètre d'un cycle à l'autre, mais on se heurte inévitablement aux problèmes éthiques, bien que différentes publications dans la littérature confirment l'inocuité de telles biopsies.

Dans le passé, l'étude de l'expression génique était limitée par la difficulté d'étudier plusieurs gènes à la fois. Avec l'avènement de la technique des 'microarrays' (ou micropuces), l'expression génique dans un tissu donné peut être étudiée à l'échelle génomique, ce qui permet de mesurer simultanément le niveau d'expression de plusieurs milliers de gènes au départ de très peu de matériel biopsique. Dans le domaine de la fertilité, la technique des microarrays a été récemment utilisée dans le but de mieux caractériser l'expression génique globale de l'endomètre sur des biopsies utérines au cours de la fenêtre implantatoire en comparaison avec l'endomètre en période non-réceptive. Certaines équipes ont pu mettre en évidence la surexpression, au cours de la fenêtre implantatoire, de toute une série de gènes comme la glycodéline, les insulin-like growth factor-binding proteins (IGF-BP), des cytokines et des facteurs de croissance, des protéines de surface cellulaire, des composants de la matrice extra-cellulaire, des protéines du cycle cellulaire, des gènes intervenant dans le transport du cholestérol, la biosynthèse des prostaglandines, des protéoglycans,...

(31) Cependant, ces études ont une approche très globale de la fenêtre implantatoire et ne permettent pas de tirer des conclusions probantes. De plus, il n'y a probablement pas un marqueur de la fenêtre implantatoire, mais une série de facteurs redondants, d'où la difficulté de mettre en évidence ces facteurs de façon précise par une technique aussi globale. Les perspectives résident en la réalisation de microarrays 'sur mesure' permettant l'analyse d'un nombre plus restreint de gènes, mais qui auront soigneusement été choisis en vertu de leur possible intervention dans le processus implantatoire.

De par son expression au cours du cycle et son caractère spécifique d'un signal embryonnaire, le récepteur LH/hCG pourrait être proposé comme nouveau marqueur de réceptivité uté-

rine. En association avec le Professeur A. Hazout (Hôpital Bichat, Paris), nous étudions ce récepteur en tant que marqueur de fenêtre implantatoire en quantifiant sa transcription endométriale dans une population de femmes infertiles en cours de traitement PMA. Ces résultats obtenus avec le récepteur de l'hCG sont à corréler à l'analyse immuno-histo-chimique des endomètres pour d'autres marqueurs de la fenêtre implantatoire tels que l'intégrine $\alpha v\beta 3$, le LIF et l'IL-10 ainsi qu'à une datation soigneuse des biopsies par une anatomo-pathologiste expérimentée. Cette étude va pour la première fois et de façon prospective mettre en relation le niveau d'expression endométriale du LH/hCG-R avec la survenue ou non d'une grossesse au cours d'un cycle PMA. Cependant, pour attester réellement de la valeur prédictive (positive ou négative) d'un profil d'expression du LH/hCG-R particulier, ces résultats nécessitent d'être répétés chez ces mêmes patientes qui ont été enceintes, lors d'une tentative ultérieure avec démonstration qu'un profil identique s'accompagne à nouveau d'une grossesse.

CONCLUSIONS

La notion de dialogue à l'interface materno-fœtale est devenue de plus en plus évidente. Il ressort des études actuelles que l'embryon a un impact significatif dans le processus implantatoire en participant aux interactions embryo-utérines réciproques qui varient avec l'avancement de l'implantation. Nos travaux démontrent que, par l'intermédiaire du système hCG/hCG-R, l'embryon intervient activement dans sa propre implantation et tolérance. De plus, ils permettent d'évaluer un possible rôle pour le LH/hCG-R en tant que marqueur de la fenêtre implantatoire.

REMERCIEMENTS

Ces recherches sont soutenues par le FNRS de Belgique, la Fondation Leon Fredericq, la Fondation de recherche Serono et l'EMBIC - European Network of Excellence.

BIBLIOGRAPHIE

1. Fazleabas A T, Kim J J, Strakova Z.— Implantation : embryonic signals and the modulation of the uterine environment—a review. *Placenta*, 2004, **25** Suppl, S26-31.
2. Minas V, Loutradis D, Makrigiannakis A.— Factors controlling blastocyst implantation. *Reprod Biomed Online*, 2005, **10**, 205-216.
3. Simón C, Valbuena D.— Embryonic implantation. *Ann Endocrinol*, 1999, **60**, 134-136.

4. Perrier d'Hauterive S, Geenen V.— Comprendre l'implantation en 2004. *Genesis*, 2004, **101**, 15-20.
5. Perrier d'Hauterive S, Charlet-Renard C, Goffin F et al.— La fenêtre implantatoire. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, 2002, **31**, 440-455.
6. Dufau M.— The luteinizing hormone receptor. *Annu Rev Physiol*, 1998, **60**, 461-496.
7. Ascoli M, Segaloff D.— On the structure of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor. *Endocrin Rev*, 1989, **10**, 27-44.
8. Kisielewska J, Flint A, Ziecik AJ.— Phospholipase C and adenylate cyclase signalling systems in the action of hCG on porcine myometrial smooth muscle cells. *J Endocrinol*, 1996, **148**, 175-180.
9. Srisuparp S, Strakova Z, Brudney A, et al.— Signal transduction pathways activated by chorionic gonadotropin in the primate endometrial epithelial cells. *Biol Reprod*, 2003, **68**, 457-464.
10. Cameo P, Srisuparp S, Strakova Z, et al.— Chorionic gonadotropin and uterine dialogue in the primate. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004, **2**, 50.
11. Ziecik AJ, Stanchev PD, Tilton JE.— Evidence for the presence of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin-binding sites in the porcine uterus. *Endocrinol*, 1986, **119**, 1159-1163.
12. Stewart EA, Sahakian M, Rhoades A, et al.— Messenger ribonucleic acid for the gonadal luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor is not present in human endometrium. *Fertil Steril*, 1999, **71**, 368-372.
13. Stewart EA.— Gonadotropins and the uterus : is there a gonad-independent pathway? *J Soc Gynecol Investig*, 2001, **8**, 319-326.
14. Han SW, Lei ZM, Rao CV.— Treatment of human endometrial stromal cells with chorionic gonadotropin promotes their morphological and functional differentiation into decidua. *Mol Cell Endocrinol*, 1999, **147**, 7-16.
15. Lin J, Lei ZM, Lojun S et al.— Increased expression of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene in human endometrial carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, **79**, 1483-1491.
16. Licht P, von Wolff M, Berkholz A, et al.— Evidence for cycle-dependent expression of full-length human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor mRNA in human endometrium and decidua. *Fertil Steril*, 2003, **79**, 718-723.
17. Themmen A P N, Huhtaniemi IT.— Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors : elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev*, 2000, **21**, 551-583.
18. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, et al.— Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature*, 1992, **359**, 76-79.
19. Perrier d'Hauterive S, Charlet-Renard C, Berndt S, 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*, 2004, **19**, 2633-2643.
20. Perrier d'Hauterive S, Charlet-Renard C, Berndt S, et al.— Human endometrial Leukemia inhibitory factor (LIF) and Interleukin-6 (IL-6) : control of secretion by Transforming growth factor b (TGF-b) related members. *Neuroimmunomodul*, 2005, **12**, 157-163.
21. Jurisicova A, Antenos M, Kapasi K, et al.— Variability in the expression of trophoblastic markers beta-human chorionic gonadotropin, human leukocyte antigen-G and pregnancy specific beta-1 glycoprotein by the human blastocyst. *Hum Reprod*, 1999, **14**, 1852-1858.
22. Licht P, Russu V, Lehmeyer S, et al.— Intrauterine microdialysis reveals cycle-dependent regulation of endometrial insulin-like growth factor binding protein-1 secretion by human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril*, 2002, **78**, 252-258.
23. Han SW, Lei ZM, Rao CV.— Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression by chorionic gonadotropin in mucosal cells from human fallopian tubes. *Endocrinol*, 1996, **137**, 2929-2937.
24. Zhou XL, Lei ZM, Rao CV.— Treatment of human endometrial gland epithelial cells with chorionic gonadotropin/luteinizing hormone increases the expression of the cyclooxygenase-2 gene. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, **84**, 3364-3377.
25. Lim H, Paria BC, Das SK, et al.— Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*, 1997, **91**, 197-208.
26. Toth P, Li X, Rao CV, et al.— Expression of functional human chorionic gonadotropin/human luteinizing hormone receptor gene in human uterine arteries. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, **79**, 307-315.
27. Toth P, Lukacs H, Gimes G, et al.— Clinical importance of vascular LH/hCG receptors--a review. *Reprod Biol*, 2001, **1**, 5-11.
28. Zygmunt M, Herr F, Keller-Schoenwetter S, et al.— Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, **87**, 5290-5296.
29. Kayisli UA, Selam B, Guzeloglu-Kayisli O, et al.— Human chorionic gonadotropin contributes to maternal immunotolerance and endometrial apoptosis by regulating Fas-Fas ligand system. *J Immunol*, 2003, **171**, 2305-2313.
30. Khan NA, Khan A, Savelkoul HF, et al.— Inhibition of diabetes in NOD mice by human pregnancy factor. *Hum Immunol*, 2001, **62**, 1315-1323.
31. Riesewijk A, Martin J, Van Os R, et al.— Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod*, 2003, **9**, 253-264.

Les demandes de tirés à part sont à adresser au Dr. Sophie Perrier d'Hauterive, Université de Liège, Centre d'Immunologie, Laboratoire de Neuroimmuno-Endocrinologie et d'Embryologie, CHU-B23, B-4000 Liège, Belgique.
 sperrier@chrcitadelle.be / sperrier@skynet.be